

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Laboratório de Patogênese Viral

RELATÓRIO DE ATIVIDADES

**ESTUDO DO POTENCIAL VIRUCIDA DE COMPOSTOS MILLICARE EM RELAÇÃO AO SARS
COV-2**

Ronaldo Martins PhD

Supervisor: Prof. Dr. Eurico Arruda

1. Objetivo

Este ensaio visou determinar a capacidade (e nível) virucida em SARS CoV-2 por interferência de processo de higienização com o produtos milliCare, o DRY Limpa Carpete (composto de partículas sólidas adsorventes) e o Pre-Mist NXT (composto de solução líquida de pré-condicionamento).

2. Material de Métodos

Os experimentos foram realizados utilizando um estoque clínico de SARS CoV-2 isolado sob condições de nível de biossegurança 3 (BSL-3). O estoque utilizado sequenciado e identificado como um isolado similar ao isolado SARS-CoV-2/human/USA/OSPHL01812/2021 (Sequence ID: MZ851950.1), por meio do sequenciamento de região gênica da polimerase viral.

Brevemente, o sequenciamento por Sanger realizado utilizou o protocolo nested RT-PCR (RT-nPCR) “pancorona” de detecção universal de coronavírus [Souza Luna et al, 2007] adicionando novos oligonucleotídeos, além de modificações degenerativas, no conjunto de primers para sequenciar a RpRd do novo coronavírus. A análise das sequências obtidas foi realizada com o programa DNASTAR.v14.1 (Lasergene). As seqüências consenso foram submetidas à Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (BLAST) utilizando o algoritmo *blastn* para identificar o amplicon de SARS-CoV-2 gerado.

As infecções *in vitro* foram realizadas utilizando como linhagem repórter as células Vero (CCL-81 ATCC). Para análise da citotoxicidade do material DRY Limpa Carpete e solução virocida foi utilizado o ensaio fluorescente de AlamarBlue. Os resultados de propriedade virucidas foram quantificados por meio de titulação viral por diluição seriada e análise do efeito citopático TCID₅₀/100 uL.

3. Resultados e análise

a. Material analisado

O ensaio foi realizado com produtos comerciais da empresa milliCare, conforme imagem 1.



Imagem 1. Foto representativa retirada do site millikit.com.br mostrando o produto (líquido) Pre-Mist NXT no frasco spray e o produto (sólido) DRY Limpa Carpete em frasco forma baixa inclusos dentro do seu kit comercial, MILLI kit Tira Sujeira. Ambos os produtos foram testados individualmente e em conjunto conforme processo de higienização milliCare.

b. Potencial virucida do material DRY Limpa Carpete.

Inicialmente foi analisado o potencial virucida do material DRY Limpa Carpete. Para tal objetivo foi realizado uma incubação direta de 0,1 g do material adicionado diretamente em alíquotas de 300 µl de estoque viral de SARS CoV-2. O resultado é representativo de triplicata experimental. O controle negativo foi representado apenas por alíquotas de 300 µl de SARS CoV-2 em ausência do material particulado. Após incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, os títulos virais foram analisados por TCID₅₀ em placas de 96 poços semiconfluentes de células Vero CCL-81. De acordo com a **Figura 01**, nossos resultados indicam que houve uma redução significativa (valor de $p < 0.05$) de 1.5 log de título viral durante a incubação de 5 minutos em temperatura ambiente com o material DRY Limpa Carpete. Em linhas gerais, podemos dizer que o material DRY Limpa Carpete foi capaz de eliminar mais de 90% das partículas virais infecciosas ao longo de 5 minutos.

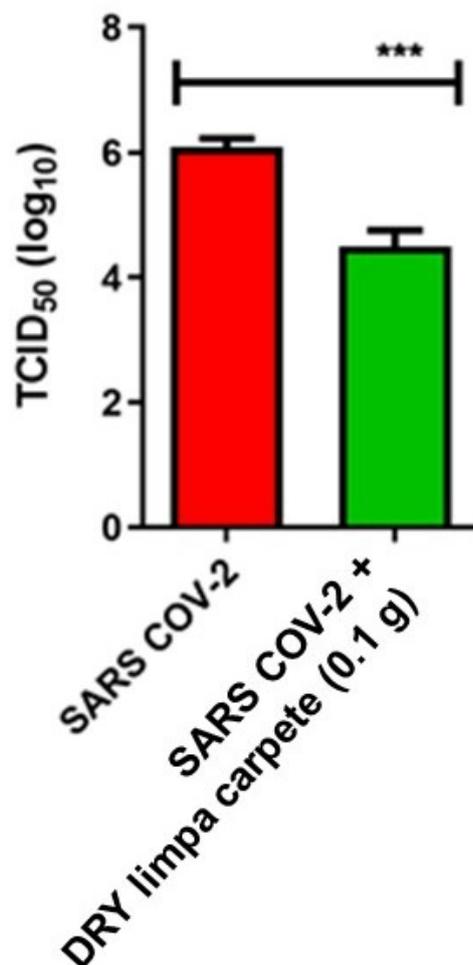


Figura 1. Titulação por TCID₅₀ em células vero CCL-81 de alíquotas de SARS CoV-2 incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente com 0.1 g de material DRY Limpa Carpete. Valor de $p < 0.05$ (Teste t).

c. Potencial virucida da solução PRE-Mist NXT

Utilizando o mesmo estoque viral de SARS CoV-2, foi realizado um novo ensaio virucida com a solução de Pre-Mist NXT. Brevemente, foi realizado uma incubação de 30 minutos em temperatura ambiente de 100 µl de SARS CoV-2 com 1.5 µl de solução Pre-Mist NXT. Como controle do ensaio virucida foi utilizado 1.5 µl

de PBS também adicionado em 100 µl de SARS CoV-2. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente a redução de título viral foi novamente quantificada por ensaio de TCID₅₀. Nossos resultados indicam que houve redução significativa de 2 log de título viral após a incubação com a solução Pre-Mist NXT (valor de $p < 0.05$). Em relação ao potencial virucida do material DRY Limpa Carpete, podemos afirmar que a solução Pre-Mist NXT apresentou potencial virucida superior com capacidade de reduzir em médias 2 logs de vírus infeccioso com 30 minutos de incubação (**Figura 2**).

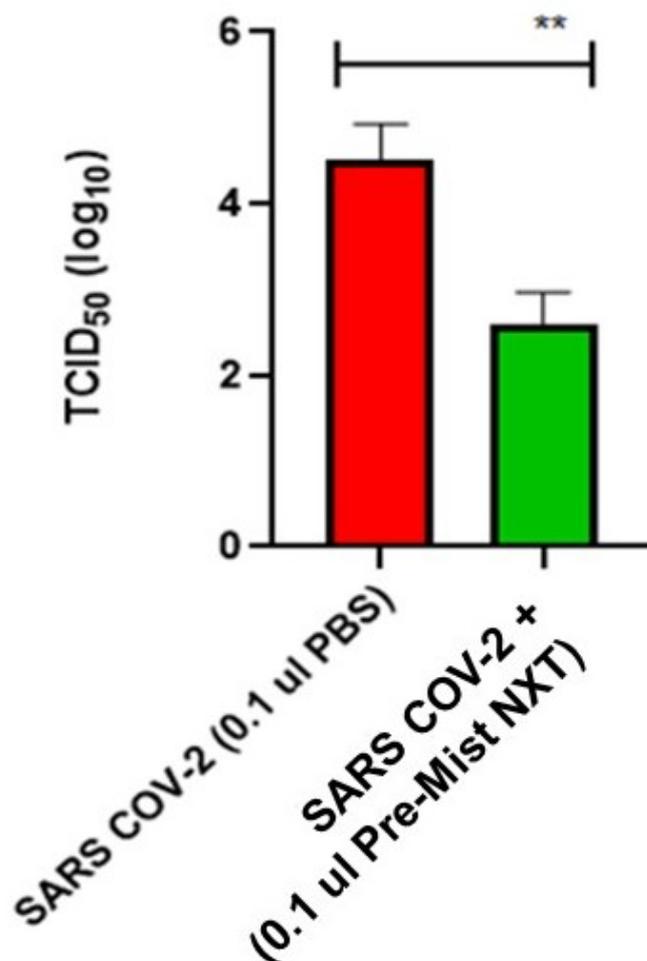


Figura 2. Título viral de SARS CoV-2 após ensaio virucida com solução Pre-Mist NXT quantificado por TCID₅₀. Valor de $p < 0.05$ (Teste t).

d. Potencial virucida sinérgico de ensaio combinado com material DRY Limpa Carpete e solução Pre-Mist NXT.

Um terceiro ensaio virucida foi realizado combinando durante o mesmo período de incubação de 30 minutos em temperatura ambiente o DRY Limpa Carpete com a solução Pre-Mist NXT. Para tal, novamente utilizamos 300 µl de SARS CoV-2 incubado com 0.1 g de material DRY Limpa Carpete com 15 µl de solução Pre-Mist NXT. 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, os testes foram titulados por TCID₅₀ para avaliar a redução de título viral. De acordo com os resultados na Figura 3, podemos afirmar que a combinação do

material DRY Limpa Carpete com a solução Pre-Mist NXT foi suficiente para eliminar todas as partículas virais infecciosas presentes nas alíquotas testadas.

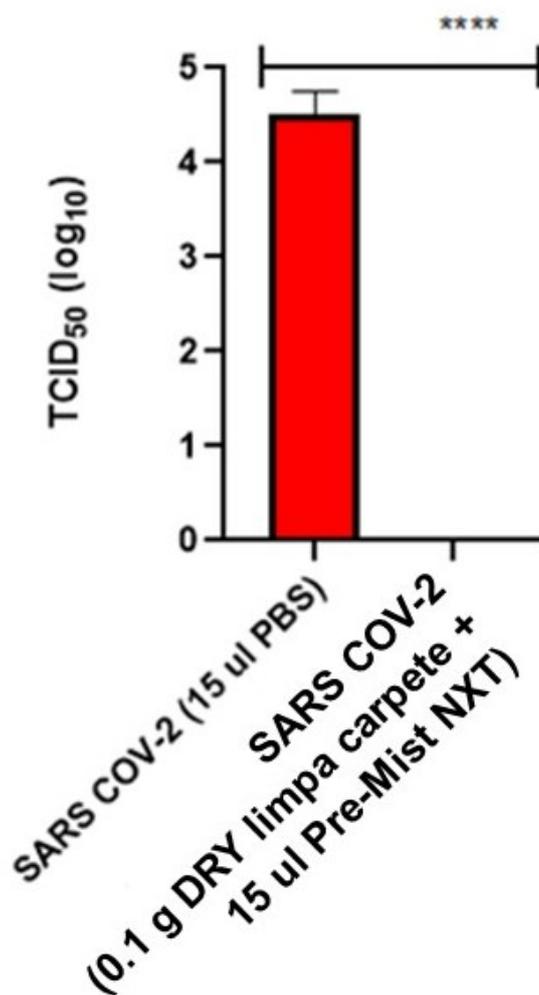


Figura 3. Ensaio virucida com combinação dos potenciais virucidas do material DRY Limpa Carpete com a solução Pre-Mist NXT em relação a estoque de SARS CoV-2 quantificado por TCID₅₀. Valor de $P < 0.001$ (Teste t).

4. Conclusão

Ambos os produtos MilliCare demonstraram separadamente uma capacidade virucida entre 1,5 a 2,0 log (acima de 90%), porém conjuntamente como utilizado no processo milliCare os dois produtos testados eliminaram totalmente o SARS CoV-2 presente nos ensaios, ou seja ocorreu uma redução de 100% da carga viral existente.

Ribeirão Preto, 01 de setembro de 2021

Dr. Ronaldo Martins PhD

Prof. Dr. Eurico Arruda