

BioDox™

CONCENTRATED LIQUID STERILIZER



INFORME FINAL DEL ESTUDIO

Título del estudio

Eficacia virucida de una sustancia de prueba para uso en superficies inanimadas, no porosas

Identidad del producto

BIODOX Dióxido de cloro 4000 ppm Números de lote: 000136, 21.05.19.01

Microorganismo de prueba

Coronavirus humano, cepa 229E, ATCC VR-740

Requerimientos de datos

EPA de EE. UU. OCSP 810.2200

Autor

Madhuri Patil, MS

Fecha de finalización del estudio

205692021

Laboratorio de microquímica del centro de pruebas
1304 W. Industrial Blvd. Round Rock, Texas 78681

Patrocinador del estudio BioCentric Solutions
12400 Loma Rica Dr Grass Valley, CA 95945

RESUMEN DEL INFORME FINAL DEL ESTUDIO

Título del estudio: Eficacia virucida de una sustancia de prueba para su uso en superficies inanimadas no porosas

Número de identificación del estudio: GLP2845

Microorganismo de prueba: coronavirus humano, cepa 229E, ATCC VR-740

Célula huésped: células MRC-5 (ATCC CCL-171)

Sustancia de prueba: BODOX Dióxido de cloro 4000 ppm Números de lote: 000136,21.05.19.01

Dilución de la sustancia problema: Se diluyeron 30 ml de sustancia problema en 970 ml de 200 ppm agua del grifo esterilizada en autoclave

Aplicación de la sustancia problema: alícuota de 2,0 ml de la dilución de uso de la sustancia problema líquida aplicado mediante pipeta

Carga orgánica del suelo: No hay suplementos adicionales de carga orgánica del suelo incorporado al inóculo de prueba

Volumen de inóculo: 0,200 ml

Tipo de portador: Placa de Petri de vidrio estéril (100 mm x 15 mm)

Número de transportistas por lat: uno

Tiempo de contacto: 10 minutos

Temperatura de exposición: temperatura ambiente (24,0-24,6 C) y 31% de humedad relativa (HR)

Método de neutralización: Sephadex LH - columna de filtración de 20 geles

Resultados del estudio

<i>Descripción</i>	<i>Resultados del ensayo</i>		<i>Control de recuperación de placas</i>
	<i>Lote: 000136</i>	<i>Lote:21.05.19.01</i>	
<i>Log₁₀ TCID₅₀ / 0.1 ml</i>	<i>< 0.50 log₁₀</i>	<i>0.75 log₁₀</i>	<i>5.05 log₁₀ (TCID₅₀ / Portador)</i>
<i>Log₁₀ TCID₅₀/Portador</i>	<i>< 0.80 log₁₀</i>	<i>1.05 log₁₀</i>	
<i>Log₁₀ Reducción/Portador</i>	<i>> 4.25 log₁₀</i>	<i>4.00 log₁₀</i>	

FECHAS DE ESTUDIO

Fecha de inicio del estudio: 04AGO2021

Fecha/hora de inicio del experimento: 05 AGO2021/1455

Fecha/hora de finalización del experimento: 12AGO2021/0911

Fecha de finalización del estudio: 20SEP2021

SUSTANCIA DE PRUEBA

Nombre: BioDox Dióxido de Cloro 4000 ppm

Lote: 000136

Ingredientes activos (concentración): Dióxido de cloro (0,4%)*

Fecha de fabricación: 10ABR2021

Fecha de recepción: 04MAY2021

Fecha de caducidad: 10NOV2021*

Lote: 21.05.19.01

Ingredientes Activos (concentración): Dióxido de cloro (0,4%)*

Fecha de Fabricación: 19MAY2021

Fecha de Recepción: 01JUN2021

Fecha de Caducidad: 19MAY2022

**Según lo indicado en el protocolo aprobado.*

Forma: Líquido; dilución requerida.

Condiciones de almacenamiento: Temperatura ambiente bajo iluminación fluorescente.

Preparación de la sustancia de prueba: La sustancia de prueba se usó según las indicaciones del patrocinador del estudio. Cada lote de la sustancia de prueba se preparó añadiendo 30 ml de sustancia de prueba a 970 ml de agua del grifo esterilizada en autoclave. La sustancia de prueba preparada parecía estar en solución según lo determinado por observación visual el día de su uso.

El autoclave de 200 ppm - agua del grifo esterilizada (rango de 180 - 210 ppm) utilizado como diluyente de la sustancia de prueba se tituló utilizando una bureta calibrada el día de su uso. El resultado de la valoración fue de 182 ppm.

La sustancia de prueba se equilibró a la temperatura de exposición solicitada antes de su uso.

CAMBIOS DE PROTOCOLO

Enmiendas al protocolo

Enmienda del Protocolo #1

El 20 de septiembre de 2021, el protocolo P3254 aprobado/firmado se modificó para reflejar que no se proporcionarán los certificados de análisis para cada lote de sustancia de prueba.

Todos los parámetros de prueba restantes deben seguirse como se indica en el protocolo.

Desviación(es) del protocolo

No hubo desviaciones del protocolo aprobado durante la realización de este estudio.

OBJETIVO DE LA PRUEBA

El propósito de este estudio fue documentar la eficacia virucida de la sustancia de prueba contra el sistema de prueba (microorganismo) bajo los parámetros de prueba especificados en este protocolo. El protocolo de prueba cumplió con los requisitos y puede presentarse a una o más de las siguientes agencias según lo indicado por el patrocinador del estudio: Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA) y Health Canada.

PRINCIPIO DE PRUEBA

La sustancia de prueba se aplicó a una película de virus que se secó sobre la superficie de un soporte de vidrio (que representa una superficie dura y no porosa) y se mantuvo durante el tiempo de contacto especificado por el patrocinador. Al finalizar el tiempo de contacto, la mezcla de virus y sustancia de prueba recuperada se neutralizó y se ensayó la infectividad de la mezcla. Simultáneamente con la prueba se realizan controles de recuperación de placas, citotoxicidad, neutralización, título de inóculo de virus y cultivos celulares.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Sistema de prueba (microorganismo)

En este estudio se utilizó el coronavirus humano, cepa 229E, ATCC VR-740, recibido originalmente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA. El número de lote de Microchem Laboratory utilizado en las pruebas fue HCoV_21MAR2020C.

Los microorganismos ATCC se utilizan bajo licencia comercial. La marca registrada y el nombre comercial de ATCC, y todos los números de catálogo de ATCC son marcas comerciales de American Type Culture Collection.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA (cont.)

Preparación del virus de prueba.

El virus de prueba fue propagado internamente por el personal del Laboratorio Microchem inoculando el virus en frascos de cultivo celular que contenían la línea celular huésped apropiada e incubándolo en las condiciones apropiadas. Una vez que los frascos de cultivo celular mostraron aproximadamente un 75-100 % de efecto citopático (según lo determinado mediante evaluación microscópica), los frascos se sometieron a ciclos de congelación y descongelación para liberar el virus de las células infectadas. El contenido de los frascos de cultivo celular se recogió y se centrifugó para eliminar los restos celulares. Luego se dividieron alícuotas del virus de prueba y se almacenaron a -70 °C.

El día de la prueba, se retiró del criolmacenamiento la cantidad adecuada de viales de suspensión madre de virus y se descongeló para su uso en el ensayo. El virus de prueba contenía un 2% de carga orgánica del suelo de suero fetal bovino (FBS). El virus de prueba no se ajustó para incorporar ninguna carga de suelo orgánico adicional al inóculo.

Línea celular huésped

En el ensayo se utilizaron células MRC-5 (ATCC CCL-171), recibidas originalmente de la ATCC. Las células fueron subcultivadas por personal del Laboratorio Microchem y se sembraron en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Las placas se incubaron a 36 ± 2 °C en una atmósfera humidificada de 6 ± 1 % de CO₂ hasta que alcanzaron la confluencia deseada requerida para la prueba. El día de su uso, las células se examinaron microscópicamente para verificar la confluencia adecuada y la salud de las células. Se conservó la documentación de pases de cultivos celulares, incluida la fuente del cultivo celular, el número de pases, las densidades de siembra, etc.

Los microorganismos ATCC se utilizan bajo licencia comercial. La marca registrada y el nombre comercial de ATCC y todos los números de catálogo de ATCC son marcas comerciales de American Type Culture Collection.

Medio de prueba

El medio de prueba utilizado en el ensayo fue el medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) suplementado con FBS al 2%, tampón HEPES 40 mM, aminoácidos no esenciales 125 µM, piruvato de sodio 1 mM y antibióticos [solución antibiótica-antimicótica (100 unidades/ ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B)]. Concentraciones basadas en la preparación de 1 L de Medio Esencial Mínimo Eagle's.

Preparación de la sustancia de prueba

La sustancia de prueba se utilizó según las indicaciones del patrocinador del estudio. Cada lote de la sustancia problema se preparó añadiendo 30 ml de sustancia problema a 970 ml de agua del grifo esterilizada en autoclave. La sustancia de prueba preparada parecía estar en solución según lo determinado por observación visual el día de su uso. Las 200 ppm de agua del grifo esterilizada en autoclave (rango de 180-210 ppm) utilizada como diluyente de la sustancia de prueba se tituló utilizando una bureta calibrada el día de su uso. El resultado de la valoración fue de 182 ppm. La sustancia de prueba se equilibró a la temperatura de exposición solicitada antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA (cont.)

Preparación de columnas de filtración en gel Sephadex LH-20

Se utilizaron columnas de filtración en gel Sephadex LH-20 para neutralizar y/o reducir la citotoxicidad de la sustancia de prueba después de la exposición al virus de prueba separando el virus de la sustancia de prueba mediante filtración. El día de la prueba, la suspensión de Sephadex preparada se añadió asépticamente a las unidades de columna preparadas (jeringa estéril) para llenar completamente la columna. Justo antes de la prueba, la jeringa se centrifugó a aproximadamente 100 x g durante 3 a 4 minutos para eliminar el volumen vacío.

Preparación de películas de virus.

El virus de prueba se agitó completamente y se colocó una alícuota de 0,200 ml de virus en la superficie inferior interior de tres placas de Petri de vidrio estériles de 100 mm x 15 mm que sirvieron como soportes de prueba y control de recuperación de la placa. El inóculo se extendió sobre toda el área de los soportes usando una punta de pipeta doblada estéril sin tocar los lados de la placa de Petri. Las películas de virus se secaron en una cámara ambiental durante 20 minutos a 20,0 °C con una humedad relativa del 30 %.

Exposición de películas de virus a la sustancia de prueba

Para cada lote de la sustancia de prueba, se trató una película portadora de virus seca con una alícuota de 2,0 ml de la dilución de uso de la sustancia de prueba líquida siguiendo las instrucciones del patrocinador del estudio. Los soportes se rotaron suavemente para asegurar una cobertura completa de la sustancia de prueba en la totalidad de cada superficie de prueba. Los portadores se mantuvieron a la temperatura de exposición solicitada por el patrocinador de 24,0-24,6 °C con una humedad relativa del 31% durante el tiempo de contacto solicitado de 10 minutos. Justo antes de completar el tiempo de contacto, se usó un raspador de células estéril para resuspender cada película viral y la solución se transfirió inmediatamente a una columna de filtración en gel. Se utilizó el émbolo de la jeringa para pasar el contenido del soporte de prueba resuspendido a través de la columna. Se prepararon diluciones en serie de 10 veces (por ejemplo, 0,1 ml de filtrado + 0,9 ml de medio de prueba) del filtrado (dilución 10) hasta la dilución apropiada.

CONTROLES DEL ESTUDIO

Control de recuperación de placas

Se preparó una película de control de recuperación de placa para determinar el título inicial de virus seco. La película de control de recuperación de placas se generó como se describe anteriormente en "Preparación de películas de virus". Después del secado, se superpuso una alícuota de 2,0 ml de medio de prueba sobre la película de control. Luego se giró suavemente el soporte para asegurar una cobertura completa de la solución sobre toda la superficie. El portador se mantuvo cubierto a la temperatura de exposición solicitada por el Patrocinador de 24,1-24,4 °C con una humedad relativa del 31% durante el tiempo de contacto solicitado de 10 minutos. Justo antes de completar el tiempo de contacto del estudio, se usó un raspador de células estéril para resuspender cada película viral y la solución se transfirió inmediatamente a una columna de filtración en gel. El contenido resuspendido del vehículo se pasó a través de la columna de filtración en gel usando el émbolo de la jeringa. Se prepararon diluciones en serie de 10 veces (por ejemplo, 0,1 ml de filtrado + 0,9 ml de medio de prueba) de la dilución de filtrado (10)) hasta la dilución apropiada. Los resultados del control de recuperación de la placa se evaluaron microscópicamente al mismo tiempo que los resultados de la sustancia de prueba y todos los demás controles. Los resultados de este control se utilizaron para calcular la reducción logarítmica del título viral tras la exposición de la sustancia de prueba al virus de prueba.

CONTROLES DEL ESTUDIO (cont.)

Control de citotoxicidad

Para cada lote de sustancia de prueba ensayada, se trató un soporte de placa de Petri de vidrio estéril (que no contenía película de virus) de la misma manera que los soportes de prueba. Se añadió una alícuota de 2,0 ml de la dilución de uso de la sustancia de prueba a la placa de Petri estéril y se mantuvo cubierta durante el tiempo de contacto solicitado por el patrocinador de 10 minutos a la temperatura de exposición solicitada de 23,9-24,5 °C en una temperatura relativa. Humedad del 30-31%. Justo antes de completar el tiempo de contacto del estudio, se raspó el portador usando un raspador de células estéril y la suspensión de la sustancia de prueba se transfirió rápidamente a una columna de filtración en gel. La sustancia de prueba resuspendida se pasó a través de la columna de filtración en gel usando el émbolo de la jeringa. Se prepararon diluciones en serie de 10 veces (por ejemplo, 0,1 ml de filtrado + 0,9 ml de medio de prueba) del filtrado (dilución 10) hasta la dilución apropiada. Los resultados del control de citotoxicidad se evaluaron microscópicamente al mismo tiempo que los resultados de la sustancia de prueba y todos los demás controles.

Control de neutralización de la sustancia de prueba

Para cada lote de sustancia de prueba ensayado, se trató un soporte de placa de Petri de vidrio estéril (que no contenía película de virus) de la misma manera que los soportes de prueba. Se añadió una alícuota de 2,0 ml de la dilución de uso de la sustancia de ensayo a la placa de Petri estéril. Se raspó el vehículo usando un raspador de células estéril y la suspensión de la sustancia de prueba se transfirió rápidamente a una columna de filtración en gel. La sustancia de prueba resuspendida se pasó a través de la columna de filtración en gel usando el émbolo de la jeringa. Se pasó una alícuota de 2,0 ml de medio de prueba, u otro medio según corresponda, a través de la columna de filtración en gel de la misma manera que la prueba para que sirviera como sustancia de control de neutralización, para determinar si se recuperaron niveles comparables de unidades virales infecciosas del control, y el filtrado de la sustancia problema neutralizada. El filtrado se considera la dilución 10¹.

Para verificar que la sustancia de prueba había sido neutralizada, el filtrado (sustancia de prueba neutralizada), y la sustancia de control de neutralización, se expusieron cada uno a una alícuota de 0,1 ml de unidades infecciosas de título bajo (por ejemplo, 1000-5000) del sistema de prueba y se mantuvieron durante al menos 10 minutos a una temperatura de exposición de 24,1-24,7 °C y una humedad relativa del 30-31%. Se prepararon diluciones seriadas de 10 veces utilizando medios de prueba añadiendo 0,100 ml de filtrado a 0,900 ml de medio de prueba. Los resultados del control de neutralización se evaluaron microscópicamente al mismo tiempo que los resultados de la sustancia de prueba y todos los demás controles.

Control de cultivo celular

Para garantizar que las células huésped no estuvieran contaminadas con bacterias, hongos o virus citopatógenos, y para confirmar la viabilidad de las células durante el período de incubación del ensayo, al menos cuatro monocapas celulares se dejaron sin tratar y se examinaron microscópicamente periódicamente durante toda el período de incubación. Cualquier contaminación o degeneración obvia en dichas monocapas podría invalidar el ensayo de eficacia virucida.

Control de títulos de inóculo de virus

Para confirmar que las monocapas de la línea celular huésped eran susceptibles al virus de prueba, y para confirmar el título del inóculo viral, se diluyó en serie una alícuota del inóculo del virus de prueba (10 veces) en medio de prueba. Este control también se utilizó para confirmar el nivel de virus inoculado en el Control de Neutralización.

CONTROLES DEL ESTUDIO (cont.)

Ensayo de infectividad

Se inoculó una alícuota de 0,1 ml de todas las diluciones de prueba y de control en los cultivos de células huésped (que contenían medio de prueba) por cuadruplicado. Los pocillos de control del cultivo celular contenían sólo medio de prueba. Las placas de ensayo se incubaron a 33 ± 2 °C en una atmósfera humidificada de $6 \pm 1\%$ de CO₂ durante aproximadamente 7 días. Las placas de ensayo se examinaron microscópicamente periódicamente durante el período de incubación y cualquier cambio en las monocapas, incluidos los efectos citopáticos virales (CPE), la citotoxicidad o la contaminación, se documentó claramente en los datos sin procesar. Los datos obtenidos de la lectura final están documentados en la sección Resultados de este informe.

Tabla 1: Control de recuperación de placas y resultados de las pruebas

Control celular	Control de recuperación	Resultados de la prueba Lote: 000136	Lote: 21.05.19.01
	0 0 0 0	N/A	N/A
Dilución	10⁻¹	0 0 0 0	0 0 + 0
	10⁻²	0 0 0 0	0 0 0 0
	10⁻³	0 0 0 0	0 0 0 0
	10⁻⁴	0 0 0 0	0 0 0 0
	10⁻⁵	0 0 + 0	0 0 0 0
	10⁻⁶	0 0 0 0	0 0 0 0
	10⁻⁷	0 0 0 0	N/A
TCID₅₀ /0.1ml	4.75 log₁₀	< 0.50 log₁₀	0.75 log₁₀
TCID₅₀ / Carrier	5.05 log₁₀	< 0.80 log₁₀	1.05 log₁₀
Reducción de Log/Portador	N/A	> 4.25 log₁₀	4.00 log₁₀

Tabla 2: Resultados del control de citotoxicidad

		Control de citotoxicidad	
		Lote: 000136	Lote: 21.05.19.01
Dilución	10⁻¹	0 0 0 0	0 0 0 0
	10⁻²	0 0 0 0	0 0 0 0
	10⁻³	0 0 0 0	0 0 0 0
		< 0.50 log₁₀	< 0.50 log₁₀

Tabla 3: Resultados del control de neutralización de la sustancia de prueba

		<i>Control de neutralización</i>		
		<i>Lote: 000136</i>	<i>Lote: 21.05.19.01</i>	<i>Sustancia de control</i>
<i>Dilución</i>	10^{-1}	++++	++++	++++
	10^{-2}	++++	++++	++++
	10^{-3}	++++	++++	++++
	10^{-4}	++++	++++	++++
	10^{-5}	++++	++++	++++
	10^{-6}	0000	0 0 + 0	+ 0 0 0
TCID ₅₀ /0.1ml		5.50 log ₁₀	5.75 log ₁₀	5.75 log ₁₀

Tabla 4: Control del título de inóculo de virus

		<i>Control de títulos de inóculo de virus</i>
<i>Dilución</i>	10^{-1}	++++
	10^{-2}	++++
	10^{-3}	++++
	10^{-4}	0+++
	10^{-5}	+000
	10^{-6}	0000
TCID ₅₀ /0.1ml		5.50 log ₁₀

CONCLUSIÓN DEL ESTUDIO

El propósito del estudio fue determinar la eficacia virucida del dióxido de cloro BioDox 4000 ppm (lotes: 000136 y 21.05.19.01) contra el coronavirus humano, cepa 229E, ATCC VR-740, sin suplementación adicional de carga orgánica del suelo incorporada a la prueba inóculo, en un tiempo de contacto de 10 minutos, y temperatura de exposición de temperatura ambiente.

El control de recuperación en placa demostró un título viral de 4,75 log₁₀ TCID₅₀ por 0,1 ml y 5,05 log₁₀ TCID₅₀ por portador, satisfaciendo así los criterios de aceptación del estudio de la EPA de EE. UU. de un mínimo de 4,80 log₁₀ unidades infectivas por portador de control.

Teniendo en cuenta los resultados del control de citotoxicidad y neutralización, la sustancia de prueba evaluada, BioDox Dióxido de Cloro 4000 ppm, demostró una reducción > 4,25 log₁₀ en el título viral para el lote: 000136 y una reducción de 4,00 log₁₀ en el título viral para el lote: 21.05.19.01.

No se detectó citotoxicidad de la sustancia de prueba en ninguno de los lotes de la sustancia de prueba analizada, <0,50 log₁₀ TCD₅₀ por 0,1 ml para el lote: 000136 y <0,5 log₁₀ TCD₅₀ por 0,1 ml para el lote: 21.05.19.01.

La sustancia de prueba y la sustancia de control demostraron niveles comparables de unidades infectivas recuperadas en el Control de Neutralización.

No se observó contaminación microbiana de ningún cultivo de células huésped durante el transcurso del estudio.

El dióxido de cloro BioDox 4000 ppm (lotes: 000136 y 21.05.19.01) cumplió con las pautas de rendimiento de productos de la EPA de EE. UU. para desinfectantes para uso en superficies duras descritas en la norma OCSP 810.2200 de la EPA de EE. UU. y los criterios de éxito detallados en el protocolo aprobado cuando se probó contra el coronavirus humano, 229E. cepa, ATCC VR-740 en un tiempo de contacto de 10 minutos.

Este estudio se llevó a cabo de conformidad con el protocolo aprobado. Todos los controles experimentales cumplieron con los criterios de aceptación establecidos a menos que se indique lo contrario en la sección Cambios de protocolo de este informe.

No hubo circunstancias que pudieran haber afectado la calidad o la integridad de los datos.

REFERENCIAS

- *Libro anual de normas ASTM, Método de prueba estándar para evaluar la actividad virucida de productos químicos destinados a la desinfección de superficies ambientales inanimadas y no porosas, Designación E1053, edición actual. Sociedad Estadounidense de Pruebas de Materiales, 100 Barr Harbor Drive, West Conshohocken, PA 19428.*
- *Libro anual de normas ASTM, Práctica estándar para el uso de columnas de filtración en gel para la reducción y neutralización de la citotoxicidad, Designación E1482, edición actual. Sociedad Estadounidense de Pruebas de Materiales, 100 Barr Harbor Drive, West Conshohocken, PA 19428.*
- *Métodos oficiales de análisis de la AOAC Internacional, Capítulo 6, Desinfectantes, Método oficial 960.09 Acción desinfectante germicida y detergente de los desinfectantes. Revisado en 2013.*
- *Agencia de Protección Ambiental de EE. UU., Oficina de Seguridad Química y Prevención de la Contaminación, Directrices de prueba de rendimiento del producto OCSPP 810.2000: Consideraciones generales para probar pesticidas antimicrobianos de salud pública - Guía para pruebas de eficacia. Febrero de 2018.*
- *Agencia de Protección Ambiental de EE. UU., Oficina de Seguridad Química y Prevención de la Contaminación, Pautas de prueba de rendimiento del producto OCSPP 810.2200: Desinfectantes para uso en superficies ambientales - Guía para pruebas de eficacia. Febrero de 2018.*
- *Agencia de Protección Ambiental de EE. UU., Preguntas frecuentes para la serie 810 de 2018: Directrices de prueba de rendimiento del producto: Directrices de prueba de eficacia antimicrobiana. 2019.*
- *Documento de orientación - Medicamentos desinfectantes. Salud Canadá. Abril 2020.*
- *Documento de orientación: Requisito de seguridad y eficacia para medicamentos desinfectantes de superficies duras. Salud Canadá. Abril 2020.*

