



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular



DEPARTAMENTO DE  
**MIcRoBiologia**  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

## INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
São Paulo, SP – Brasil fone: 55 11 - 3091.7293  
e-mail: eldurigo@usp.br



1

### **LAUDO DE EFICÁCIA ANTI-VIRAL Contra a Cepa Clássica Circulante SARS-CoV-2 / humana / BRA / SP02 / 2020 (MT126808.1), e as Variantes Brasileiras SARS-CoV-2 / P1 ( MAN 87201 ) e SARS-CoV-2 / P2 (LMM 38019 )**

**São Paulo, 12 de Abril de 2021**

**Assunto:** Eficácia de inativação do SARS-CoV-2, contra a cepa clássica circulante SARS-CoV-2 / humana / BRA / SP02 / 2020 (MT126808.1), e as variantes brasileiras SARS-CoV-2 / P1 ( MAN 87201 ) de Manaus e SARS-CoV-2 / P2 (LMM 38019 ) do Rio de Janeiro em máscaras cirúrgicas tratada com o Biocida Phitalox Pro.

Empresa Solicitante: Phitta Industria e Comercio de Produtos Têxteis LTDA, endereço: Av. Anselmo Leitempergher , numero2950 centro , Rio dos Cedros , SC. CEP 89.121-000.

Lote : 022101001-03

Data Fabricação: 09/03/2021

Data de Validade: 24 meses

Lote : 019501001-03-03

Data Fabricação: 24/02/2021

Data de Validade: 24 meses

#### **ETAPA 01**

Materiais utilizados para o teste de inibição viral:

Máscara:SARSCoV2 Cepa Clássica Lote 022101001-03	Máscara:SARSCoV2 Cepa Clássica Lote 019501001-03-03
Máscara:SARSCoV2 Variante - P1 Lote 022101001-03	Máscara:SARSCoV2 Variante - P1 Lote 019501001-03-03
Máscara:SARSCoV2 Variante – P2 Lote 022101001-03	Máscara:SARSCoV2 Variante – P2 Lote 019501001-03-03
C positivo	C positivo

1



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular



## INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
São Paulo, SP – Brasil fone: 55 11 - 3091.7293  
e-mail: eldurigo@usp.br



2

O experimento foi realizado no Laboratório NB3 no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

### ETAPA 02

#### Seleção das Variantes de SARS-CoV-2 Utilizadas no Teste:

- 1- **Cepa Clássica Circulante SARS-CoV-2 / humana / BRA / SP02 / 2020 (MT126808.1)**
- 2- **Variante Brasileira SARS-CoV-2 / P1 ( MAN 87201 ).**
- 3- **Variantes Brasileiras SARS-CoV-2 / P1 ( MAN 87201 ) e SARS-CoV-2 / P2 (LMM 38019 )**

### ETAPA 03: Metodologia do procedimento de tecido para teste de redução de carga viral seguindo a normativa recomendada pela ISO 18184.

Quadrados medindo 02cm x 02cm de cada material, foram cortados em duplicata. Uma duplicata foi imersa em 3 ml do vírus SARS-CoV-2 / humana / BRA / SP02 / 2020 (MT126808.1), e em 3ml em eventos distintos das variantes brasileiras SARS-CoV-2 / P1 ( MAN 87201 ) de Manaus e SARS-CoV-2 / P2 (LMM 38019 ) RJ na concentração de 1000 TCID<sub>50</sub>/mL [0,02 MOI] contido em tubo tipo Falcon (mix-V). A outra duplicata foi imersa em 3ml de meio DMEM puro (mix-C). Os falcons contendo mix-V e mix-C foram agitados em “vórtex” e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente (TA).

O experimento ocorreu em placas de cultivo celular com 24 poços, contendo células VERO CCL-81 (1x10<sup>5</sup> células/poço). Onde foram inoculados 100 µL do mix-V de cada amostra em duplicata para determinação da eficácia de cada produto, 100 µl do mix-C para determinação da cito toxicidade do produto na célula e 100 µl do produto resgatado da superfícies do material, de acordo com o esquema apresentado na Figura 01. Foi denominado como inoculo, 100 µl vírus [0,02MOI] adicionado em 300µl de *lisis buffer* e armazenado até o momento da realização de Real-Time RT-PCR.

2

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
São Paulo, SP – Brasil fone: 55 11 - 3091.7293  
e-mail: eldurigo@usp.br

3

**Figura 01:** Representação esquemática de teste de inibição do vírus SARS-CoV-2 contra a cepa clássica circulante SARS-CoV-2 / humana / BRA / SP02 / 2020 (MT126808.1), e as variantes brasileiras SARS-CoV-2 / P1 ( MAN 87201 ) de Manaus e SARS-CoV-2 / P2 (LMM 38019 ) do Rio de Janeiro, além do teste de citotoxicidade destes materiais.

C+ Mix-V- Cepa Clássica	Máscara: Lote 022101001-03 Mix-V	Máscara: Lote 019501001-03 Mix-V	C+ MIX-V
C+ MIX-V Variante - P1	Máscara: Lote 022101001-03 Mix-V	Máscara: Lote 019501001-03 Mix-V	C+ MIX-V
C+ MIX-V Variante – P2	Máscara: Lote 022101001-03 Mix-V	Máscara: Lote 019501001-03 Mix-V	C+ MIX-V
C- MIX-C	Máscara: Lote 022101001-03 Mix-C	Máscara: Lote 019501001-03 Mix-C	C- MIX-C

**Legenda:** Mix-V- meio com vírus; Mix-C- meio sem vírus; C+ - controle positivo; C- - controle negativo.

Após inoculação a placa foi mantida por 01 hora em estufa a 37<sup>0</sup>C com 5% de CO<sub>2</sub> (com agitação a cada 20 minutos) para adsorção viral. Após esse período, as placas foram observadas em microscópio óptico para determinação da integridade do tapete celular após adsorção, para determinação de Citotoxicidade do produto testado. Em seguida, os poços foram completados com 500 µL de Meio de Cultura (DMEM) suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino. A placa foi mantida em estufa a 37<sup>0</sup>C com 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas. Após este período, foi coletado do sobrenadante do mix-V de cada orifício e adicionado em 300µl de *lisis buffer*, para realização de Real-Time RT-PCR.

## ETAPA 04

Após 72 horas de incubação, as placas foram observadas novamente em microscópio óptico para determinação da integridade do tapete celular em comparação com os controles positivo e negativo. O sobrenadante foi coletado para realização de Real-Time RT-PCR e a placa fixada e corada com Naphtol Blue Black (Sigma-Aldrich). A Figura 02 representa a leitura das placas em microscópio óptico.

**Figura 02:** Leitura em microscópio óptico de teste de citotoxicidade e inibição viral de SARS-CoV-2, contra a cepa clássica circulante SARS-CoV-2 / humana / BRA / SP02 / 2020 (MT126808.1), e as variantes brasileiras SARS-CoV-2 / P1 ( MAN 87201 ) de Manaus e SARS-CoV-2 / P2 (LMM 38019 ) do Rio de Janeiro, Controle positivo e controle negativo.

C+ Positivo Cepa Clássica	Lote 022101001-03 Redução	Lote 019501001-03 Redução	C+ Positivo Cepa Clássica
C+ Positivo Variante - P1	Lote 022101001-03 Redução	Lote 019501001-03 Redução	C+ Positivo Variante - P1
C+ Positivo Variante - P2	Lote 022101001-03 Redução	Lote 019501001-03 Redução	C+ Positivo Variante - P2
C- Íntegro	Lote 022101001-03 Íntegro	Lote 019501001-03 Íntegro	C- Íntegro

**Legenda:** **Positivo**- presença de efeito citopático (EC) no tapete celular; **Negativo**- ausência de EC no tapete celular; **Redução CPE**- redução do EC no tapete quando comparado com o controle +; **Citotóxico**- o Mix-C, amostra sem vírus, matou as células nas primeiras horas do experimento; **Íntegro**- o mix-C não matou a célula.

## ETAPA 05

As amostras coletadas foram submetidas a PCR em Tempo Real (RT-PCR) para identificação do SARS-CoV-2. A extração do material genético foi realizada utilizando sistema semi-automatizado NucliSENS® easyMag® (BioMerieux, Lyon, France), seguindo as instruções do fabricante. A detecção do RNA viral foi realizada utilizando o Kit AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems Inc., EUA) em máquina de PCR em Tempo Real (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany), de acordo com protocolo, “primers” e sonda para identificação do gene E viral (Corman et al., 2020).

A Curva padrão estabelecida para o cálculo de redução viral por número de cópias esta representado na **Tabela 01**. Os resultados de RT-PCR, representados por cópias de RNA/mL e porcentagem de inibição estão representados na **Tabela 02**.



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular



## INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
São Paulo, SP – Brasil fone: 55 11 - 3091.7293  
e-mail: eldurigo@usp.br



5

**Tabela 01:** Curva padrão estabelecida para o cálculo de redução viral por número de cópias de uso em diferentes máscaras submetidos a Teste de Inibição do SARS-CoV-2.

### Corman (gene E) 2020 SARS-CoV-2

Ct	Quantificação	Número de cópias/reacção	Quantificação	Número de cópias/mL
6	10,27696793	1,89E+10	12,2303207	1,70E+12
9	9,402332362	2,53E+09	11,35568513	2,27E+11
12	8,527696793	3,37E+08	10,48104956	3,03E+10
15	7,653061224	4,50E+07	9,606413994	4,04E+09
17	7,069970845	1,17E+07	9,023323615	1,06E+09
20	6,195335277	1,57E+06	8,148688047	1,41E+08
23	5,320699708	2,09E+05	7,274052478	1,88E+07
26	4,44606414	2,79E+04	6,39941691	2,51E+06
29	3,571428571	3,73E+03	5,524781341	3,35E+05
32	2,696793003	4,97E+02	4,650145773	4,47E+04
35	1,822157434	6,64E+01	3,775510204	5,96E+03
38	0,947521866	8,86E+00	2,900874636	7,96E+02

\* Limite de detecção viral máxima

\*\* Limite de detecção viral mínimo

5

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
São Paulo, SP – Brasil fone: 55 11 - 3091.7293  
e-mail: eldurigo@usp.br

6

**Tabela 02:** Material, cópias de RNA/reação e porcentagem de inibição viral em diferentes máscaras submetidos a Teste de Inibição do SARS-CoV-2 cepa B clássica e variantes P.1 e P.2.

Amostra	Número de cópias/reação	Redução (%)
Máscara:SARSCoV2 Lote 022101001-03 Cepa Clássica	2,66E+04	99,93 %
Máscara:SARSCoV2 Lote 022101001-03 Variante - P1	7,80E+05	97,79%
Máscara:SARSCoV2 Lote 022101001-03 Variante – P2	1,52E+05	99,68 %
Máscara:SARSCoV2 Lote 019501001-03 Cepa Clássica	1,33E+04	99,96 %
Máscara:SARSCoV2 Lote 019501001-03 Variante - P1	6,51E+05	98,34%
Máscara: SARSCoV2 Lote 019501001-03 Variante – P2	1,12E+05	99,06 %
Inoculo SARSCoV2 Cepa Clássica	2,74E+03	0,00 %
Inoculo SARSCoV2 Variante - P1	2,11E+04	0,00 %
Inoculo SARSCoV2 Variante – P2	3,53E+04	0,00 %
Controle SARSCoV2 Cepa Clássica	3,75E+07	100 %
Controle SARSCoV2 Variante - P1	3,53E+07	100 %
Controle SARSCoV2 Variante – P2	3,83E+07	100 %



Laboratório de Virologia Clínica e Molecular



## INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900  
São Paulo, SP – Brasil fone: 55 11 - 3091.7293  
e-mail: eldurigo@usp.br



7

### CONCLUSÃO

Com base na observação de efeito citopático e comparação de resultados de RT-PCR é possível concluir que a Máscara Lote 022101001-03 resultou na redução da carga viral de 99,93% para a Cepa Clássica Circulante SARS-CoV-2 / humana / BRA / SP02 / 2020 (MT126808.1), de 97,79% para a variante SARS-CoV-2 / P1 ( MAN 87201 ) e 99,68% para variante SARS-CoV-2 / P2 (LMM 38019 ) e sem apresentar efeito citotóxico para a célula. As Máscara Lote 019501001-03 resultou na redução da carga viral de 99,96% para a Cepa Clássica Circulante SARS-CoV-2 / humana / BRA / SP02 / 2020 (MT126808.1), de 98,34% para a variante SARS-CoV-2 / P1 ( MAN 87201 ) e 99,06% para variante SARS-CoV-2 / P2 (LMM 38019 ) e sem apresentar efeito citotóxico para a célula.

Estamos à disposição para maiores informações  
Atenciosamente,

Prof. Dr. Edison Luiz Durigon  
Professor Titular  
Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Universidade de São Paulo

### REFERÊNCIA

- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3):1–8.
- Araujo DB, Machado RRG, Amgarten DE, Malta FM, de Araujo GG, Monteiro CO, Candido ED, Soares CP, de Menezes FG, Pires ACC, Santana RAF, Viana AO, Dorlass E, Thomazelli L, Ferreira LCS, Botosso VF, Carvalho CRG, Oliveira DBL, Pinho JRR, Durigon EL. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2020 Oct 23;115:e200342. doi: 10.1590/0074-02760200342.

7