

Relatório de Ensaio: RE0155.0034.16  
Avaliação da Atividade tuberculocida pelo método  
confirmatório.



**Título do Ensaio**

Avaliação da Atividade tuberculocida pelo método confirmatório da substância teste PRÁTICO 100 frente ao  
microrganismo *Mycobacterium bovis*

**Responsável Técnica**

Marina Gumiere, Dra.

**Relatório Final**

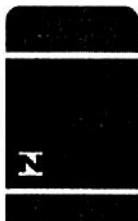
21/10/2016

**Executado por**

BIOAGRI Laboratórios Ltda.  
Rod. SP 127, km 24  
Telefone: +55 (19) 3429-7700 – Fax: +55 (19) 3429-7713  
Caixa Postal 573 – CEP: 13412-000  
Piracicaba/SP – Brasil  
[www.merieuxnutrisciences.com.br](http://www.merieuxnutrisciences.com.br)

**Executado por**

Bioagri Laboratórios Ltda.  
Via Vicente Verdi, nº 835 – Código CHQ 465 com a Rodovia SP 308  
Bela Vista – Distrito Industrial II / Charqueada /SP  
Fone: (19) 3486-0999 - CEP. 13515-000  
Charqueada/SP – Brasil



Relatório de Ensaio: RE0155.0034.16  
Avaliação da Atividade tuberculocida pelo método  
confirmatório.



**Declaração de condução do ensaio**

O ensaio descrito neste relatório de ensaio foi executado sob minha supervisão, de acordo com a metodologia AOAC (Official Methods of Analyses of AOAC International) nº 965.12, rev.19 (2012).

Este relatório refere-se somente a amostra analisada, não sendo extensivo a outros lotes e/ou produtos. Pode ser reproduzido somente por inteiro se sem nenhuma alteração. O Plano de amostragem não foi realizado pela BIOAGRI.

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

Os resultados e observações apresentados neste boletim final são uma descrição precisa dos dados brutos gerados durante a condução do ensaio.

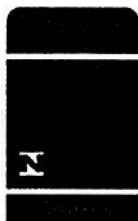
Os documentos e registros gerados neste ensaio serão mantidos no(s) arquivo(s) da Bioagri Laboratórios Ltda por um período de seis (6) anos.

As opiniões e interpretações expressas não fazem parte do escopo da acreditação deste laboratório.

<sup>(1)</sup>As análises foram realizadas na Bioagri Laboratórios – Filial de Charqueada, sob o CRL 0388 e responsável Dra. Marina Gumiere Alves pelo período de 07/07/2016 a 13/07/2016, apenas a conferência dos dados foi feita na Unidade Laboratórios – Piracicaba.

Marina Gumiere, Dra.  
Responsável Técnica

21 / out / 2016  
dd mmm aaaa



Relatório de Ensaio: RE0155.0034.16  
Avaliação da Atividade tuberculocida pelo método  
confirmatório.



**Dados da amostra:**

Substância teste: PRÁTICO 100

Lote (nota de rótulo): 16252001

Data de Fabricação (nota de rótulo): 06/2016

Composição declarada (patrocinador):

Quantidade recebida da amostra: 6486 g

Data de Validade (nota de rótulo): 06/2018

**CONFIDENCIAL**

Código Bioagri: SAN-0770/16

Proposta: 03407/16

Data de recebimento: 23/06/2016

Data do início do teste: 07/07/2016

Data do término do teste: 10/10/2016

Conclusão do relatório: 21/10/2016

Metodologia de referência: AOAC 965.12 (19<sup>th</sup> Edition, 2012).

**1. DEFINIÇÕES**

**Subcultura:** cultivo realizado após o contato do microrganismo teste com a amostra da substância teste para verificação de microrganismos sobreviventes.

**Substância teste:** é qualquer espécie química, biológica ou biotecnológica, formulação ou metabólito, que está sob investigação em um estudo.

**Atividade tuberculocida:** ação letal sobre micobactérias do gênero *Mycobacterium*.

**2. OBJETIVO**

Este estudo teve por objetivo a avaliação confirmatória da atividade tuberculocida da substância teste.

**3. MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi conduzido pela norma AOAC (Official Methods of Analyses of AOAC International) N° 965.12, revisão 19 (2012).

**3.1 Preparo dos cilindros e da suspensão bacteriana**

Os cilindros de porcelana foram lavados com solução de Triton X-100, enxaguados em água de torneira, mergulhados em solução de NaOH por uma noite e, em seguida, lavados em água de torneira e purificada até pH neutro. Um total de 35 cilindros foi esterilizado a 121°C por 20 minutos.

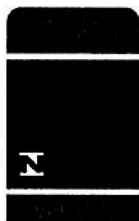
A partir de uma cultura estoque de *Mycobacterium bovis* (INCQS 00062), mantida em Middlebrook 7H9 agar inclinado a 2-5°C, repicou-se em tubos contendo caldo Proskauer-Beck modificado e incubou-se os tubos inoculados por cerca de 21 a 25 dias a 36±1°C. No final desse período, às culturas crescidas adicionou-se 1 mL de solução salina fisiológica com 0,1% de polissorbato 80 e, em erlenmeyer contendo pérolas de vidro, homogeneizou-se e ajustou-se a suspensão para, aproximadamente, 20% de transmitância a 650nm. Essa suspensão bacteriana foi empregada para contaminar os cilindros.

**4. Procedimentos**

Os tratamentos para a realização do estudo foram:

**A.** Contato por 30 minutos, de 10 cilindros de porcelana contaminados com *M. bovis* (INCQS 00062) com a substância teste, na concentração de 10 mL/ 1 Litro, seguido da transferência em soro de cavalo estéril;

**B.** Após passagem pelo soro de cavalo, os cilindros foram transferidos para tubos com 20 mL de caldo Proskauer – Beck modificado; dos mesmos tubos contendo soro de cavalo, alíquotas de 4 mL foram retiradas e colocadas cada 2 mL em dois meios de subcultura: meio Middlebrook 7H9 e meio de Kirchners.



Relatório de Ensaio: RE0155.0034.16  
Avaliação da Atividade tuberculocida pelo método  
confirmatório.



C. Controles positivos: adição de um cilindro contaminado, do mesmo lote utilizado no teste, nos caldos de subcultura específico empregados no teste.

D. Teste de esterilidade: Meios de subcultura: incubação de dois tubos de cada meio de subcultura empregado, sem tratamento, nas condições do teste, incluindo soro de cavalo; Água para diluição utilizada para diluir a substância teste (quando aplicável); lote de ponteiros utilizados e dos cilindros de porcelana estéreis.

E. Resistência do microrganismo frente ao fenol: 1:75 e 1:50, a partir de solução estoque de fenol a 5% (1:20).

Foram transferidos 35 cilindros de porcelana (10 empregados no teste, 5 para controle dos meios de subcultura e 20 para o controle de fenol), estéreis, para 35,0 mL da suspensão bacteriana. Após 15 minutos de contato, os cilindros foram colocados sobre um papel de filtro, em posição vertical, contido em uma placa de Petri, em seguida foram levados para incubação  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 30 minutos, para secagem.

A substância teste foi testada conforme recomendação do fabricante (item 4.A). Adicionou-se, então, um cilindro contaminado e seco, a intervalos de um minuto, a cada um dos 10 tubos contendo a substância teste mantida em banho-maria a  $20^\circ\text{C}$ . Cuidados foram tomados para não tocar as paredes dos tubos com os cilindros e ou gancho de transferência contaminados. Após 30 minutos de contato, os cilindros foram transferidos para tubos contendo 10 mL de soro de cavalo estéril e, em seguida transferidos para caldo Proskauer-Beck modificado; dos tubos contendo soro de cavalo alíquotas de 4 mL foram retiradas e transferidas cada 2 mL para dois meios de subcultura: Middlebrook 7H9 e meio de Kirchners. Os tubos foram agitados e incubados por 60 dias a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . A leitura dos resultados foi realizada através da observação dos tubos, quanto à presença ou ausência de crescimento do microrganismo, comparados ao controle positivo.

Não havendo crescimento após esse período de incubação os tubos são reincubados por mais 30 dias, antes da leitura final do ensaio.

## 5. RESULTADOS E CONCLUSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar se a substância teste pode ser considerada satisfatória como desinfetante tuberculocida através da exposição ao microrganismo específico, segundo o método de avaliação confirmatória, quando a substância teste deve eliminar o microrganismo nos 10 cilindros carreadores utilizados e, não deverá ocorrer crescimento nas alíquotas de 2 mL de soro de cavalo inoculadas nos dois meios de cultura extras.

O estudo foi considerado válido, pois os controles realizados (itens 4.D e E), conduzidos junto ao teste, corresponderam aos resultados esperados.

Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da presença /ausência de crescimento após 90 dias de incubação.

Microrganismo testado (Referência)	Ausência de crescimento			Presença de crescimento		
	P	M	K	P	M	K
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau INCQS 00062	10	10	10	0	0	0

Legenda: P= meio Proskauer Beck modificado (cilindros de porcelana); K = Kirchners (alíquota com soro de cavalo); M = Middlebrook (alíquota com soro de cavalo).

De acordo com a metodologia empregada e pelos resultados obtidos, a substância teste PRÁTICO 100 foi considerada satisfatória quanto a sua atividade tuberculocida frente ao microrganismo testado.