

# TRANSLATION OF VIRUCIDAL REPORT

(To be read with Original Report dated August 2020)

Clarice Weis Arns (PhD, Professor)  
Virology Laboratory  
Institute of Biology / State University of Campinas UNICAMP  
Brazil

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

**2. Viruses tested:** Coronavirus strain MHV-3, Genus Betacoronavirus (same genus and family of species SARS-CoV-1, SARS-CoV-2/COVID19 and MERS), Influenza Virus A (H1N1) and Norovirus (MNV).

Virus	Strain / Cell Lines
Coronavirus MHV-3	Strain: L929 NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] (ATCC® CCL-1™)

### 3. Experimental procedure:

a) The tests were carried out in laboratory NB-2 (Biosafety Level 2) following ANVISA Recommendations Art. 1 and Art. 3 of IN 04/13 and IN 12/16 and methodologies described in the standards (EN14476:2019, ASTM E1053 – 11 and the Robert Koch Institute – RKI) and following the “Good Laboratory Practices” (GLP).

The culture medium for virus and cell lines was used Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) containing 2% to 10% of foetal bovine serum.

b) Coronavirus titrations (Strain MHV-3 was performed according to the DICC50 method (50% Infecting Doses of Cells Cultures). Sequential dilutions of virus in base 10 were performed in quadruplicate, in sterile 96-well microplates. L929 cells with a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/hole. After 48 hrs the cytopathic effect (ECP) of viral infection compared to cellular control and viral control.

c) Sample "ZOONO Z71 Microbe Shield" the virucidal test was performed in two steps:

1. Mixed with the virus and then subjected to different times of contact 1, 5 and 15 minutes and then they were inoculated into the permissive cell (L929).

2. The sample was tested for a prolonged time "Long Lasting" of Product Efficacy: 30 days (intervals of 05, 10, 20 and 30 days), after each time of action the virus was added, homogenised, diluted and added in the permissive cell (L929).

d) For each step and contact time, the microplates with ZOONO Z71 Microbe Shield, the virus and cell system were incubated at 37°C in a greenhouse with 5% CO<sub>2</sub> for 48 hours.

e) Titers were calculated based on the method of Reed and Muench, 1938. The results are expressed as a percentage of viral inactivation (Table 1) compared to the untreated viral control (virus titer).

### Summary/Controls:

- Negative: cell control (2x10<sup>5</sup> cells/mL) in DMEM medium, without virus and without test sample.
- Virus control: Virus titration (10<sup>1</sup> to 10<sup>12</sup>) and cell culture in DMEM medium;
- Positive test: presence of virus, ZOONO Z71 Microbe Shield and cell lines in DMEM medium.

**Table 1** - Results are expressed as percentage of viral inactivation in comparison with untreated viral control:

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>

### 4. Results:

**4.1) Coronavirus Titer (MHV):** 10<sup>8.25</sup> DICT50/mL and the reduction of infectivity viral ≥ log 4 (virucidal)

PRODUCT	Time / Duration	Results in Percentage and Activity (Table 1) * Coronavirus MHV
<b>ZOONO Z71 Microbe Shield (Benzalkonium Chloride, 0,50 %)</b>	<b>Immediate</b>	99.99%   ≥ Log 4 (Virucidal)
	<b>1 Minute</b>	99.99%   ≥ Log 4 (Virucidal)
	<b>15 Minutes</b>	99.99%   ≥ Log 4 (Virucidal)
<b>LONGEVITY</b>		
<b>ZOONO Z71 Microbe Shield (Benzalkonium Chloride, 0,50 %)</b>	<b>5 Days</b>	99.99%   ≥ Log 4 (Virucidal)
	<b>10 Days</b>	99.99%   ≥ Log 4 (Virucidal)
	<b>20 Days</b>	99.99%   ≥ Log 4 (Virucidal)
	<b>30 Days</b>	99.99%   ≥ Log 4 (Virucidal)

**5. Conclusions:** The product analysed showed virucidal activity:

- Considering that there was inactivation of 99.99% of viral contamination, it can be concluded that the product “ZOONO Z71 Microbe Shield” was effective, and therefore, we recommend its use as a virucidal agent for viruses of the Coronavirus group at ALL times tested.
- The “Long Lasting” test inactivated 99.99% of the virus of the Coronavirus group tested in the times of 5, 10, 20 and 30 days.

**Ends**



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 ( $2 \times 10^5$  células/mL) em meio DMEM, sem vírus e sem amostra teste;
- Controle de vírus: Titulação de vírus ( $10^1$  a  $10^{12}$ ) 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-in-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.