

Título do Estudo

Eficácia Microbiológica pelo Ensaio Quantitativo com Carreadores para Avaliação da Atividade Fungicida ou Levuricida de Desinfetantes Químicos Para Instrumentos Utilizados em Áreas Médicas – Método de Ensaio e Prescrição (Fase 2, Etapa 2) no item de teste Ciclo Germ 5G frente à *Candida albicans*.

**Metodologia de Referência**

EN 14562:2006. Desinfectants et antiseptiques chimiques – Essai quantitative de porte germe pour l'évaluation de l'activité fungicide ou levuricide por instruments utilises em medicine humaine. Méthode d'essai ET prescriptions (phase 2, étape 2). La Plaine Saint Denis Cedex: Norme Européenne: Norme Française; Association Française de Normalisation (AFNOR), 2006. 37p.

Diretora de Estudo

Mariana Ayres Ferraz da Silva

Estudo Concluído

13/Mai/2019

Laboratório Executor

BIOAGRI Laboratórios Ltda.
Rod. SP 127, km 24 + 62 metros
Bairro Guamium – 13412-000
Telefone: +55 (19) 3429-7700
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 #

2922.160.009.18

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 14562:2006. Desinfectants et antiseptiques chimiques – Essai quantitative de porte germe pour l'évaluation de l'activité fungicide ou levuricide por instruments utilises em medicine humaine. Méthode d'essai ET prescriptions (phase 2, étape 2). La Plaine Saint Denis Cedex: Norme Européenne: Norme Française; Association Française de Normalisation (AFNOR), 2006. 37p, 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 6 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 #: 2922.160.009.18

Título do Estudo: Eficácia Microbiológica pelo Ensaio Quantitativo com Carreadores para Avaliação da Atividade Fungicida ou Levuricida de Desinfetantes Químicos Para Instrumentos Utilizados em Áreas Médicas – Método de Ensaio e Prescrição (Fase 2, Etapa 2) no item de Teste Ciclo Germ 5G frente à *Candida albicans*.

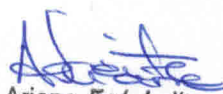
Declaração da Garantia da Qualidade

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 0191/18 (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 de 08 de Novembro de 2018 a 12 de Novembro de 2018. Esta inspeção está registrada no documento interno **RAS 0191/18**. 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


 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.....	7
4.4.1 Descrição.....	7
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 Preparo da Suspensão Teste (N).....	7
4.5.4 Preparo da Suspensão de Validação (N _v).....	8
4.5.5 Rota de exposição.....	8
4.5.6 Justificativa rota de exposição.....	8
4.5.7 Administração da substância teste.....	8
4.5.8 Controle de Qualidade.....	9
4.6 Cálculos.....	10
5. Desvios ao Plano de Estudo.....	13
5.1 Informação do Plano de Estudo.....	13
5.2 Desvio.....	13
5.3 Razão.....	13
5.4 Impacto.....	13
6. Resultados.....	13
7. Conclusão.....	14
8. Referências Bibliográficas.....	14

TABELA

Tabela 1: Resultados da viabilidade da suspensão inicial e controles de validações do ensaio - microrganismos teste <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	13
Tabela 2: Contagem de células viáveis (Na), após exposição ao item de teste no tempo de contato e concentração indicada.....	13

ANEXO

Anexo 1 – Certificado de Reconhecimento da Conformidade aos Princípios das BPL.....	15
Anexo 2 – Boletim de Análise LFQ.....	16

Resumo

O estudo Ensaio quantitativos com carreadores para avaliação da atividade fungicida ou levuricida da para instrumentos utilizados em áreas médicas pelo método de ensaio e prescrição 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 carreador. O mesmo foi realizado com o item de teste Puro, na presença de soro de cavalo, no tempo de contato de 30 minutos, conforme solicitado pelo patrocinador, registrando o seu resultado após 48 horas para *Candida albicans*. Para que o item de teste seja considerado satisfatório nas condições do ensaio validado, ela deve alcançar uma redução de 4 logs no tempo de contato preconizado pelo patrocinador. 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 avaliar a eficácia microbiológica pelo ensaio quantitativo com carreadores para avaliação da atividade fungicida ou levuricida de desinfetantes químicos para instrumentos utilizados em áreas médicas – 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:
Estado Físico:
Data de Fabricação:
Data de Validade:
Composição Declarada:

Ammonium, n-Alquil Dimethyl Benzyl
Ammonium Chloride
FQ-LFQ-0027/19 Cloridrato de Polyhexametileno
Biguanida
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%
Metilisotiazolinona/Metilcloro
Isotiazolinona
Álcool Primário Etoxilado 6,5EO 3,0%
9154g
⁽¹⁾ Informações fornecidas pelo cliente

Quantidade de Amostra Recebida:
Referência:

4.2 Equipamentos

Agitador tubos
Autoclave
Balança semi-analítica
Banho Maria
Câmara de fluxo laminar
Câmara incubadora
Contador de colônias
Cronômetro
Medidor de pH
Micropipetas
Termômetro de vidro

4.3 Material, Reagentes e/ou Solventes

Frasco
Contas de vidro
Tubos de ensaio
Pipetas de vidro
Placas de Petri descartáveis e estéreis
Ponteiras
Alças estéreis
Carreadores de vidro
Neutralizante
MEA

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 nos Ensaios quantitativos com carreadores para avaliação da atividade fungicida ou levuricida da para instrumentos utilizados em áreas médicas pelo método de ensaio e prescrição, conforme metodologia EN 14562.

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 desfibrinado 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 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^{-7} da suspensão de ensaio utilizando o diluente. Misturou-se e tomou-se uma alíquota de 1,0 ml das diluições 10^{-6} e 10^{-7} em duplicata e inoculou-se as placas utilizando a técnica de contagem em

profundidade (pourplate), com aproximadamente 20mL de MEA e incubou-se a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.5.4 Preparo da Suspensão de Validação (N_v)

Suspensão de validação (N_v e N_{vb}): 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.

Inoculação dos carreadores: Pipetou-se 1,0 ml da substância interferente dentro dos tubos. Adicionou-se 9,0 ml da suspensão teste (N). Misturou-se e pipetou-se 0,05 ml desta mistura no “quadrado da inoculação” do carreador e distribuiu-se igualmente dentro do quadrado, isto é com a ponta da pipeta. Deixou-se o inóculo secar na incubadora a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. Usou-se o carreador imediatamente após final do tempo de secagem.

4.5.5 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.

4.5.6 Justificativa rota de exposição

A forma de exposição do microrganismo o item de teste segue a especificação da metodologia de referência: EN 14562:2006.

4.5.7 Administração da substância teste

Candida albicans:

Tomou-se 10 mL de diluente e colocou-se em um frasco de 100 mL com 5 g de contas vidro. Pegou-se a cultura de trabalho e transferiu-se para o diluente. É conveniente colocar as células em suspensão no diluente, imergindo a alça e esfregando-a na parede do frasco para soltar as células. Agitou-se o frasco durante 3 minutos com ajuda de agitador mecânico. Separou-se a suspensão das contas de vidro por aspiração, com ajuda de pipeta, e transferiu-se para outro tubo.

Ajustou-se o número de células em suspensão para $1,5 \times 10^8$ a $5,0 \times 10^8$ UFC / mL com diluente, estimando o número de unidades formadoras de colônias por qualquer meio adequado. Manteve-se esta suspensão teste em banho-maria a $20,0^{\circ}\text{C}$. Utilizou-se dentro de 2 horas.

Para contagem, prepararam-se diluições de 10^{-6} e 10^{-7} da suspensão de ensaio utilizando o diluente. Misturou-se. Tomaram-se uma amostra de 1,0 mL de cada diluição em duplicata e inocularam-se as placas utilizando a técnica de contagem em profundidade (pour plate) ou de superfície. Quando a técnica de contagem em profundidade é utilizada, transferir de cada amostra de 0,5 mL, em placas de Petri separadas (ou seja, dupla = 4 placas), adicionando 20 a 25 mL de MEA fundido e resfriado a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Quando o método de contagem de superfície é utilizado, dividir cada amostra de 1,0 mL em porções de tamanhos aproximados, considerando um número adequado em placas de MEA.

4.5.8 Controle de Qualidade

Suspensão Nv

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.

Condição experimental do Controle "A" (validação de condições experimentais selecionadas ou verificação da ausência de qualquer efeito letal nas condições do teste):

Com ajuda de uma micropipeta, introduziu-se 1,0 ml da substância interferente utilizada no ensaio em um tubo. Acrescentou-se 1,0 ml da suspensão de validação (Nv). Acionou-se o cronômetro, misturou-se e colocou-se o tubo em banho-maria mantido à 20°C durante 2 minutos \pm 10 s. Ao final deste tempo, acrescentou-se 8 ml de água estéril. Acionou-se novamente o cronômetro, misturou-se e colocou-se o tubo em banho mantido à temperatura de 20°C durante o tempo de 15 minutos. Ao final de 15 minutos, misturou-se novamente e retirou-se uma amostra de 1,0 ml desta mistura A, em duplicata, e inocularam as placas com a técnica de pour plate com aproximadamente 20 mL de MEA e incubou-se a 30°C \pm 1°C.

Controle Neutralizante "B" (Verificação da ausência de toxicidade do neutralizador): Com ajuda de uma micropipeta, introduziu-se 8,0 ml do neutralizante utilizado para o ensaio em um tubo. Acrescentou-se 1,0 ml da suspensão de validação. Acionou-se o cronômetro, misturou-se e colocou-se o tubo em banho-maria mantido à 20°C \pm 1°C durante 5 minutos \pm 10 s. No final deste tempo, misturou-se e retirou-se uma amostra de 1,0 ml desta mistura B, em duplicata, e inocularam-se as placas utilizando a técnica de pour plate com aproximadamente 20 ml de MEA e incubou-se a 30°C \pm 1°C.

Método de validação "C" (Validação da Neutralização por Diluição):

Com ajuda de uma micropipeta, introduziu-se 1,0 ml da substância interferente utilizada para o ensaio em um tubo. Acrescentou-se 1,0 ml do diluente depois, acionando o cronômetro, adicionou-se 8,0 ml da solução da substância teste. Misturou-se e colocou-se o tubo em banho-maria mantido à 20°C \pm 1°C durante o tempo de 15 minutos. Ao final de 15 minutos, misturou-se novamente e transferiu-se 1,0 ml da mistura para um tubo contendo 8,0 ml de neutralizante. Acionou-se novamente o cronômetro e colocou-se o tubo em banho Maria mantido a 20°C \pm 1°C durante 5 minutos \pm 10 s. Acrescentou-se 1 ml da suspensão de validação. Acionou-se o cronômetro e misturou-se. Colocou-se o tubo em banho Maria mantido 20°C \pm 1°C durante 30 minutos \pm 1 min. Ao final deste tempo, misturou-se de novo e retirou-se uma amostra de 1,0 ml da mistura "C", em duplicata, e inoculou-se utilizando a técnica pour plate com aproximadamente 20 ml de MEA e incubou-se a 30°C \pm 1°C.

Testemunha da água Nw:

Com uma pipeta, introduziu-se 10 ml de água estéril em um tubo, colocou-se em banho maria mantido a temperatura de 20°C. Mergulhou-se um carreador inoculado e certificou-se que o quadrado inoculado estava completamente coberto pela água estéril. Acionou-se o cronômetro e deixou-o até o tempo de contato de 15 minutos.

Ao final do tempo de 15 minutos, transferiu-se o carreador para um segundo tubo e colocado em banho-maria e mantido a 20°C, contendo 10 ml de neutralizante e cerca de 1 g de contas de vidro. Acionou-se novamente o cronômetro e, misturou-se durante 15s. Ao final de 5 minutos \pm 10 s, misturou-se e tomou-se imediatamente uma amostra de 1,0 ml da mistura Nw, e produziram-se diluições seriadas decimais até 10^{-4} a partir da

mistura de ensaio neutralizado N_w para incubação e contagem. Alíquotou-se 1,0ml de cada diluição e plaqueou-se em duplicata com aproximadamente 20ml de MEA.

Incubação:

Incubaram-se as placas durante 48 horas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (para leveduras).

4.6 Cálculos

Explicação dos termos e abreviações

N e N_v representam as suspensões fúngicas, N_a representa a mistura de ensaio fúngico, N_w representa a mistura de ensaio da testemunha água (testemunha das condições experimentais), B (testemunha de neutralização), C (método de validação) representam as diferentes misturas de ensaio testemunhas.

N , N_v , N_v0 , N_a assim que A , B e C , representam o número de células contadas por ml nas diferentes misturas de ensaio de acordo com a Quadro 1 :

Quadro 1 – Número de células contadas por ml nas diferentes misturas de ensaio

	Número de células por ml nas suspensões fúngicas	Número de células por ml nas misturas de ensaio no início do tempo de contato (instante 0)	Número de sobreviventes por ml nas misturas de ensaio ao final do tempo de contato t (A) ou de 5 min (B) ou de 30 min (C)
Ensaio	N Suspensão do ensaio	$N/20$ (=número teórico) sobre o carreador	N_a , N_w (antes da neutralização)
Testemunhas	N_v Suspensão de validação	N_v0 ($N_v0=N_v/10$)	A , B e C

Valores – V_c : Todos os dados experimentais são registrados como valores V_c ; os valores V_c são os números de ufc contados por 1,0 ml de cada amostra.

Cálculos - O primeiro passo para os cálculos é a determinação de valores V_c , o segundo os cálculos de N , N_a , N_w , N_v , N_v0 , A , B e C . O terceiro passo é o cálculo de redução R .

Determinação dos valores V_c : Os limites habituais para a contagem dos fungos sobre as placas de Agar se situam entre 15 e 150 colônias para os bolores e entre 15 e 300 colônias para as leveduras. Na presente norma europeia uma variação de 10% é aceitável, os limites são então de 14 a 165 para os bolores e de 14 a 330 para as leveduras.

NOTA 1: o limite inferior (14) repousa sobre o fato de que a variabilidade é mais importante que o número obtido em uma amostra de 1 ml que frágil; por consequência, os cálculos posteriores últimos podem dar então resultados errôneos. O limite inferior se aplica unicamente à amostra (e não necessariamente à contagem sobre a placa), por exemplo, três placas por amostra de 1 ml com 3 ufc, 8 ufc e 5 ufc dão um valor V_c de 16. Os limites superiores (165, 330) refletem a imprecisão da contagem das colônias confluentes e da inibição do crescimento devido ao esgotamento de elementos nutritivos. Elas fazem referencia unicamente à contagem sobre a placa e não necessariamente à amostra.

Conforme o número de placas utilizadas por ml de amostra, determinar e registrar os valores V_c ,

NOTA 2: se várias placas por amostra de 1 ml tiverem sido utilizadas para determinar o valor de VC, é conveniente anotar as contagens por placa.

Se a contagem sobre uma placa for superior a 165 (ou a 330), registrar o número no relatório sob a forma ">165" (ou ">330"), registrar este valor Vc sob a forma de "superiora soma das contagens", por exemplo, ">165, 150, 155" registrar ">470".

Se um valor Vc é inferior a 14, registrar o número no relatório (mas colocando "<14" para os cálculos posteriores no caso de Na.

Somente os valores Vc se situando nos limites de contagem respectiva são levadas em consideração para os cálculos, salvo no caso de Na.

Cálculo de N e N_w: N é o número de células por ml na suspensão de ensaio
 A avaliação sobre duas diluições da suspensão de ensaio, calcular o número de ufc/ml como sendo o número médio ponderado com ajuda da formula:

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

Onde:

C é a soma de valores Vc levados em conta;

n₁ é o número de valores Vc levados em conta na diluição mínima (isto é, 10⁻⁶);

n₂ é o número de valores de Vc levados em conta na diluição máxima (isto é, 10⁻⁷);

10⁻⁶ é o fator de diluição correspondendo à 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_w é o número de células por ml na mistura teste no final do tempo de contato (antes da neutralização). É um décimo maior que os valores Vc devido a adição do neutralizante. Calcular o número de ufc/ml como média da contagem obtida na diluição 10⁻⁴ usando a formula:

$$N_w = \frac{c \times 10}{n \times 10^{-4}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

c é a soma de valores Vc considerados;

n é o número de valores Vc considerados;

Cálculo de Na: Na é o número de células por ml na mistura teste no final do tempo de contato e antes da neutralização. É dez vezes maior que os valores Vc devido a adição de neutralizante. Calcular Na (sem diluição), e diluições subsequentes usando a formula:

$$Na \text{ (da diluição zero até } 10^{-3}) = 10 \times c / n \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

c é a soma dos valores Vc considerados;

n é o número de valores Vc 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".

Se um ou duas duplicatas de valores V_c em uma diluição de N_a estiverem dentro dos limites de contagem, usar resultados como N_a .

Usar no máximo 2 diluições subseqüentes para calcular N_a como média ponderada.

Regras para casos especiais:

Se uma ou ambas as duplicatas de valores V_c em três ou mais diluições subseqüentes de N_a (incluindo N_a da diluição 10^0) estão entre os limites de contagem (isto é N_a da diluição 10^{-2} : 17, 23; N_a da diluição de 10^{-1} : 120; 135; N_a da diluição de 10^0 : 308, >330, para *Candida albicans*) todo o teste fica invalidado.

Se duas diluições subseqüentes de N_a mostrar valores V_c em duplicata dentro dos limites de contagem calcular N_a como média ponderada usando a formula abaixo:

$$N_a = \frac{c \times 10}{2,2 \times 10^z} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

c é a soma de valores V_c considerados

z é o fator de diluição correspondendo a menor diluição, isto é N_a da diluição 10^{-2} é a menor diluição em comparação com N_a da diluição 10^{-3}

Se em duas diluições subseqüentes de N_a ambos valores V_c da diluição mais alta estiverem dentro dos limites de contagem e um valor V_c da menor diluição for "maior que", calcular como média ponderada, usando a formula (a).

Cálculo de N_v e N_{v0} : N_v é o número de células por ml na suspensão de validação. É 10 vezes maior que as contagens em termos de valores V_c devido à diluição 10^{-1} considerada.

N_{v0} é o número de células por ml nas misturas A, B ou C ao inicio do tempo de contato (tempo 0). É um décimo da média de valores V_c de N_v considerados. Calcular N_v e N_{v0} usando as formulas (b) e (c)":

$$N_v = \frac{c \times 10}{n} \quad \text{Equação 5}$$

$$N_{v0} = c/n \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

c é a soma dos valores V_c considerados

n é o número de valores V_c considerados

Cálculo de A, B, C (controles e método de validação): A, B e C são números de sobreviventes nas condições experimentais de controle, controle do neutralizante e validação do método no final do tempo t (A) ou de tempos definidos 5 min (B) e 30 min (C). Eles correspondem a média de valores V_c das misturas A, B e C considerados.

$$A, B, C = c/n \quad \text{Equação 7}$$

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

Microrganismos	Suspensão Bacteriana Inicial (N)	Suspensão Bacteriana no carreador (N _w)	Suspensão Bacteriana de Validação (N _{v0})	Número de Células Viáveis (UFC/mL)		
				Controle (A)	Controle (B)	Controle (C)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	$2,16 \times 10^8$	$1,60 \times 10^7$	$8,25 \times 10^1$	$6,60 \times 10^1$	$7,50 \times 10^1$	$6,75 \times 10^1$

Tabela 2: Contagem de células viáveis (N_a), após exposição ao item de teste no tempo de contato e concentração indicada

Microrganismo	Diluição	Volume/placa	Resultados no tempo de contato 30 minutos	
			C1 = Puro	
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10 ⁰	0,5 mL	<14	<14
	10 ¹	0,5 mL	<14	<14
	10 ²	0,5 mL	<14	<14
	10 ³	0,5 mL	<14	<14
Recuperação Média (ufc/mL)- N _a x 10			<1,40 x 10 ²	
Recuperação Média (Log ₁₀ N _a)			<2,14	
Redução = N ₀ / N _a (ufc/mL)			R = >1,14 x 10 ⁵	
Redução em Log ₁₀ R = log ₁₀ N ₀ - log ₁₀ N _a			Log ₁₀ R = >5,06	

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 14562:2006. Desinfectants et antiseptiques chimiques – Essai quantitative de porte germe pour l'évaluation de l'activité fungicide ou levuricide por instruments utilises em medicine humaine. Méthode d'essai ET prescriptions (phase 2, étape 2). La Plaine Saint Denis Cedex: Norme Européenne: Norme Française; Association Française de Normalisation (AFNOR), 2006. 37p.

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 – Guarnium – 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", "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-Cgcre 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 (%)		
Agua 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 Metilsotiazolinona/Metilcloro Isotiazolinona	0,1		
Álcool Primário Etoilado 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 69 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.

Marcelo José Libérale
CRQ nº 04444804 – IV Região
Responsável Técnico

Página 1 de 1

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

Bioagri Laboratórios Ltda

Piracicaba - SP / Rodovia SP 127, km 24 / Guaimum - 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

mf



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 Etoilado 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

