



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 19 de janeiro de 2024

Empresa Solicitante:

Ecosistema de Saúde Ltda
Endereço: Rua das paineiras, 241 - sala 01
Americana/SP
Cep: 1348-060
Responsável: Julio Malosso Junior
Tel: (19) 992797997
Email: jmalosso@me.com

**Referente: LAUDO TÉCNICO AÇÃO VIRUCIDA – Equipamento Plasma Air
Disinfection purifier**

Vimos por meio desta enviar o relatório do ensaio de eficácia contra vírus realizado neste laboratório.

1. Introdução:

O presente estudo foi conduzido utilizando a metodologia descrita em "BS EN 14476:2013+A2:2019 Incorporating corrigendum August 2019: Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/Step 1), com adaptações necessárias.

1.1. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de inativação viral de equipamento de desinfecção ambiental, Plasma Air Disinfection purifier, modelo P5501-TX

1.2. Instalação de Teste e Período de Condução do Estudo:

Os ensaios foram realizados em laboratório de Virologia, NB-2 (Biosafety Level 2), Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia Instituto de Biologia/UNICAMP, Campinas- SP- Brasil.

As datas abaixo representam o período em que o estudo foi conduzido.

Data chegada ao laboratório:	12/12/2024
Início do Estudo	16/12/2024
Término do Estudo	17/01/2025

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de janeiro de 2024

1.3. Pessoal envolvido no Estudo:

Responsável Técnica	Clarice Weis Arns
Analista	Thalya Fujii

2. Materiais e Métodos

2.1. Equipamento analisado



Figura 1. Equipamento Plasma Edda Air Disinfection purifier

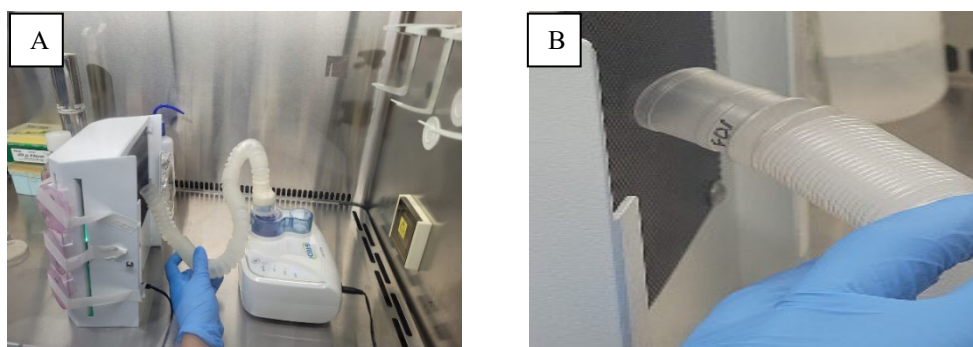


Figura 2. Equipamento Plasma *Edda* Air Disinfection purifier operando no interior de Cabine de Segurança Biológica, com placas de Petri posicionadas na saída de ar do equipamento (A) e os vírus CORONAVÍRUS e NOROVÍRUS sendo nebulizado na entrada de ar do equipamento (B).

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de janeiro de 2024

2.2. Condições experimentais e controles de teste

Temperatura do ensaio	25 °C +/- 1 °C
Especificação do produto	Plasma <i>Edda</i> Air Disinfection purifier
Controle de citotoxicidade	Teste <i>in vitro</i> na linhagem celular para a “Determinação da Dose Máxima Não Tóxica (DMTD)”, para definir a concentração que não causa toxicidade às células.
Meio Cultivo Células	DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media)
Controle virucida	Formaldeído a 0,7%.
Temperatura de incubação	37 °C + 5% de atmosfera de CO ₂ .
Tempo de incubação	48h após período de adsorção do vírus a célula permissiva.

2.3. Vírus e Célula Utilizadas*:

Vírus	Linhagem Celular
<i>Murine hepatitis virus strain 3</i> (MHV-3), mesmo gênero do Coronavírus SARS-CoV-2 (beta) GenBank (MW620427), Garcia et al. 2021.	L-929: NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] ATCC® CCL-1™
Norovírus MNV-1 (ATCC VR-1937™) <i>Familia: Caliciviridae</i> <i>Genero: Norovirus</i>	RAW 264.7 cells (ATCC catalog no. TIB-71)

* **Acervo do Laboratório de Virologia, Instituto de Biologia – IB-Unicamp**

2.3.1. Multiplicação viral

As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm² utilizando uma concentração inicial de 3×10⁴ células/mL em Meio Essencial Mínimo de Dulbecco livre de antibióticos e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para a propagação viral, as amostras foram inoculadas nas garrafas de cultivo celular e quando a monocamada apresentou 70% de efeito citopático (CPE) procedeu-se a raspagem da monocamada e agitação vigorosa até a dissolução dos grumos celulares.

Estoques de vírus portando 10⁸ doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICT₅₀) por 100 µL foram estocadas a -80°C para uso posterior.

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de janeiro de 2024

2.3.2. Titulação viral

O vírus foi titulado na base 10 (10^1 a 10^{10}) e inoculado em placas 96 orifícios contendo a respectiva linhagem celular permissiva (Item 2.3) com concentração equivalente a 3×10^4 células por ml (volume de 100 μ L/orifício). As placas foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ por até 48h. A leitura das placas foi feita em busca do efeito citopático (ECP) característico de cada vírus. O título viral foi definido em doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICT50) e foi calculado pelo método de Spearman & Kaerber (Muthannan Andavar Ramakrishnan, 2016).

Fórmula Spearman & Kaerber:

$$\log_{10} 50\% \text{ end point dilution} = - (x_0 - d/2 + d \sum r_i/n_i)$$

x_0 = $\log_{10}$ of the reciprocal of the highest dilution (lowest concentration) at which all cells/CPE*

are positive;

d = $\log_{10}$ of the dilution factor;

n_i = number of cell used in each individual dilution (after discounting accidental deaths);

r_i = number of positive CPE/cell (out of n_i).

* CPE: Cytopathic effect (ECP: Efeito citopático provocado pelo vírus nas células)

2.4. Ensaio Virucida: Exposição do vírus a processo de desinfecção

O equipamento **Plasma Air Disinfection purifier** foi testado no interior cabine de segurança biológica (CSB) de classe II. O vírus disperso em meio de cultura foi nebulizado na entrada de ar do equipamento e placas de Petri contendo papel filtro embebido em meio de cultura foram posicionadas na saída de ar do equipamento por diferentes tempos pré-determinados: 5, 10 e 15 minutos, visando coletar quaisquer partículas virais que possam ter passado pelo sistema de desinfecção.

2.4.1 As amostras foram testadas seguindo a metodologia recomendada:

a) para a “Determinação da Concentração Máxima não tóxica (CMNT)” na célula testada, visando determinar a concentração que não causa toxicidade para a célula,

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de janeiro de 2024

pois os diferentes elementos que compõe o sistema de desinfecção do equipamento devem ser ativos somente contra o vírus e não às células.

b) As placas Petri contendo papel filtro embebido em meio de cultura foram expostas na saída de ar do equipamento e posteriormente submetidas a avaliação quanto a presença de vírus viável. Amostras residuais contidas na placa e no papel filtro foram recuperadas por diluição em DMEM e pipetagem (100 µL), diluídas em série, homogeneizadas e transferidas para placas de células, que em seguida foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante 48 horas.

Após transcorridos o período de incubação, as microplacas foram lidas através do Microscópio Ótico Invertido na busca do Efeito Citopático (ECP) característico do vírus (verifica-se a presença ou não do efeito citopático da infecção viral) e os títulos foram calculados com base no método de Spearman & Kaerber.

Por fim, os resultados são expressos em percentual inativação viral em comparação com o controle viral (título do vírus) não tratado.

2.4.2 Cálculo e verificação da atividade virucida

A atividade virucida da amostra teste é avaliada calculando a diminuição do título viral em comparação com o título do vírus não exposto a desinfecção, isto é, vírus nebulizado diretamente a Placa petri por 15 minutos. A diferença é dada como fator de redução (FR). Onde:

FR = TVc-TVt (TVc: Título de vírus controle/não tratado e TVt: Título de vírus tratado).

De acordo com a EN 144476: 2019, uma solução antisséptica em uma concentração particular tem eficácia de inativação de vírus no título é reduzida em pelo menos quatro log₁₀ dentro do período de exposição recomendado. Isso corresponde a uma inativação de ≥ 99,99% (Tabela 1).

Tabela 1. Relação entre o fator de redução viral e o percentual de inativação viral

Log de Redução	Fator de Redução	Percentual de Inativação/Redução
1	10	90%
2	100	99%
3	1000	99,9%
4	10.000	99,99% VIRUCIDA
5	100.000	99,999%
6	1.000.000	99,9999%

Fonte: Microchemlab (2020)

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 19 de janeiro de 2024

3. Resultados:

Tabela 2. Citotoxicidade da amostra teste exposta a desinfecção por equipamento “Plasma Air Disinfection purifier”

Célula	Concentrações mínimas não tóxicas (CMNT)
L-929: NCTC clone 929 (ATCC® CCL-1™)	Não apresentou citotoxicidade em nenhuma diluição
RAW 264.7	Não apresentou citotoxicidade em nenhuma diluição

Tabela 3. Atividade virucida de equipamento de desinfecção de ar “Plasma Air Disinfection purifier” sobre o Coronavírus - MHV-3 (Título inicial: 10^7 TCID₅₀ / mL)

Tempo de exposição	Fator de Redução (FR) da Infectividade viral comparada a amostra controle (Log ₁₀)	Percentual de Redução da infectividade
5 minutos	2	99%
10 minutos	2	99%
15 minutos	4	99,99%

Tabela 4. Atividade virucida de equipamento de desinfecção de ar “Plasma Air Disinfection purifier” sobre o NOROVÍRUS (Título inicial: 10^8 TCID₅₀ / mL)

Tempo de exposição	Fator de Redução (FR) da Infectividade viral comparada a amostra controle (Log ₁₀)	Percentual de Redução da infectividade
5 minutos	2	99%
10 minutos	2	99%
15 minutos	3	99,9%



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 19 de janeiro de 2024

4. Conclusões

- Quanto ao coronavírus MHV-3

O **Equipamento Plasma Air Disinfection purifier** promoveu uma média de redução de **99,99%** (4 logs₁₀) da infectividade do **coronavírus** MHV-3, modelo para SARS-CoV-2, após 15 minutos de ação no interior de cabine de proteção biológica.

Considerando a inativação de 99,99% (4 logs₁₀) do vírus MHV-3, pode-se concluir que o equipamento foi eficaz para a inativação de partículas virais, portanto, auxilia no combate do grupo Coronavírus, incluindo SARS-CoV, causador da COVID-19.

- Quanto ao vírus NOROVÍRUS

O **Equipamento Plasma Air Disinfection purifier** promoveu uma média de redução de 99,9% na infectividade do vírus NOROVÍRUS no interior de cabine de proteção biológica após 15 minutos de ação.

Os Norovírus são considerados **muito resistente** no meio ambiente, portanto, o equipamento foi capaz de reduzir de 99% a 99,9% a atividade viral, que é um resultado muito positivo.

- O equipamento não apresentou citotoxicidade nas duas células de linhagem testadas, ou seja, as células não foram afetadas negativamente no ensaio realizado.

Prof. Dr. Clarice Weis-Arns
(Responsável pelo Laudo)



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 19 de janeiro de 2024

Bibliografia Consultada:

BS EN 14476:2013+A2:2019

Incorporating corrigendum August 2019

Chemical disinfectants and antiseptics -Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/Step 1)

Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch Exp Path Pharmac; 162, 1931, 480-487.

Spearman, C.: The method of 'right or wrong cases' (constant stimuli) without Gauss's formulae.

Brit J Psychol; 2 1908, 227-242

G. Kampf D., Todt, S. Pfaender, E. Steinmann

Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents

Journal of Hospital Infection 104 (2020) 246e251

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022> 0195-6701

Garcia AB, de Moraes AP, Rodrigues DM, Gilioli R, de Oliveira-Filho EF, Durães-Carvalho R, et al. Coding-Complete Genome Sequence of Murine Hepatitis Virus Strain 3 from Brazil. Microbiology Resource Announcements. 2021;10: e00248-21

Muthannan Andavar Ramakrishnan

Determination of 50% endpoint titer using a simple formula

World J Virol

May 12;5(2):85-6. doi: 10.5501/wjv.v5.i2.85. (2016)

Microchem Laboratory. Log and Percent Reductions in Microbiology and Antimicrobial Testing [Internet]. Available from: <https://microchemlab.com/information/log-and-percent-reductions-microbiology-and-antimicrobial-testing/>



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 19 de janeiro de 2024

Aparelhos utilizados:

- Cabines de biossegurança nível II e III
- Geladeiras
- Biofreezer - 80 °C
- Biofreezer -150 °C
- Incubadoras de CO₂
- Agitador (misturador Vortex)
- Medidor de pH
- Microscópio Invertido (Olympus, tipo CK 30)
- Centrífuga 5804 R (Eppendorf AG)
- Banho-maria
- Medidor pH
- Pipetas mono e multicanais (Eppendorf)

Consumíveis

- Pipetas descartáveis, ajustáveis e de volume fixo (Eppendorf AG)
- Microplacas de 96 poços Polysterol (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Frasco de cultura celular
- Tubos de ensaio selados
- Filtros descartáveis

Meio de cultura e reagentes

- Solução de antibióticos (penicilina-estreptomicina).
- Estoque de vírus conservado em -80°C
- Soro fetal de Bovino
- Solução de formaldeído 1,4%
- Sistema de água ultrapura
- PBS (Invitrogen, artigo nº 18912-014)
- Solução de tripsina
- DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media)
- DMSO- Dimetilsulfóxido-10% e Soro fetal bovino 90%)