



LAUDO DE EFICÁCIA ANTI-VIRAL- CONTRA CEPA SARS-COV-2 – VARIANTE DELTA.

Assunto: Eficácia de inativação do SARS-CoV-2 – Variante Delta Cepa ICB 0756-2021 em máscaras cirúrgicas tratada com o Biocida Phitalox Pro.

Empresa Solicitante: Phitta Industria e Comercio de Produtos Têxteis LTDA, endereço: Av. Anselmo Leitempergher, 2950 Centro, Rio dos Cedros, SC. CEP 89.121-000.

ETAPA 01

Materiais recebidos para teste de inibição viral:

Máscara Phitta mask
Lote: L051701001-02
Data Fabricação: 12/07/2021
Data de Validade: 24 meses

O experimento foi realizado no Laboratório NB3 no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, utilizando o vírus SARS-CoV-2 – Variante Delta Cepa ICB 0756-2021.

ETAPA 02

Quadrados medindo 02cm x 02cm de cada material, foram cortados em duplicata. Uma duplicata foi imersa em 3 ml do vírus SARS-CoV-2 – Variante Delta Cepa ICB 0756-2021 na concentração de 1000 TCID₅₀/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 (1x10⁵ 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 das 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.



Figura 01: Representação esquemática de teste de inibição do vírus SARS-CoV-2 – Material: 01 Tecido, além do teste de citotoxicidade destes materiais.

C+ MIX-V	Máscara 1A Mix-V	C+ MIX-V
C+ MIX-V	Máscara 1A Mix-V	C+ MIX-V
C- MIX-C	Máscara 1A Mix-C	C- MIX-C
C- MIX-C	Máscara 1A 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 37⁰C com 5% de CO₂ (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 37⁰C com 5% de CO₂ 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 03

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. Materiais: 01 Tecido, Controle positivo e controle negativo.

C+ Positivo	Máscara 1A Redução	C+ Positivo
C+ Positivo	Máscara 1A Redução	C+ Positivo
C- Íntegro	Máscara 1A Íntegro	C- Íntegro
C- Íntegro	Máscara 1A 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 04

As amostras coletadas foram submetidas a PCR em Tempo Real (RT-PCR) para identificação do SARS-CoV-2 – Variante Delta Cepa ICB 0756-2021. 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).

Os resultados de RT-PCR, representados por cópias de RNA/mL e porcentagem de inibição estão representados na Tabela 01.

Tabela 01: Material, cópias de RNA/reação e porcentagem de inibição viral do SARS-CoV-2 – Variante Delta Cepa ICB 0756-2021 em máscaras cirúrgicas tratada com om Biocida Phitalox Pro.

Amostra	Número de cópias/reação	Redução (%)
máscaras cirúrgicas tratada com om Biocida Phitalox Pro	3,28E+07	99,05 %
Inóculo (0. h. p. i)	1,98E+03	100 %
Controle (72 h. p. i.)	4,26E+07	



CONCLUSÃO

Com base na observação de efeito citopático e comparação de resultados de RT-PCR é possível concluir que as Máscaras Cirúrgicas tratada com om Biocida Phitalox Pro do Lote: L051701001-02 resultaram na redução na carga viral do *SARS-CoV-2 – Variante Delta Cepa ICB 0756-2021*, de 99,05% 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

REFERÊNCIAS

- 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.