



23 de agosto de 2020

Recebe:  
Sra Silvia Oliveira Fim  
QUATTROR  
Vila Velho-ES  
[www.quattror.com.br](http://www.quattror.com.br)

Referente: RELATÓRIO VIRUCIDA

**1. Produto: ZOONO Z71 Microbe Shield**

- 2. Vírus testados:** Coronavírus cepa MHV-3, Gênero *Betacoronavirus* (mesmo gênero e família das espécies SARS-CoV-1, SARS-CoV-2/COVID19 e MERS), Vírus da Influenza A (H1N1) e Norovírus (MNV).

Vírus	Linhagens Celulares
Coronavírus MHV-3	célula: L929 NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] (ATCC® CCL-1™)

**3. Procedimento experimental:**

- a) Os ensaios foram realizados em laboratório NB-2 (Biosafety Level 2) seguindo as Recomendações da ANVISA Art. 1 e Art. 3 da IN 04/13 e IN 12/16 e metodologias descritas nas normas (EN14476:2019, ASTM E1053 – 11 e do Instituto Robert Koch – RKI) e seguindo as “Boas Práticas de Laboratório” (BPL).

O meio de cultura para vírus e linhagens celulares foi utilizado o Meio Essencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) contendo 2% a 10% de soro fetal bovino.

- b) As titulações do Coronavírus (Cepa MHV-3) foi realizada de acordo com o método DICC<sub>50</sub> (Doses Infectantes de Cultivos Células 50%). Diluições sequenciais do vírus na base 10 foram realizadas em quadruplicata, em microplacas 96 orifícios estéreis. A seguir foram adicionadas as células L929 com uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/orifício. Após 48 hs verifica-se o

23 de agosto de 2020

efeito citopático (ECP) da infecção viral, em comparação com controle celular e controle viral.

- c) Amostra “**ZOONO Z71 Microbe Shield**” foi realizada o teste virucida em duas etapas:
- c.1) Misturada ao vírus e posteriormente submetida a diferentes tempos de contato 1, 5 e 15 minutos e a seguir foram inoculadas na célula permissiva (L929).
- c.2) A amostra foi testada por tempo prolongado “Long Lasting” de Eficácia do produto: 30 dias (intervalos de 05, 10, 20 e 30 dias), que após cada tempo de ação o vírus foi adicionado, homogeneizado, diluído e acrescentada na célula permissiva (L929).
- d) Para cada etapa e tempo de contato as microplacas com ZOONO Z71 Microbe Shield, o vírus e sistema celular foram incubadas a 37°C em Estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 hs.
- e) Os títulos foram calculados com base no método de Reed and Muench, 1938. Os resultados são expressos em **percentual inativação viral** (Tabela 1) em comparação com o controle viral (título do vírus) não tratado.

#### Resumo/Controles:

- Negativo: controle celular (2x10<sup>5</sup> células/mL) em meio DMEM, sem vírus e sem amostra teste;
- Controle de vírus: Titulação de vírus (10<sup>1</sup> a 10<sup>12</sup>) e cultura de células em meio DMEM;
- Teste positivo: presença de vírus, **ZOONO Z71 Microbe Shield** e linhagens celulares em meio DMEM.

\***Tabela 1** - Os resultados são expressos em percentual de inativação viral em comparação com o controle viral não tratado:

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% <b>VIRUCIDA</b>
5	100.000	99,999%
6	1.000,000	99,9999%

<https://microchemlab.com/information/log-and-percent-reductions-microbiology-and-antimicrobial-testing>

23 de agosto de 2020

#### 4. Resultados:

4.1) Título Coronavírus (MHV):  $10^{8,25}$  DICT50/mL e a redução da infectividade viral  $\geq \log 4$  (virucida)

Produto	Tempos	Resultados em Percentual e Atividade (Tabela 1) * Coronavírus MHV
	imediate	99,99 %   $\geq \log 4$ (virucida)
	1 minuto	99,99 %   $\geq \log 4$ (virucida)
	15 minutos	99,99 %   $\geq \log 4$ (virucida)
	<b>Long Lasting</b>	
<b>ZOONO Z71 microbe Shield (Benzaldonium Chloride, 0,50 %)</b>	5 dias	99,99 %   $\geq \log 4$ (virucida)
	10 dias	99,99 %   $\geq \log 4$ (virucida)
	20 dias	99,99 %   $\geq \log 4$ (virucida)
	30 dias	99,99 %   $\geq \log 4$ (virucida)

#### 5. Conclusões:

O produto analisado mostrou atividade virucida.

- Considerando que houve inativação de 99,99% da contaminação viral, pode-se concluir que o produto “**ZOONO Z71 microbe Shield**” foi eficaz, e, portanto, recomendamos o uso como agente virucida para os vírus do grupo Coronavírus em TODOS os tempos testados.
- **O teste de “Long Lasting”** inativou 99,99% o vírus do grupo Coronavírus testado nos tempos de 5, 10, 20 e 30 dias.



Prof. Dr. Clarice Weis-Arns (ID Lattes: 8635038112182716)

(Responsável pelo Laudo)



23 de agosto de 2020

#### Bibliografia Consultada:

ANVISA - Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 4, DE 2 DE JULHO DE 2013  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/int0004\\_02\\_07\\_2013.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/int0004_02_07_2013.html)

ANVISA- INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 12, DE 11 DE OUTUBRO DE 2016 – ANVISA.  
<https://alimentusconsultoria.com.br/instrucao-normativa-no-12-2016-anvisa/>  
<https://alimentusconsultoria.com.br/instrucao-normativa-no-50-de-3-de-dezembro-de-2019-anvisa/>

**BS EN 16777:2018:** Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area

**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)

**BS EN 16777:2018:** *Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area*

**DIN EN 14476:2015.** Chemical disinfectants and antiseptics. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine. Test method and requirements [phase 2, step 1]. Brussels 2015, CEN-Comité Européen de Normalisation.

Britta Becker, Lars Henningsen, Dajana Paulmann, Birte Bischoff, Daniel Todt , Eike Steinmann, Joerg Steinmann, Florian H. H. Brill and Jochen Steinmann  
Evaluation of the virucidal efficacy of disinfectant wipes with a test method simulating practical conditions  
Antimicrobial Resistance and Infection Control (2019) 8:121  
<https://doi.org/10.1186/s13756-019-0569-4>

Rabenau HF, Schwebke I, Blumel J, Eggers M, Glebe D, Rapp I, Sauerbrei A, Steinmann E, Steinmann J, Willkommen H, Wutzler P.  
Guideline of the German Association for the Control of Virus Diseases (DVV) e.V. and the **Robert Koch-Institute (RKI)** for testing chemical disinfectants for effectiveness against viruses in human medicine. Version of 1st December, 2014.  
Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2015;58: 493–504

Reed LJ, Muench H.  
A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg. 1938; 27:493–497.