

Título do Estudo

Eficácia Microbiológica pelo Ensaio Quantitativo de Suspensão para Avaliação da Atividade Fungicida ou Levuricida de Desinfetantes Químicos e Anti-sépticos Utilizados na Área Médica pelo Método de Ensaio e Prescrição (Fase 2, Etapa 1) no item de teste Ciclo Germ 5G frente à *Candida albicans*.

**Metodologia de Referência**

EN 13624:2013. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical área – Test method and requirements (phase 2, step 1). European Standard, British Standard, (BSI), 2013. 54p.

Diretora de Estudo

Mariana Ayres Ferraz da Silva

Estudo Concluído

13/Mai/2019

Laboratório Executor

BIOAGRI Laboratórios Ltda.
Rod. SP 127, km 24
Telefone: +55 (19) 3429-7700
Caixa Postal 573 – CEP: 13412-000
Piracicaba/SP - Brasil
www.merieuxnutrisciences.com
E-mail: mariana.ferraz@mxns.com

Patrocinador

Ciclo Farma Indústria Química Eireli
Rua Benedito José de Carvalho Ramos, 150 - Serrana - São Paulo - 14150-000

Estudo #

2922.159.011.18

Declaração de Acompanhamento do Estudo

O estudo descrito neste Relatório Final foi executado sob minha supervisão, seguindo o plano de estudo e os procedimentos descritos no EN 13624:2013. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical área – Test method and requirements (phase 2, step 1). European Standard, British Standard, (BSI), 2013. 54p, e de acordo com os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL) da Norma N° NIT-DICLA-035-(Rev. 03). PRINCÍPIOS DAS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO – BPL. CGCRE – Coordenação Geral de Acreditação – Nov/2018 e da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Number 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice. (as revised in 1997). ENV/MC/CHEM(98)17.

O resultado do estudo refere-se somente ao item de teste estudado e se aplica a amostra conforme recebida e a qual foi enviada pelo patrocinador.

Este relatório representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos.

Plano de estudo, um relatório final original e todos os dados, registros gerados e observações referentes a este estudo, serão mantidos nos arquivos da BIOAGRI Laboratórios Ltda. por um período de 06 anos.

Item de teste, item de referência e alíquotas do sistema teste serão mantidas nos arquivos da BIOAGRI Laboratórios Ltda., por tempo adequado a sua natureza e conservação e após este período serão descartados profissionalmente ou encaminhadas ao patrocinador.


Mariana Ayres Ferraz da Silva
Diretora de Estudo
Fone: (19) 3429-7700

13 / mai / 2019
dd mmm aaaa

Estudo #: 2922.159.011.18

Título do Estudo: Eficácia Microbiológica pelo Ensaio Quantitativo de Suspensão para Avaliação da Atividade Fungicida ou Levuricida de Desinfetantes Químicos e Anti-sépticos Utilizados na Área Médica pelo Método de Ensaio e Prescrição (Fase 2, Etapa 1) no item de Teste Ciclo Germ 5G frente à *Candida albicans*.

Declaração da Garantia da Qualidade

O relatório foi inspecionado pela Garantia da Qualidade (GQ) – BIOAGRI. As datas e fases de inspeção no estudo estão relacionadas abaixo:

Inspeção		Data das Informações Relatadas	
Data	Fase	Diretor de Estudo	Gerente da Instalação de Teste
17/Abr/2019	Plano de Estudo	17/Abr/2019	17/Abr/2019
12/Nov/2018	Estudos de curta duração: RAS 0190/18 (Preparo do item de teste e aplicação experimental, avaliação dos resultados)	14/Nov/2018	16/Nov/2018
13/Mai/2019	Relatório Final	13/Mai/2019	13/Mai/2019

A inspeção de processo mais recente da fase laboratorial desta classe de estudo foi realizada entre os dias 08 e 12 de Novembro de 2018. Esta inspeção está registrada no documento interno **RAS 0190/18**. As datas onde o Diretor de Estudo e Gerente da Instalação de Teste foram informados estão descritas no quadro acima.

Os resultados e observações apresentados neste Relatório Final são uma descrição precisa dos dados brutos gerados durante a condução do estudo. Todos os dados brutos gerados durante a condução do estudo foram inspecionados, bem como emendas e desvios aos planos de estudo.



Ariane Faé Leite

Insp. da Garantia da Qualidade

Garantia da Qualidade
Fone: (19) 3429-7701

13 Mai/2019
dd mmm aaaa

Índice

Declaração de Acompanhamento do Estudo.....	2
Declaração da Garantia da Qualidade.....	3
Índice.....	4
Resumo.....	5
1. Informações Gerais.....	5
2. Equipe Técnica.....	5
3. Objetivo.....	5
4. Material e Métodos.....	5
4.1 Informações Referentes ao item de Teste.....	5
4.2 Equipamentos.....	6
4.3 Material, Reagentes e/ou Solventes.....	6
4.4 Sistema-Teste.....	6
4.4.1 Descrição.....	6
4.4.2 Justificativa para a seleção do sistema-teste.....	7
4.5 Procedimento Experimental.....	7
4.5.1 Substâncias Interferentes.....	7
4.5.2 Preparo do Microrganismo.....	7
4.5.3 Rota de exposição.....	7
4.5.4 Justificativa rota de exposição.....	7
4.5.5 Preparo da Suspensão Teste (N).....	7
4.5.6 Preparo da Suspensão de Validação (Nv).....	8
4.5.7 Controle de Qualidade.....	8
4.6 Cálculos.....	9
5. Desvios ao Plano de Estudo.....	12
5.1 Informação do Plano de Estudo.....	12
5.2 Desvio.....	12
5.3 Razão.....	12
5.4 Impacto.....	12
6. Resultados.....	12
7. Conclusão.....	13
8. Referências Bibliográficas.....	13

TABELA

Tabela 1: Resultados da viabilidade da suspensão inicial e controles de validações do ensaio - microrganismos teste <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	12
Tabela 2: Resultados analíticos na concentração (Puro ou Diluição ex: 20mL por litro) (diluição de uso solicitada) <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	12
Tabela 3: Redução em ufc/mL, percentual e logarítmica na diluição de uso solicitada para tempos de contato avaliados <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	12

ANEXO

Anexo 1 – Certificado de Reconhecimento da Conformidade aos Princípios das BPL.....	14
Anexo 2 – Boletim de Análise LFQ.....	15

Resumo

O estudo Ensaio quantitativo de suspensão para avaliação da atividade fungicida ou levuricida do item de teste Ciclo Germ 5G utilizados na área médica foi desenvolvido utilizando-se do microrganismo *Candida albicans* oriundo do banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Geral - LMG – Bioagri Laboratórios Ltda., sendo a sua exposição feita através de suspensão. O mesmo foi realizado com o item de teste puro, na presença de soro de cavalo, pelo tempo de contato 30 minutos, conforme solicitado pelo patrocinador, registrando o seu resultado após 48 horas para a levedura. Para que o item de teste seja considerado satisfatório nas condições do ensaio validado, ele deve alcançar uma redução de 4 logs, dentro do tempo de contato especificado pelo patrocinador e na condições validadas do ensaio. O resultado foi considerado satisfatório frente ao microrganismo testado.

1. Informações Gerais

Data do Início do Estudo:	18/Abr/2019
Data do Início do Experimento:	22/Abr/2019
Data do Término do Experimento:	26/Abr/2019
Data do Término do Estudo:	13/Mai/2019

2. Equipe Técnica

Diretor de Estudo:	Mariana Ayres Ferraz da Silva
Pesquisadora:	Marina Gumiere
Técnico de Laboratório:	Michele Patrícia Barbosa
Assistente de Laboratório:	Jéssica Poslednik

3. Objetivo

O objetivo deste estudo foi valiar a eficácia microbiológica pelo ensaio quantitativo de suspensão para avaliação da atividade fungicida ou levuricida de desinfetantes químicos e antisépticos utilizados na área médica pelo método de ensaio e prescrição no item de teste Ciclo Germ 5G frente à *Candida albicans*.

4. Material e Métodos

4.1 Informações Referentes ao item de Teste

Item de teste:	Ciclo Germ 5G ⁽¹⁾
Nome Comum do Ingrediente Ativo (i.a.):	Blend: Cloreto de Didecyl Dimethyl Ammonium, n-Alquil Dimethyl Benzyl Ammonium Chloride ⁽¹⁾
Concentração Declarada do i.a. (Patrocinador):	0,6% ⁽¹⁾
Nome Comum do Ingrediente Ativo (i.a.):	Cloridrato de Polyhexametileno Biguanida ⁽¹⁾
Concentração Declarada do i.a. (Patrocinador):	0,26% ⁽¹⁾
Recebida em:	22/Fev/2019
Código Bioagri Laboratórios Ltda.:	SAN-0077-02/19
Concentração Analisada do i.a. (Bioagri Laboratórios Ltda.):	0,650% (m/m) Blend: Cloreto de Didecyl Dimethyl Ammonium, n-Alquil Dimethyl Benzyl Ammonium Chloride 0,282% (m/m) Cloridrato de Polyhexametileno Biguanida ⁽¹⁾
Boletim de Análise LFQ	BA LFQ-0075/19 Blend: Cloreto de Didecyl Dimethyl

Número do lote:	Ammonium, n-Alquil Dimethyl Benzyl
Estado Físico:	Ammonium Chloride
Data de Fabricação:	FQ-LFQ-0027/19 Cloridrato de Polyhexametileno
Data de Validade:	Biguanida
Composição Declarada:	081119PD ⁽¹⁾
	Líquido límpido, incolor ⁽¹⁾
	30/Jan/2019 ⁽¹⁾
	30/Jan/2021 ⁽¹⁾
	Água deionizada 96,04 Q.S.P
	Blend: Cloreto de Didecyl Dimethyl 0,6%
	Ammonium, n-Alquil Dimethyl
	Benzyl Ammonium Chloride, água.
	Cloridrato de Polyhexametileno 0,26%
	Biguanida
	Mistura Mit/Cmit 1:3 0,1%
	Metilisotializolinona/Metilcloro
	Isotializolinona
	Álcool Primário Etoxilado 6,5EO 3,0%
Quantidade de Amostra Recebida:	9154g
Referência:	⁽¹⁾ Informações fornecidas pelo cliente

4.2 Equipamentos

Câmara de fluxo
Câmara Incubadora
Micropipeta
Cronometro digital
Banho Maria
Balança
Termômetro de vidro
Phmetro
Autoclave

4.3 Material, Reagentes e/ou Solventes

MEA
Diluyente
Neutralizador
Água estéril
Substância interferente Condições de sujeira
Tubo estéril
Placas descartáveis
Ponteira estéril
Pipeta estéril

4.4 Sistema-Teste

4.4.1 Descrição

- Espécie: *Candida albicans*
- Referência: ATCC 10231
- Origem: Microbiologics
- Lote: 443-590

4.4.2 Justificativa para a seleção do sistema-teste

O sistema teste, conforme item 4.4.1, foi escolhido por ser espécie recomendada pelas agências regulamentadoras governamentais para os testes de eficácia na Ensaio quantitativo de suspensão para avaliação da atividade fungicida ou levuricida utilizados na área médica pelo método de ensaio e prescrição, conforme metodologia EM 13624.

4.5 Procedimento Experimental

4.5.1 Substâncias Interferentes

- Condições de sujeira (mistura das soluções de albumina bovina – alta concentração com eritrócitos de carneiro): Dissolveu-se 0,30 g de albumina bovina fração V (ideal para propósitos microbiológicos) em 99,70 mL de diluente. Esterilizou-se por filtração em membrana. Preparou-se, pelo menos, 8,0 mL de sangue desfibinado de carneiro estéril ou adquiriu-se de fornecedor comercial. Centrifugaram-se os eritrócitos a 800 g por 10 minutos. Depois se descartou o sobrenadante, ressuspendeu-se os eritrócitos em diluente. Repetiu este procedimento ao menos 3 vezes, até que o sobrenadante ficasse descolorido. Resuspendeu-se 0,30 mL de eritrócitos de carneiro em 99,70 mL de solução de albumina bovina estéril. Para impedir contaminação posterior esta mistura foi dividida em porções necessárias para um dia e deixadas em frascos separados por no máximo 7 dias sob refrigeração a 2°C – 8°C. A concentração final de albumina bovina e eritrócitos de carneiro no procedimento teste foi de 3 g/L e 3 mL/L, respectivamente.

4.5.2 Preparo do Microrganismo

Preparo das suspensões dos organismos teste e soluções do produto em teste *Candida albicans* (levedura): Para preparar a cultura de trabalho de *Candida albicans*, repicou-se a partir do meio de cultura-mãe, estriando sobre MEA inclinado e incubou-se a 30°C ± 1°C por 48 horas. Após período de incubação, preparou-se um segundo repique, da mesma forma a partir do primeiro repique e incubou-se por 48 h a 30°C ± 1°C.

4.5.3 Rota de exposição

O item de teste Ciclo Germ 5G foi aplicado puro, na presença de soro de cavalo, conforme solicitação do patrocinador, sendo sua exposição feita por 30 minutos.

4.5.4 Justificativa rota de exposição

A forma de exposição do microrganismo o item de teste segue a especificação da metodologia de referência: EN 13624.

4.5.5 Preparo da Suspensão Teste (N)

Candida albicans: Em um frasco contendo 10g de pérolas de vidro, transferiu-se 10mL de diluente, transferiu-se a cultura de trabalho. Agitou-se o frasco durante 3 minutos com ajuda de agitador. Aspirou-se com o auxílio de uma micropipeta o conteúdo do frasco, separando a suspensão das pérolas de vidro e transferiu-se para tubo estéril. Ajustou-se o número de células da suspensão a um valor compreendido entre $1,5 \times 10^7$ UFC/mL a $5,0 \times 10^7$ UFC/mL usando diluente e, estimou-se o número de unidades formadoras de colônia através da Escala de MacFarland.

Para contagem, prepararam-se diluições seriadas decimais até 10^{-6} da suspensão de ensaio utilizando o diluente. Misturou-se e tomou-se uma alíquota de 1,0 mL das diluições 10^{-5} e 10^{-6} em duplicata e inoculou-se as placas utilizando a técnica de contagem em profundidade (pourplate), com aproximadamente 20mL de MEA e incubou-se a 30°C ± 1°C.

4.5.6 Preparo da Suspensão de Validação (Nv)

Suspensão de validação (Nv e Nvb): Para preparar a suspensão de validação, diluiu-se a suspensão de ensaio com o diluente para obter uma contagem fúngica entre $3,0 \times 10^2$ UFC/mL e $1,6 \times 10^3$ UFC/mL (aproximadamente um terço ($1 + 3$ da diluição a 10^{-4})).

Para contagem, preparou-se uma diluição de 10^{-1} com o diluente. Misturou-se. Tomou-se uma amostra de 1,0 mL, em duplicata, e inocularam-se as placas utilizando a técnica de contagem em profundidade.

Pipetou-se 1,0 mL de substância interferente em um tubo de ensaio estéril. Adicionou-se 1,0 mL da suspensão teste, preparada conforme item 4.5.3 e iniciou-se o cronometro imediatamente, agitou-se e colocou-se o tubo em Banho-Maria com temperatura controlada a $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 minutos ± 10 s. Ao final do tempo, adicionou-se 8,0 mL da substância teste pura (Gluraton pronto uso) e reiniciou-se o cronometro. Agitou-se e manteve-se o tubo em Banho-Maria controlado a $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ pelo tempo de contato de 15 minutos. Após o término do tempo de contato, agitou-se novamente e tomou-se uma alíquota de 1,0 mL da mistura teste e transferiu-se para um tubo contendo 8,0 mL de neutralizante e 1,0 mL de água. Agitou-se, e manteve-se em Banho-Maria controlado a $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Após a neutralização de 5 minutos ± 10 s, imediatamente tomou-se uma alíquota de 1,0 mL da mistura teste neutralizada "Na" (contendo neutralizante, solução do item de teste, substancia interferente e suspensão teste) em duplicata, e inoculou-se utilizando a técnica de Pour Plate e adicionou-se aproximadamente 20 mL de TSA. As placas foram incubadas a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.

4.5.7 Controle de Qualidade

Condição experimental de controle "A" (validação das condições experimentais ou verificação da ausência de qualquer efeito letal nas condições de teste): Pipetou-se 1,0 mL da substância interferente utilizada no ensaio em um tubo. Adicionou-se 1,0 mL da suspensão de validação e iniciou o cronometro imediatamente, agitou-se. Manteve-se o tubo em Banho-Maria controlado 20°C por 2 minutos ± 10 s. Após esse tempo, adicionou-se 8,0 mL de água estéril e reiniciou-se o cronometro. Agitou-se e manteve-se o tubo em Banho-Maria controlado 20°C pelo tempo de contato de 15 minutos utilizado no ensaio. Após o término do tempo de contato de 10 minutos, agitou-se novamente e tomou-se uma alíquota de 1,0 mL da mistura "A" (contendo substância interferente, suspensão de validação e água estéril) em duplicata e inoculou-se usando a técnica de Pour Plate. Incubou-se por 48 horas a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Controle Neutralizante "B" (Verificação da ausência de toxicidade do neutralizador): Pipetou-se 8,0 mL do neutralizante (utilizado no ensaio) e 1,0 mL de água em um tubo. Adicionou-se 1,0 mL da suspensão de validação e iniciou-se o cronometro, misturou-se e manteve-se o tubo em Banho-Maria controlado a $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 minutos ± 10 s. Após esse tempo agitou-se novamente o tubo e tomou-se uma alíquota de 1,0 mL da mistura "B" (contendo neutralizante, água estéril e suspensão de validação) em duplicata e inoculou-se usando a técnica de Pour Plate. Incubou-se por 48 horas a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Método de validação "C" (Validação da Neutralização por Diluição): Pipetou-se 1,0 mL da substancia interferente utilizada no ensaio em um tubo e adicionou-se 1,0 mL do diluente e iniciou-se o cronometro. Adicionou-se 8,0 mL da substância teste. Agitou-se e manteve-se o tubo em Banho-Maria controlado a 20°C pelo tempo de contato de 15 minutos. Após esse tempo agitou-se o tubo novamente e transferiu-se 1,0 mL da mistura do tubo em outro tubo contendo 8,0 mL de neutralizante. Reiniciou-se o cronometro. Agitou-se e manteve-se o tubo em Banho-Maria controlado a $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 minutos \pm

10 s. Adicionou-se 1,0 mL da suspensão de validação e iniciou-se o cronometro e agitou-se. Manteve-se o tubo novamente em Banho-Maria controlado a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pelo tempo de contato 15 minutos. Após esse tempo agitou-se o tubo e tomou-se uma alíquota de 1,0 mL da mistura "C" (contendo substância interferente, diluente e substância teste) em duplicata e inoculou-se utilizando a técnica de Pour Plate. Incubou-se por 48 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.6 Cálculos

Explicação dos termos e abreviações

- N e N_v representam as suspensões bacterianas, N_a representa a mistura teste bactericida, A (controle das condições experimentais), B (neutralizador e controle de filtração), C (método de validação) representam os diferentes controles das misturas teste.

- N , N_v , N_0 , N_{v0} , N_a e A , B , C representam o número de células contadas por mL nas diferentes misturas teste de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1. N , N_v , N_0 , N_{v0} , N_a e A , B , C – representam o número de células contadas por mL

Parâmetros	Número de células por mL nas suspensões bacterianas	Número de células por mL nas misturas teste no início do tempo de contato (tempo 0)	Número de sobreviventes por mL nas misturas teste no final do tempo de contato t (A) ou de 5 min (B) ou de 30 min (C)
Teste	N Suspensão teste	N_0^a ($N_0 = N/10$)	N_a (antes da neutralização ou filtração)
Controles	N_v Suspensão de validação	N_{v0}^a ($N_{v0} = v/10 = N_v/1000$)	A, B, C

^aNo caso do método modificado – N_0 é $N/100$ e N_{v0} é $N_v/100$

- Valores – V_c : Todos os dados experimentais foram registrados como valores V_c : no método de diluição-neutralização (controles e teste) um valor V_c é o número de UFC contado por 1,0 mL de amostra;

- Cálculos:

O primeiro passo para os cálculos foi a determinação de valores V_c , o segundo os cálculos de N , N_0 , N_a , N_v , N_{v0} , A , B e C . O terceiro passo foi o cálculo de redução R .

Determinação dos valores V_c

Os valores V_c são determinados como se segue: Os limites usuais de contagem de bactérias nas placas de agar estão entre 15 e 300 colônias. Neste padrão Europeu, um desvio de 10% é aceito, desta forma os limites estão entre 14 e 330 colônias. Em membrana os limites acima são diferentes: 150, entretanto com desvios de 10% considera-se 165.

NOTA: O limite menor (14) baseia-se no fato de que a variabilidade aumenta quanto menor a contagem na amostra (1mL e 0,1mL), e, desta forma cálculos subseqüentes podem levar a resultados errados. O menor limite refere-se somente a uma amostra (e não necessariamente a contagem em uma placa), isto é, 2 placas para 1 mL de amostra com 11

UFC e 5 UFC dão um valor V_c de 16. Os limites superiores (165 e 330) refletem a imprecisão de contagem de colônias confluentes e inibição de crescimento devido à depleção de nutriente. Eles refletem somente a contagem de uma placa, e não necessariamente da amostra.

Para contagem da suspensão teste N , da suspensão de validação N_v e N_{vb} e para todas as contagens do método de diluição-neutralização, determinar e registrar os valores V_c de acordo com número de placas usados por 1 mL de amostra.

NOTA: Se mais de 1 placa por 1 mL de amostra tiver sido usado para determinar o valor de V_c , as contagens por placa devem ser registradas.

Se a contagem em uma placa for maior que 165 (ou 330), registrar o número como ">165" (ou "> 330"). Se mais do que uma placa por 1 mL de amostra for usada e, pelo menos, uma delas mostrar um número maior que 165 (ou 330), registrar o valor V_c como "> soma das contagens" (isto é, ">165,132,144", registrar ">441").

Se o valor V_c for menor que 14, registrar o número (mas substituir por "<14" para cálculo posterior no caso de N_a).

Para método da membrana filtrante, as contagens em membranas são os valores V_c . Registrar os valores V_c abaixo do limite menor (14) ou acima do limite superior (165 ou 55) como descrito acima.

Somente valores V_c dentro dos respectivos limites de contagem são considerados para cálculos, exceto no caso de N_a .

- Cálculo de N e N_0

N é o número de células por mL na suspensão teste.

Uma vez que duas diluições da suspensão teste são avaliadas, calcular o número de UFC/mL como média ponderada da contagem empregando a seguinte equação:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1 n_2) 10^{-6}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

c é a soma de valores V_c considerados;

n_1 é o número de valores V_c considerados na diluição mais baixa, isto é 10^{-6} ;

n_2 é o número de valores V_c considerados na diluição mais alta, isto é 10^{-7} ;

10^{-6} é o fator de diluição correspondente a diluição mais baixa.

Arredondar os resultados calculados a partir de duas casas significativas. Para tanto, se o último número estiver abaixo de 5, o número precedente não é modificado; se o último número é maior que 5, o número precedente é aumentado de uma unidade; se o último número é igual a 5, arredondar o precedente ao precedente mais próximo. Proceder desta forma até que dois números significativos sejam obtidos. Como resultado, o número de UFC/mL é expresso pelo número entre 1,0 e 9,9 multiplicado pela potência apropriada de 10.

N_0 é o número de células por mL na mistura teste no início do tempo de contato (tempo zero = 0). É um décimo da média ponderada de N devido a diluição 1:10 pela adição do produto e substância interferente. É 1:100 no caso do método modificado, uma vez que somente 0,1 mL de N é usado no teste.

- Cálculo de N_a

N_a é o número de células por mL na mistura teste no final do tempo de contato e antes da neutralização ou filtração por membrana. É um décimo maior que os valores V_c devido a

adição de neutralizante e água ou de um volume de amostra de 0,1 mL no método da membrana filtrante.

Calcular usando a seguinte fórmula:

$$Na^0, Na^{-1} \text{ e para produtos "handwash"} Na^{-2} = 10c/n \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

c é a soma dos valores V_c considerados;
 n é o número de valores V_c considerados.

Se uma ou ambas as duplicatas de valores V_c estiverem abaixo do menor ou acima do limite superior, expressar os resultados como "menor que" ou "maior que".

- Cálculo de N_v , N_{v0} e N_{vb}

N_v correspondem ao número de células por mL na suspensão de validação. É 10 vezes maior que os valores V_c devido a diluição de 10^{-1} .

N_{v0} é o número de células por mL nas misturas A, B e C no início do tempo de contato (tempo 0). No caso do método diluição-neutralização B é o número de células por mL após como diluição de 100x. N_{v0} é 1/10 da média dos valores V_c de N_v considerando, no caso N_{vb} que é 1/100

Calcular N_v e N_{v0} usando as seguintes fórmulas:

$$N_v = 10c/n \quad \text{Equação 3} \quad N_{v0} = c/n \quad \text{Equação 4} \quad N_{vb} = 1000c/n \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

c é a soma dos valores V_c considerados;
 n é o número de valores V_c considerados.

- Cálculos de A, B e C

A, B e C são o número de sobreviventes nas condições experimentais do controle A, controle do neutralizante B ou controle da filtração e, método de validação C no final do tempo de contato t (A) ou tempos definidos 5 min (B) e 30 min (C). Eles correspondem às médias de valores V_c das misturas A, B e C consideradas.

Calcular A, B e C empregando a seguinte equação:

$$A, B, C = c/n \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

c é a soma dos valores V_c considerados;
 n é o número de valores V_c considerados.

5. Desvios ao Plano de Estudo

5.1 Informação do Plano de Estudo

2. Equipe Técnica

5.2 Desvio

Mudou de:
Diretora de Estudo: Marina Gumiere, Dra

Mudou para:
Diretora de Estudo: Mariana Ayres Ferraz da Silva

5.3 Razão

A diretora de estudo Marina Gumiere foi substituída por Mariana Ayres Ferraz da Silva, devido a reestruturação interna do setor

5.4 Impacto

A colaboradora Mariana Ayres Ferraz da Silva verificou todos os dados brutos incluídos no estudo e se estão de acordo com o plano de estudo, procedimentos operacionais padrão e de acordo com os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL).

As alterações não impactam nos resultados do estudo.

6. Resultados

Tabela 1: Resultados da viabilidade da suspensão inicial e controles de validações do ensaio - microrganismos teste *Candida albicans* ATCC 10231

Média N _o (UFC/mL)	Log N _o	Suspensão de Validação N _{vo} - (UFC/mL)	Controle A (UFC/mL) (30 min)	Controle B (UFC/mL) (5min)	Controle C (UFC/mL) (30 min)
2,26 x 10 ⁶	6,35	1,24 x 10 ²	1,01 x 10 ²	1,20 x 10 ²	1,00 x 10 ²

Tabela 2: Resultados analíticos na concentração (Puro ou Diluição ex: 20mL por litro) (diluição de uso solicitada) *Candida albicans* ATCC 10231.

Diluição	Volume/placa	Resultados para tempo de contato avaliado	
		30 min.	
		Placa 1	Placa 2
10 ¹	1,0 mL	<14	<14
10 ²	1,0 mL	<14	<14
10 ³	1,0 mL	<14	<14
Média - N _a		<1,40 x 10 ²	
Log N _a		<2,14	

Tabela 3: Redução em ufc/mL, percentual e logarítmica na diluição de uso solicitada para tempos de contato avaliados *Candida albicans* ATCC 10231.

Redução	Resultados para tempo de contato avaliado
	30 min.
N ₀ /N _a (ufc/ml)	>1,61 x 10 ⁴
Log R (=LogN ₀ – Log N _a)	>4,21

7. Conclusão

De acordo com a metodologia adotada e nas condições validadas do ensaio, o item de teste foi considerado **satisfatório** frente à cepa testada.

8. Referências Bibliográficas

Norma N° NIT-DICLA-035-(Rev. 03). PRINCÍPIOS DAS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO – BPL. CGCRE – Coordenação Geral de Acreditação – Rio de Janeiro. p 16. Nov/2018.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) SERIES ON PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE AND COMPLIANCE MONITORING. Number 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice. (as revised in 1997). ENV/MC/CHEM(98)17. OLIS : 21-Jan-1998. Dist.: 26-Jan-1998.

EN 13624:2013. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical área – Test method and requirements (phase 2, step 1). European Standard, British Standard, (BSI), 2013. 54p.

ANVISA - Agência. Resolução RDC n.º 35, de 16 de agosto de 2010. Dispões sobre o Regulamento Técnico para Produtos com Ação Antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semi-críticos harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº19/2010 que consta na presente Resolução. Revogam-se as disposições em contrário, em especial a Portaria SVS/MS n. 15, de 23 de agosto de 1988. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação. Diário Oficial da União [da República Federativa do Brasil.].

ANEXO

Anexo 1 – Certificado de Reconhecimento da Conformidade aos Princípios das BPL

República Federativa do Brasil
 Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços
 Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro
Coordenação Geral de Acreditação
Autoridade Brasileira de Monitoramento da Conformidade aos
Princípios das Boas Práticas de Laboratório-BPL

Certificado de Reconhecimento aos Princípios das Boas Práticas de Laboratório

Reconhecimento nº BPL 0002

Reconhecimento Inicial: 25-04-2000

Bioagri Laboratórios Ltda.
 Rodovia SP 127 - Km 24 – Guaimum – Piracicaba - SP

A Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro concede à instalação de teste acima o Reconhecimento da Conformidade aos Princípios das Boas Práticas de Laboratório da OCDE para a condução de estudos não-clínicos de segurança à saúde e ao meio ambiente, incluindo a mesma no Programa Brasileiro de Monitoramento BPL, com a seguinte definição de escopo:

Áreas de Especialidades de Estudos	Categorias de Itens de Teste
Testes Físico-químicos; Estudos Toxicológicos; Estudos de Mutagenicidade; Estudos Ecotoxicológicos com Organismos Aquáticos e Terrestres; Estudos sobre o Comportamento em Água, Solo, Ar e Bioacumulação; Estudos de Resíduos; Estudos de Eficácia.	Agrotóxicos, Seus Componentes e Afins; Produtos Farmacêuticos; Cosméticos; Produtos Veterinários; Saneantes; Produtos Químicos Industriais; Organismos Geneticamente Modificados (OGM); Produtos para a Saúde

Nota: As categorias de itens de teste "agrotóxicos, seus componentes e afins", "produtos farmacêuticos", "cosméticos", "saneantes", "produtos veterinários", "aditivos de ração", "preservativo de madeira", "produtos químicos industriais" e "produtos remediadores" estão contemplados pela adesão plena do Brasil, através da Coordenação Geral de Acreditação-Cgare do Inmetro, aos Atos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OCDE relacionados à Acreditação Mútua de Dados (MAD) de acordo com os Princípios das Boas Práticas de Laboratório-BPL.

Assinado de forma digital por

ALDONEY FREIRE

COSTA-54879590720

Dados: 2018.06.12 16:28:03 -03'00'

Aldoney Freire Costa
Coordenador Geral de Acreditação Substituto

A situação atual do reconhecimento deve ser verificada no endereço eletrônico http://www.inmetro.gov.br/monitoramento_BPL/certificados/

ANEXO
Anexo 2 – Boletim de Análise LFQ



BOLETIM DE ANÁLISE
BA LFQ-0075/19


DADOS REFERENTES AO CLIENTE			
Empresa solicitante: CICLO FARMA INDÚSTRIA QUÍMICA EIRELI			
Endereço: Rua Benedito Jose de Carvalho Ramos, 150, Serrana, SP, CEP: 14150-000			
DADOS REFERENTES À AMOSTRA			
Identificação do item de ensaio*: CICLO GERM 5G			
Código do item de ensaio: SAN-0077-01/19			
Proposta: 00377/19			
Composição*:			
Componentes	Concentrações (%)		
Água Deionizada	96,04 Q.S.P		
Blend: Cloreto de Didecyl Dimethyl Ammonium, N-Alquil Dimethyl Benzyl Ammonium Chloride, Água.	0,6		
Cloridrato de Polyhexametileno Biguanida	0,26		
Mistura Mit/Cmit 1:3 Metilisotiazolinona/Metilcloro Isotiazolinona	0,1		
Alcool Primário Etoxilado 6,5EO	3,0		
Informação Adicional*: Concentração Declarada do Ativo: 0,6%			
Lote*: 081119PD			
Data de Fabricação*: 30/Jan/2019			
Data de Validade*: 30/Jan/2021			
Quantidade recebida da amostra: 235 g			
Data do recebimento do item de ensaio: 04/Fev/2019			
Data de início do ensaio: 13/Fev/2019			
Data do fim do ensaio: 14/Fev/2019			
DADOS DE ANÁLISE			
Parâmetro analisado: Teor de Tensoativo Catiônico			
Metodologia utilizada: POP-M 2121 Rev.00			
* Informação fornecida pelo cliente e/ou empresa solicitante			
RESULTADOS ANALÍTICOS DA AMOSTRA			
Parâmetro	% (m/m) ⁽¹⁾	Desvio Padrão Relativo (DPR, %):	Variação aceitável (%) ⁽²⁾
Concentração Analisada de Tensoativo Catiônico	0,650	0,833	0,51 – 0,69

⁽¹⁾ Peso Molecular utilizado: 360 g.mol⁻¹

⁽²⁾ Considerando RDC nº 59 de 17 de Dezembro de 2010

Obs: Este Boletim de Análise só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.
Este Boletim refere-se somente à amostra analisada, não sendo extensivo a outros lotes e/ou produtos.
Plano de amostragem não realizada pelo Laboratório.
Os documentos e registros gerados neste ensaio serão mantidos no(s) arquivo(s) por um período de seis (6) anos.

Piracicaba, 19 de Fevereiro de 2019.


 Marcio José Liberale
 CRQ nº 04444804 – IV Região
 Responsável Técnico

Página 1 de 1

SQB 0623/H – Registro da Qualidade (Elaborado em 24/Ago/2018)

Bioagri Laboratórios Ltda

Piracicaba - SP / Rodovia SP 127, km 24 / Guamium - Caixa postal: 573 / CEP: 13.412-000

Fone: (19) 3429.7700 / Comercial Fármacos - farmacos.br@mxns.com / Comercial Agro - agro.br@mxns.com | bioagri.com.br | merieuxnutrisciences.com

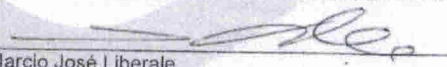

BOLETIM DE ANÁLISE
FQ LFQ-0027/19

DADOS REFERENTES AO CLIENTE			
Empresa solicitante: CICLO FARMA INDÚSTRIA QUÍMICA EIRELI			
Endereço: Rua Benedito Jose de Carvalho Ramos, 150, Serrana, SP, CEP: 14150-000			
DADOS REFERENTES À AMOSTRA			
Identificação do item de ensaio*: CICLO GERM 5G			
Código do item de ensaio: SAN-0077-01/19			
Proposta: 00377/19			
Composição*:			
Componentes	Concentrações (%)		
Água Deionizada	96,04 Q.S.P		
Blend: Cloreto de Didecyl Dimethyl Ammonium, N-Alquil Dimethyl Benzyl Ammonium Chloride, Água	0,6		
Cloridrato de Polyhexametileno Biguanida	0,26		
Mistura Mit/Cmit 1:3 Metilisotiazolínona/Metilcloro Isotiazolínona	0,1		
Álcool Primário Etoxilado 6,5EO	3,0		
Informação Adicional*: Concentração Declarada do Ativo: 0,26%			
Lote*: 081119PD			
Data de Fabricação*: 30/Jan/2019			
Data de Validade*: 30/Jan/2021			
Quantidade recebida da amostra: 235 g			
Data do recebimento do item de ensaio: 04/Fev/2019			
Data de início do ensaio: 14/Fev/2019			
Data do fim do ensaio: 18/Fev/2019			
DADOS DE ANÁLISE			
Parâmetro analisado: Teor do Ingrediente Ativo			
Metodologia utilizada: POP-M 2245 Rev.00			
* Informação fornecida pelo cliente e/ou empresa solicitante			
RESULTADOS ANALÍTICOS DA AMOSTRA			
Parâmetro	% (m/m)	Desvio Padrão Relativo (DPR, %)	Variação aceitável (%) ⁽¹⁾
Concentração Analisada de Biguanida	0,282	4,576	0,221 – 0,299

⁽¹⁾ Considerando RDC nº 59 de 17 de Dezembro de 2010

Obs: Este Boletim de Análise só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.
 Este Boletim refere-se somente à amostra analisada, não sendo extensivo a outros lotes e/ou produtos.
 Plano de amostragem não realizada pelo Laboratório.
 Os documentos e registros gerados neste ensaio serão mantidos no(s) arquivo(s) por um período de seis (6) anos.

Piracicaba, 19 de Fevereiro de 2019.


 Marcio José Libérale
 CRQ nº 04444804 – IV Região
 Responsável Técnico

Página 1 de 1

SQB 0623/H – Registro da Qualidade (Elaborado em 24/Ago/2018)

Bioagri Laboratórios Ltda

Piracicaba - SP / Rodovia SP 127, km 24 / Guamilum - Caixa postal: 573 / CEP: 13.412-000

Fone: (19) 3429 7700 / Comercial FÁRMACOS - farmacos.br@mxns.com / Comercial Agro - agro.br@mxns.com | bioagri.com.br | merieuxnutrisciences.com