

## REPORT FINALE

### Test dell'efficacia virucida del dispositivo STR-Solution contro il Coronavirus della Sindrome Respiratoria del Medio Oriente (MERS-CoV)

**Sostanza testata:**

STR-Solution

**Organismo testato:**

Coronavirus che produce la sindrome respiratoria del Medio Oriente, Risorse BEI

**Autore:**

Cory Chiossone

**Data completamento studio:**

30/06/2016

**Laboratorio d'esecuzione:**

MicroBioTest, Divisione dei Laboratori Microbac, Inc.

105 Carpenter Drive Sterling, VA 20164

**Numero Identificativo Del Progetto di Laboratorio:**

922-101

**Numero Identificativo Protocollo:**

FOR.1a.04.28.16

**Sponsor:**

Forward Medi Co, Ltd.,

HangGang Xi Tower B-dong,

Room 804, 1498 Gayang-dong,

Gangseo-Gu, Seoul, Korea

## SOMMARIO

REPORT FINALE – COPERTINA.....	1
SOMMARIO.....	2
DICHIARAZIONE CONFORMITÀ.....	3
DICHIARAZIONE DELL'UNITÀ ASSICURAZIONE QUALITÀ.....	3
SINTESI ESPERIMENTO.....	4
CONDIZIONI SPERIMENTALI.....	5-6
DATE E LUOGHI DELLO STUDIO.....	6
REGISTRAZIONI DA CONSERVARE.....	6
CALCOLO DEL TITOLO VIRALE .....	7
RISULTATI.....	7-9
CONCLUSIONI.....	10
APPENDICE.....	

## DICHIARAZIONE CONFORMITÀ

Lo studio incontra i requisiti di 21 CFR § 58 con le seguenti eccezioni:

- informazioni sull'identità, forza, purezza, stabilità, uniformità, e dose della soluzione in analisi della sostanza testata risiedono presso lo sponsor dello studio.

Il seguente personale tecnico ha partecipato allo studio:

Cory Chiossone, Jessica Wagner, Semhar Fanuel

Direttore dello studio: MicroBio Test

  
Cory Chiossone  
Date 6/30/16

## DICHIARAZIONE DELL'UNITÀ ASSICURAZIONE QUALITÀ

Titolo dello studio: Test dell'efficacia virucida del dispositivo STR-Solution contro il MERS-CoV

L'Unità di Assicurazione della Qualità della MicroBioTest ha ispezionato il Numero di Progetto 922

101 in accordo ai regolamenti di Buona Pratica in Laboratorio (21 CFR § 58).

Sono elencate di seguito le date in cui le indagini sono state eseguite e quelle in cui i risultati sono stati riportati alla gestione e al direttore dello studio.

FASE	DATA	DATA COMUNICAZIONE	DATA COMUNICAZIONE
ISPEZIONATA	DELL'ISPEZIONE	AL DIRETTORE DELLO STUDIO	ALLA GESTIONE
Protocollo	26/05/16	27/05/16	27/05/16
In corso	27/05/16	27/05/16	27/05/16
Report Finale	29/06/16	29/06/16	29/06/16

  
Jeanne M. Anderegg, RQAP-GLP  
Quality Assurance Manager  
Date 06-30-2016

## **SINTESI ESPERIMENTO**

**Titolo:** Test dell'efficacia virucida del dispositivo STR-Solution contro il MERS-CoV

**Progetto di studio:** Questo studio è stato eseguito secondo il protocollo firmato e i documenti del progetto rilasciati dal Direttore di Studio (Vedi Appendice).

**Sostanze testate apportate dallo sponsor dello studio:**

- STR-Solution, ricevuto alla MicroBioTest il 13/05/16, e assegnato col numero DS. G282

**Sponsor:**

Forward Medi Co., Ltd.  
HangGang Xi Tower B-dong  
Room 804, 1498 Gayang-dong  
Gangseo-Gu, Seoul, Korea

## CONDIZIONI SPERIMENTALI

### **Virus sotto analisi:**

Coronavirus della Sindrome Respiratoria del Medio Oriente (MERS-CoV), Risorse BEI

### **Ospite:**

Cellule Vero E6, ATCC CRL-1586

### **Ingredienti Attivi:**

PCO Avanzato

### **Mezzo di diluizione/Neutralizzatore:**

Mezzo Essenziale Minimo (MEM) + 2% Siero Bovino Fetale (FBS)

### **Tempo di Contatto:**

1 ora, 2 ore, 4 ore

### **Temperatura di Contatto:**

Ambiente  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  (Effettiva:  $20^\circ\text{C}$ )

### **Inoculazione su supporto e tempo di essiccazione:**

Un supporto in vetro è stato inoculato con 0.2ml di virus in un'area di  $4 \text{ in}^2$  e asciugato per 18 minuti a  $20^\circ\text{C}$ .

### **Distanza esposizione:**

approssimativamente 5 cm

## **CONDIZIONI TEST (continua)**

Preparazione dispositivo sotto esame:

Il dispositivo sotto esame è stato assemblato e utilizzato in sicurezza secondo le istruzioni del produttore o dello Sponsor

Carico organico:

Siero 5%

Terreni e reagenti:

MEM + 2% FBS

MEM + 10% FBS

FBS

MEM

## **DATE E LUOGHI DELLO STUDIO**

Le fasi di laboratorio del presente test sono state eseguite presso la MicroBioTest, 105 Carpenter Drive, Sterling, VA 20164, dal 26/05/16 al 03/06/16. Il direttore dello studio ha firmato il protocollo il 26/05/16. La data di completamento dello studio corrisponde alla data in cui il direttore dello studio ha firmato il report finale. Le date dei test individuali sono come segue:

- Inizio del test alle 12:40 pm del 26/05/16, conclusione del test alle 4:40 pm del 03/06/16

Qualunque cambiamento o revisione del protocollo è stato documentato, firmato dal direttore dello studio, datato e conservato con il protocollo.

## **REGISTRAZIONI DA CONSERVARE**

Tutti i dati sperimentali, i protocolli, le modifiche ai protocolli, le registrazioni delle sostanze testate, il report finale e la corrispondenza tra la MicroBioTest e lo sponsor saranno conservate negli archivi della MicroBioTest, 105 Carpenter Drive, Sterling, VA 20164, o presso una struttura esterna controllata.

## CALCOLO DEL TITOLO VIRALE

La Dose Infettiva Citopatica al 50% su Colture di Tessuto per ml (TCID<sub>50</sub>/ml) è stata determinata utilizzando il metodo Spearman - Karber che implementa la seguente formula:

$$m = x_k + \left(\frac{d}{2}\right) - d \sum p_i$$

m = il logaritmo della diluizione alla quale la metà dei pozzetti sono infettati relativo al volume testato

x<sub>k</sub> = il logaritmo della dose più piccola che induce infezione in tutte le colture

d = il logaritmo del fattore di diluizione

p<sub>i</sub> = la proporzione di risultati positivi alla diluizione i

I valori sono stati convertiti a TCID<sub>50</sub>/ml utilizzando un campione inoculato di 1.0ml.

## RISULTATI

I risultati sono presentati nelle *Tabelle 1 – 3*.

Il Log<sub>10</sub> Fattore di Riduzione è stato calcolato nel seguente modo:

Log<sub>10</sub> Fattore di Riduzione = Carica Virale Iniziale (Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>) – Carica Virale Finale (Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>)

La Carica Virale (Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>) per supporto è stata calcolata nel seguente modo:

Carica Virale (Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>) = Titolo (Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml) + Log<sub>10</sub> [Volume per supporto (ml)]

La percentuale di inattivazione del virus è stata calcolata nel seguente modo:

[1 – Carica Virale Finale/Carica Virale Iniziale] X 100 = 1 – 10<sup>-(Log<sub>10</sub> Fattore di Riduzione)</sup> X 100

La Carica Virale Media in Log<sub>10</sub> da n replicati è stata determinata come segue:

Riduzione Log<sub>10</sub> Virale Media =  $\frac{VL1 + VL2 + \dots + VLn}{n}$

## RISULTATI (continua)

**Tabella 1**  
**Risultati Titolo Virale**

Campione	Replica	Tempo di Contatto	Titolo (Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml)	Volume (ml)	Carica Virale (Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> )
Controllo sterilità del terreno e vitalità cellulare	NA		nessun virus rilevato, cellule vitali; terreno sterile		
Controllo Titolo Stock Virus			7.75	-	-
Carica Teorica <sup>a</sup>					7.05
STR- Solution	1	1 ora	5.25	0.2	4.55
	2		5.00	0.2	4.30
	3		4.50	0.2	3.80
	1	2 ore	4.00	0.2	3.30
	2		4.00	0.2	3.30
	3		3.75	0.2	3.05
	1	4 ore	3.00	0.2	2.30
	2		2.30	0.2	1.60
	3		2.75	0.2	2.05
Controllo Recupero Piastra Iniziale (T = 0 ore)	1	0 ore	7.00	0.2	6.30
	2		7.25	0.2	6.55
	3		7.25	0.2	6.55
	Media			6.48	
Controllo Recupero Piastra Finale (T = 4 ore)	1	4 ore	5.75	0.2	5.05
	2		6.00	0.2	5.30
	3		6.50	0.2	5.80
	Media			5.50	

a. La carica teorica è determinata in base al controllo del Titolo di Riserva di Virus e il volume del virus inoculato per carrier.

NA = Non Applicabile



## RISULTATI (continua)

**Tabella 2**  
**Controllo Citotossicità**

Diluizione del Campione Neutralizzato	Controllo Citotossicità
10 <sup>-2</sup>	Nessuna citotossicità osservata in 4 di 4 pozzetti
10 <sup>-3</sup>	Nessuna citotossicità osservata in 4 di 4 pozzetti
10 <sup>-4</sup>	Nessuna citotossicità osservata in 4 di 4 pozzetti

**Tabella 3**  
**Riduzione Virale**

Agente	Tempo di contatto	Numero Replica	Carica Virale Iniziale* (Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> )	Carica Virale Finale (Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> )	Riduzione Log <sub>10</sub>	Riduzione Percentuale
STR- Solution	1 ora	1	6.48	4.55	1.93	<b>98.829%</b>
		2		4.30	2.18	<b>99.342%</b>
		3		3.80	2.68	<b>99.782%</b>
		Riduzione Media				2.38
	2 ore	1	6.48	3.30	3.18	<b>99.934%</b>
		2		3.30	3.18	<b>99.934%</b>
		3		3.05	3.43	<b>99.963%</b>
		Riduzione Media				3.28
	4 ore	1	6.48	2.30	4.18	<b>99.993%</b>
		2		1.60	4.88	<b>99.999%</b>
		3		2.05	4.43	<b>99.996%</b>
		Riduzione Media				4.59

- I risultati rappresentano la media dei tre replicati.

## CONCLUSIONI

Quando testato come descritto in precedenza, il dispositivo STR-Solution ha mostrato una riduzione di 2.38, 3.28 e 4.59 Log<sub>10</sub> (99.582%, 99.948%, 99.997%) quando il Coronavirus della Sindrome Respiratoria del Medio Oriente (MERS-CoV), contenente siero al 5%, è stato esposto al dispositivo sotto esame per 1 ora, 2 ore e 4 ore rispettivamente a 20°C. Tutti i controlli hanno incontrato i criteri per validare il test. Queste conclusioni sono basate sui dati osservati.

Study director:  Date 06/30/16  
Cory Chiossone Date

# APPENDICE

**Protocollo MicroBioTest**

**Test dell'efficacia virucida del dispositivo STR-Solution contro il  
Coronavirus della Sindrome Respiratoria del Medio Oriente (MERS-CoV)**

**Laboratorio d'esecuzione:**

MicroBioTest

Divisione dei Laboratori Microbac, Inc.

105 Carpenter Drive

Sterling, VA 20164

**Preparato per:**

Forward Medi Co, Ltd.

HangGang Xi Tower B-dong

Room 804, 1498 Gayang-dong

Gangseo-Gu, Seoul, Korea

3 Maggio 2016

MicroBioTest Protocol: FOR.1a.04.28.16

MicroBioTest Project: 922-101

## **OBIETTIVO:**

Il presente test è progettato per valutare l'efficacia di un dispositivo contro il Coronavirus della Sindrome Respiratoria del Medio Oriente (MERS-CoV) utilizzando dei supporti in vetro di capsule Petri. Il test segue i principi del metodo "Prodotti Spray Germicidi come Disinfettanti" nei Metodi Ufficiali di Analisi AOAC (19<sup>a</sup> Edizione, 2013), e il metodo d'analisi internazionale ASTM designato E1053-11, "Metodo di analisi standard per la verifica dell'attività virucida dei prodotti chimici intesi per la disinfezione di superfici ambientali non porose, inanimate" con personalizzazione per questo test.

## **CONDIZIONI SPERIMENTALI:**

Il virus sarà fatto asciugare sui supporti in vetro di capsule Petri a temperatura ambiente. Tre supporti saranno utilizzati per il trattamento con il dispositivo con tempo di contatto 1, tre supporti saranno utilizzati per il trattamento con il dispositivo con tempo di contatto 2, e tre supporti saranno utilizzati per il trattamento con il dispositivo con tempo di contatto 3. Inoltre, tre supporti saranno utilizzati come Controllo di Recupero della Piastra Iniziale senza trattamento con dispositivo o svolgimento; e tre supporti saranno utilizzati come Controllo di Recupero della Piastra Finale con il virus essiccato e mantenuto per il maggior tempo di contatto senza trattamento con il dispositivo.

I supporti del test saranno posizionati a 5cm dal dispositivo, verticalmente con il film di virus essiccato verso il dispositivo. Il dispositivo viene acceso secondo le istruzioni del produttore o dello Sponsor. Dopo ogni esposizione (tempo di contatto), un terreno di recupero virale (=neutralizzatore) sarà aggiunto su ogni supporto e le particelle virali saranno prelevate dalla superficie e saggiate per determinare la quantità di virus infettivo rimanente. Supporti multipli possono essere trattati in contemporanea dallo stesso dispositivo. Il carico virale medio per tre supporti esaminati sarà comparato alla media di supporti di controllo per determinare la riduzione in Log<sub>10</sub> e percentuale di ognuno ai diversi tempi di contatto.

## **MATERIALI:**

- A. Le sostanze in esame, di controllo e di riferimento, ove previsto, saranno fornite dallo sponsor dello studio (vedi ultima pagina). Come per CFR 40.160.105:
  - L'identità, forza, purezza e composizione, o altre caratteristiche che definiranno approssimativamente le sostanze in esame, di controllo o di riferimento, ove previsto, dovranno essere determinate per ogni lotto e documentate dallo sponsor prima del loro uso in uno studio. Metodi di sintesi, fabbricazione, o derivazione delle sostanze in esame, di controllo o di riferimento dovranno essere documentati e conservati dallo sponsor.

- Quando rilevante alla conduzione dello studio, la solubilità di ogni sostanza in esame, di controllo o di riferimento dovrà essere determinata dallo sponsor prima della data d'inizio degli esperimenti. La stabilità delle sostanze in esame, di controllo o di riferimento dovrà essere determinata dallo sponsor prima della data d'inizio degli esperimenti o in concomitanza secondo quanto scritto nelle procedure operative standard, che prevedono analisi periodiche di ogni lotto.

La sostanza in esame sarà testata come fornita dallo sponsor ad eccezione di disposizioni differenti. Tutte le operazioni eseguite sulla sostanza in esame come diluizione o particolari condizioni di immagazzinamento devono essere specificate dallo sponsor prima dell'inizio del test.

Lo sponsor assicura la gestione del laboratorio sperimentale MicroBioTest che la sostanza in esame è stata testata in maniera appropriata per identità, forza, purezza, stabilità e uniformità ove previsto.

La MicroBioTest conserverà tutte le sostanze chimiche non utilizzate per un periodo di un anno dal completamento del test, e poi le smaltirà in accordo con l'approvazione dell'ufficio di sicurezza, o le restituirà allo Sponsor. I materiali in esame e le registrazioni cartacee saranno conservate secondo il FIFRA. La MicroBioTest contatterà lo Studio dello Sponsor per organizzare il trasferimento delle registrazioni quando/se la sostanza testata verrà restituita allo Sponsor.

B. I materiali forniti dalla MicroBioTest, che includono ma non si limitano a:

- Virus in esame (richiesto dallo sponsor per lo studio): Coronavirus della Sindrome Respiratoria del Medio Oriente (MERS-CoV), Risorse BEI
  - i. Nota: l'inoculo virale conterrà siero bovino fetale al 5%
- Linea cellulare ospite: Vero E6, ATCC CRL-1586
- Strumenti e forniture da laboratorio
  - i. Capsule Petri di plastica 100 X 15mm sterili
  - ii. Raschietti per cellule, sterili monouso
  - iii. Pipette sierologiche sterili
  - iv. Micro-pipettatori e puntali per pipette sterili
  - v. Piastre per colture cellulari a 24 pozzetti
  - vi. Incubatori cellulari
  - vii. Autoclave
  - viii. Orologio certificato
  - ix. Timer digitale certificato

- Terreni e reagenti:
  - i. Terreno di coltura cellulare (= Terreno di Recupero Virale)
  - ii. Terreno di diluizione
  - iii. Acqua deionizzata sterile

I dettagli dei terreni e dei reagenti rilevanti per il sistema virus-ospite e la sostanza in esame saranno documentati nel primo insieme di dati e nella documentazione del progetto.

C. Materiali forniti dallo sponsor:

- Dispositivo in esame

**IDENTIFICAZIONE DEL SISTEMA SPERIMENTALE:**

Tutti i supporti applicabili, le griglie di supporto ai tubi di diluizione e l'apparato contenente gli ospiti saranno etichettati in maniera appropriata con le seguenti informazioni: virus, ospite e sostanza in esame e/o numero progetto.

## PROGETTO SPERIMENTALE:

Le procedure coinvolte nella sperimentazione del presente studio sono descritte in una serie dettagliata di SOP che sono conservati presso la MicroBioTest. SOP e Log sono riportati nei dati grezzi e sono richiesti come parte dei regolamenti GLP. Il processo dello studio è descritto nelle seguenti sezioni.

### A. Preparazione Inoculo:

Il virus in uso è stato fornito da risorse attendibili e può essere stato diffuso alla MicroBioTest nelle cellule Vero E6. Riserve virali congelate saranno scongelate il giorno del test. Se necessario, al virus in riserva sarà aggiunto siero bovino fetale o diluito con terreni per raggiungere una carica organica finale del 5%.

Nota: Una finestra di riduzione 3-5 Log<sub>10</sub> è lo scopo di questo studio.

### B. Preparazione supporto:

Un totale di 15 supporti in vetro di capsule Petri sterili sarà preparato aggiungendo **l'inoculo di 0.2ml di virus** a ogni supporto. L'inoculo virale si disperderà più possibile con un raschietto cellulare su un'area di circa 4 in<sup>2</sup> che è stata segnata sul lato inferiore delle capsule Petri pre-sterilizzate. Tutti i supporti inoculati sono incubati a temperatura ambiente in una cappa biologica nei dischi Petri in plastica sterile fino ad asciugatura visibile. Il tempo di inizio e fine sull'orologio verrà registrato come tempo di asciugatura del virus. La temperatura e l'umidità saranno anche registrate.

Nove supporti saranno preparati per il trattamento con dispositivo in esame, tre per ogni tempo di contatto. Tre supporti saranno utilizzati come Controllo di Recupero di Piastra Iniziale. Tre supporti saranno utilizzati come Controllo di Recupero di Piastra Finale.

Inoltre, un supporto sarà preparato per il controllo della citotossicità utilizzando il terreno di diluizione (DM) in sostituzione al virus come inoculo. Nessun controllo di efficacia neutralizzante/interferenza virale è applicabile dato che il materiale in esame non è una sostanza chimica.

### C. Preparazione del dispositivo in esame e utilizzo

Il dispositivo in esame sarà assemblato, se richiesto, e utilizzato in maniera sicura secondo le istruzioni del produttore o dello sponsor, come previsto.



#### D. Test:

Nota: I livelli di temperatura e umidità del laboratorio durante la fase sperimentale saranno monitorati e riportati.

Dopo l'inoculazione e l'essiccazione, i supporti in esame saranno posizionati a 5cm di distanza sotto il dispositivo. I supporti saranno posizionati verticalmente con il film di virus asciutto verso il dispositivo. Il dispositivo è acceso seguendo le istruzioni del produttore o dello Sponsor. I supporti saranno esposti al dispositivo in esame per un tempo di esposizione intero (tempo di contatto). Nota: supporti multipli possono essere trattati contemporaneamente dallo stesso dispositivo. Dopo ogni tempo di contatto, 2.0ml di terreno di recupero virale (=neutralizzante) saranno aggiunti su ogni supporto e la miscela virus/neutralizzante sarà grattata via dalla superficie del supporto con un raschietto per cellule. Questo "campione post-neutralizzante" (PNS), considerata la diluizione  $10^{-1}$  dall'inoculo virale originale, sarà diluito in serie di 10 volte in terreno DM. Le diluizioni selezionate del campione saranno inoculate su un monostrato cellulare in coltura come descritto della sezione "Saggio Infettività".

#### E. Controlli:

##### a. Controllo Recupero Piastra Iniziale (PRC Iniziale):

Questo controllo sarà eseguito in tre replicati in contemporanea alla progressione della sostanza in esame. L'inoculo virale sarà distribuito sulla superficie del supporto e lasciato ad asciugare a temperatura ambiente. Immediatamente dopo l'essiccazione – senza il trattamento col dispositivo o il mantenimento – a ogni supporto sarà applicato 2.0ml di terreno di recupero virale e processato come il test. Le diluizioni selezionate del campione saranno aggiunte ai monostrati cellulari in coltura ad un minimo di quattro pozzetti per diluizione per campione, come descritto nella sezione "Saggio Infettività". Questo controllo determinerà la perdita relativa in infettività virale risultante dalle sole asciugatura e neutralizzazione.

La carica virale media dai tre supporti PRC Iniziale sarà utilizzata come livello base e comparata ai risultati del supporto testato per determinare la riduzione  $\text{Log}_{10}$  e percentuale del dispositivo in esame.

**b. Controllo Recupero Piastra Finale (PRC Finale):**

Questo controllo sarà eseguito in tre replicati in contemporanea con il processamento della sostanza sotto esame. L'inoculo virale sarà distribuito sulla superficie del supporto e lasciato ad asciugare a temperatura ambiente. Il supporto sarà poi conservato per il maggior tempo di contatto così come per i supporti in esame ma senza alcun trattamento con il dispositivo. A seguito del tempo di contatto, al supporto sarà applicato 2.0ml di terreno di recupero virale e processato come il test. Le diluizioni selezionate del campione saranno aggiunte ai monostrati cellulari in coltura a un minimo di quattro pozzetti per diluizione per campione, come descritto nella sezione "Saggio Infettività". Questo controllo determinerà la perdita relativa di infettività virale risultante dalle sole asciugatura e neutralizzazione.

**c. Controllo Citotossicità**

Anche se il materiale da testare non è una sostanza chimica, un controllo sulla citotossicità è necessario per confermare che l'effetto citopatico (CPE) osservato, se presente, è dovuto alla sola infezione virale e non ad una citotossicità non-specifica.

Un supporto sarà utilizzato per questo controllo. Il terreno di diluizione, al posto del virus, sarà distribuito sulla superficie del supporto e asciugato. Il supporto sarà posizionato vicino a tre supporti in esame inoculati col virus su un ripiano e soggetto allo stesso trattamento con dispositivo per il massimo tempo di contatto (come caso di uno scenario peggiore per i più brevi tempi di contatto). Dopo il trattamento, 2.0ml di terreno di recupero virale saranno aggiunti al supporto e i residui saranno grattati via dal supporto in un disco di recupero. Il campione sarà diluito in serie 10 volte. Le diluizioni selezionate saranno aggiunte ai monostrati cellulari in coltura a quattro pozzetti per diluizione, e incubati insieme ai campioni dell'altro test e ai controlli. Alla fine dell'incubazione, saranno controllate le condizioni cellulari.

**d. Controllo della Vitalità Cellulare:**

Questo controllo dimostrerà che le cellule rimangono vitali attraverso il decorso del periodo dell'esperimento. Inoltre, sarà confermata la sterilità del DM impiegato durante il periodo sperimentale. Almeno quattro pozzetti di cellule riceveranno solo DM e saranno incubate e processate insieme ai testati e agli altri controlli. Questo servirà come controllo negativo.

e. Controllo Titolo Riserva Virus (VST):

Un'aliquota del virus utilizzato nel presente studio sarà direttamente diluita in serie e inoculata sulle cellule ospite a 4 o 8 pozzetti in replica per diluizione per confermare il titolo del virus in riserva. Questo controllo dimostrerà che il titolo virale è appropriato per l'uso e che il saggio d'infettività virale viene eseguito in maniera appropriata.

F. Saggio Infettività:

La quantità di virus infettivo in entrambi i campioni in esame e di controllo sarà esaminata dal saggio per la dose capace di infettare il 50% delle colture tissutali (TCID<sub>50</sub>) basato sull'effetto citopatico indotto dal virus.

Le cellule indicatori saranno seminate su piastre da coltura cellulare con 24 pozzetti a un'appropriata concentrazione approssimativamente 12-30 ore prima dell'inoculazione.

Le colture inoculate saranno incubate a 36±2°C con 5±1% di CO<sub>2</sub> per un totale di 4-9 giorni. Le cellule saranno osservate e alimentate con terreni freschi se necessario, durante il periodo d'incubazione. Alla fine dell'incubazione, le colture cellulari saranno esaminate e gli effetti citotossici specifici della sostanza in esame, se presenti, saranno valutati esaminando sia i campioni che i controlli. Queste osservazioni saranno registrate.

G. Calcolo:

La dose infettante per il 50% della coltura tissutale per ml (TCID<sub>50</sub>/ml) sarà determinata utilizzando il metodo di Spearman-Kärber. I risultati del test saranno riportati come riduzione del titolo virale a causa del trattamento con la sostanza in esame espressa come Log<sub>10</sub>. Nessuna analisi statistica sarà utilizzata per questo test.

Il Log<sub>10</sub> Fattore di Riduzione è stato calcolato nel seguente modo:

$\text{Log}_{10} \text{ Fattore di Riduzione} = \text{Carica Virale Iniziale (Log}_{10} \text{ TCID}_{50}) - \text{Carica Virale Finale (Log}_{10} \text{ TCID}_{50})$

La Carica Virale (Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>) per supporto è stata calcolata nel seguente modo:

$\text{Carica Virale (Log}_{10} \text{ TCID}_{50}) = \text{Titolo (Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}) + \text{Log}_{10} [\text{Volume per supporto (ml)}]$

La percentuale di inattivazione del virus è stata calcolata nel seguente modo:

$[1 - \text{Carica Virale Finale}/\text{Carica Virale Iniziale}] \times 100 = 1 - 10^{-(\text{Log}_{10} \text{ Fattore di Riduzione})} \times 100$

## **CRITERI DI ACCETTAZIONE DEL TEST:**

Il Test sarà accettato per la valutazione dei risultati dell'esperimento se i criteri elencati di seguito sono soddisfatti. Il direttore dello studio può considerare altre cause che potrebbero avere effetti sull'affidabilità del test e la sua accettazione.

- La carica virale media ristabilita dal PRC Iniziale deve essere  $\geq 4.0 - \log_{10}$
- L'effetto citopatico indotto dal virus deve essere distinguibile dagli effetti citotossici indotti dalla sostanza in esame (se presenti)
- Il controllo della vitalità cellulare e il controllo della citotossicità devono essere negativi per l'infettività

## **PERSONALE E LUOGHI DELLA SPERIMENTAZIONE:**

Un direttore di studio sarà assegnato prima dell'inizio del test. I riassunti sono conservati e sono disponibili su richiesta. Il presente studio sarà condotto alla MicroBioTest, 105 Carpenter Drive, Sterling, VA 20164.

## **MODIFICHE E VARIAZIONI DI PROTOCOLLO:**

Qualunque modifica e variazione dal protocollo identificata sarà riportata nei documenti del progetto e inclusa nel report finale. Lo sponsor firmerà la documentazione del progetto per conoscenza del cambiamento nel protocollo.

## **ANALISI STATISTICHE:**

Nessuna analisi statistica sarà realizzata nel presente studio.

## **FORMATO REPORT:**

La MicroBioTest impiega un formato standard per i report per ogni disegno di esperimento. Ogni report sarà fornito di almeno le seguenti informazioni:

- Identificativo Sponsor
- Identificativo dispositivo sotto esame
- Tipo di saggio e numero progetto
- Riduzione virale in Log<sub>10</sub> e percentuale
- Risultati test presentati in forma tabulare e conclusioni
- Metodi e criteri di valutazione, se applicabili
- Date di inizio e completamento dello studio (solo studi GLP)
- Assicurazione Qualità firmata e Dichiarazioni di Conformità (solo studi GLP)
- Certificato di Analisi (solo studi GLP, se fornito dallo Sponsor)

## **REGISTRAZIONI DA CONSERVARE:**

Per tutti gli studi GLP, il report finale firmato originale sarà spedito allo Sponsor. Una bozza del report sarà fornita allo Sponsor da revisionare prima della siglatura del report.

Tutti i dati grezzi, i protocolli, le modifiche al protocollo, le registrazioni della sostanza in esame, copia del report finale, e la corrispondenza tra MicroBioTest e lo sponsor saranno immagazzinati negli archivi presso la MicroBioTest, 105 Carpenter Drive, Sterling, VA 20164 o in una sede esterna controllata.

Tutti i cambiamenti o revisioni al presente protocollo approvato saranno documentati, firmati dal direttore dello studio, datati e conservati con il protocollo. Lo sponsor sarà notificato di ogni cambiamento, risoluzione e impatto sullo studio prima possibile.

Le date di inizio e di termine proposte dell'esperimento; le informazioni aggiuntive sulla sostanza in esame; il virus sotto esame e i monostrati della linea cellulare ospite utilizzati e il tipo di neutralizzante impiegato nel test saranno indirizzati in un documento del progetto separato per ogni studio. La data in cui il direttore di studio firma il protocollo sarà la data d'inizio del protocollo. Tutti i documenti del progetto apportati saranno portati avanti per lo sponsor dello studio per appropriate azioni.

## RIASSUNTO DEI CAMPIONI DA ESAMINARE:

Nr.	Trattamento	Tempo di contatto	Inoculo	Descrizione
1	Dispositivo in esame	1 ora	Virus	Trattamento con dispositivo in esame, T=1 ora, Rep. 1
2				Trattamento con dispositivo in esame, T=1 ora, Rep. 2
3				Trattamento con dispositivo in esame, T=1 ora, Rep. 3
4		2 ore		Trattamento con dispositivo in esame, T=2 ore, Rep. 1
5				Trattamento con dispositivo in esame, T=2 ore, Rep. 2
6				Trattamento con dispositivo in esame, T=2 ore, Rep. 3
7		4 ore		Trattamento con dispositivo in esame, T=4 ore, Rep. 1
8				Trattamento con dispositivo in esame, T=4 ore, Rep. 2
9				Trattamento con dispositivo in esame, T=4 ore, Rep. 3
10	Nessuno	0 ore	Virus	Controllo di Recupero Piastra Iniziale, T=0 ore, Rep. 1
11				Controllo di Recupero Piastra Iniziale, T=0 ore, Rep. 2
12				Controllo di Recupero Piastra Iniziale, T=0 ore, Rep. 3
13		4 ore		Controllo di Recupero Piastra Finale, T=4 ore, Rep. 1
14				Controllo di Recupero Piastra Finale, T=4 ore, Rep. 2
15				Controllo di Recupero Piastra Finale, T=4 ore, Rep. 3
16	Dispositivo in esame	4 ore		Controllo Citotossicità
17	N/A	N/A	N/A	Controllo Vitalità cellulare
18	N/A	N/A	N/A	Controllo titolo virale riserva

**INFORMAZIONI VARIE:**

Le seguenti informazioni devono essere completate dallo sponsor prima dell'inizio dello studio:

- Nome e indirizzo:

Forward Medi Co., Ltd.  
 HangGang Xi Tower B-dong  
 Room 804, 1498 Gayang-dong,  
 Gangseo-Gu, Seoul, Korea

- Informazioni sostanza in esame e condizioni test:

Test device name	<input checked="" type="checkbox"/> STR-Solution
Active ingredient(s)/Technology	<input checked="" type="checkbox"/> Adhvanced PCO
Lot No.	<input checked="" type="checkbox"/> HU10553-14019
Exposure Distance / Clearance	<input checked="" type="checkbox"/> Approx. 5 cm
Contact time 1	<input checked="" type="checkbox"/> 1 hour
Contact time 2	<input checked="" type="checkbox"/> 2 hours
Contact time 3	<input checked="" type="checkbox"/> 4 hours
Contact temperature	<input checked="" type="checkbox"/> Ambient (20±2C)
No. of test carriers per condition	<input checked="" type="checkbox"/> Three (N=3)
Organic Load in viral inoculum	5% serum

C. The sponsor intends to submit this information to:  \_\_\_\_\_

D. Study Conduct:  GLP

**PROTOCOL APPROVAL BY SPONSOR:**

Sponsor Signature:  Date: 05-09-16

Printed Name: Jon Bennert

**PROTOCOL APPROVAL BY STUDY DIRECTOR (MicroBioTest):**

Study Director Signature:  Date: 5/26/16

Printed Name: **Cory Chiosoni**

Date issued: 05/26/16 Project Sheet No. 1 Page No. 1 Laboratory Project Identification No. 922-101			
<b>STUDY TITLE:</b> Virucidal Efficacy Test for A Test Device- Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)		<b>STUDY DIRECTOR:</b> Cory Chiossone  5/26/16 Signature Date	
<b>TEST MATERIAL(S):</b> STR-Solution	<b>LOT NO.</b> HU10553-14019	<b>DATE RECEIVED:</b> 05/13/16	<b>DS NO.</b> G282
<b>PERFORMING DEPARTMENT(S):</b> Virology and Molecular Biology		<b>STORAGE CONDITIONS:</b> Location: K1 <input checked="" type="checkbox"/> Dark <input checked="" type="checkbox"/> Ambient Room Temperature <input type="checkbox"/> Desiccator <input type="checkbox"/> Freezer <input type="checkbox"/> Refrigerator <input type="checkbox"/> Other:	
<b>PROTECTIVE PRECAUTION REQUIRED:</b> MSDS <input type="checkbox"/> Yes / <input checked="" type="checkbox"/> No			
<b>PHYSICAL DESCRIPTION:</b> <input type="checkbox"/> Solid <input type="checkbox"/> Liquid <input type="checkbox"/> Aerosol <input checked="" type="checkbox"/> Other: Device			
<b>PURPOSE:</b> See attached protocol. <b>AUTHORIZATION:</b> See client signature.			
<b>PROPOSED EXPERIMENTAL START DATE:</b> 05/26/16 <b>TERMINATION DATE:</b> 06/10/16			
<b>CONDUCT OF STUDY:</b> <input type="checkbox"/> FDA <input type="checkbox"/> EPA <input type="checkbox"/> R&D <input checked="" type="checkbox"/> GLP <input type="checkbox"/> GCP <input type="checkbox"/> Other:			
<b>SPONSOR:</b> Forward Medi Co., Ltd. HangGang Xi Tower B-dong Room 804, 1498 Gayang-dong Gangseo-Gu, Seoul, Korea		<b>CONTACT PERSON:</b> Cho Chang Woon Email: formedi@naver.com	
<b>TEST CONDITIONS:</b>			
<b>Challenge organism:</b>	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), BEI Resources		
<b>Host cell line:</b>	Vero E6 cells, ATCC CRL-1586		
<b>Organic load:</b>	5% serum		
<b>Dilution medium</b>	1X Minimum Essential Medium (MEM) + 2% Fetal Bovine Serum (FBS)		
<b>Neutralizer:</b>	MEM + 10% FBS		
<b>Active ingredient(s):</b>	Adhvanced PCO		
<b>Dilution:</b>	Ready to use		
<b>Contact time(s):</b>	1, 2 and 4 hours		
<b>Contact temperature:</b>	Ambient (20±2°C)		
<b>Incubation time:</b>	4 – 9 days		
<b>Incubation temperature:</b>	36±2°C with 5±1% CO <sub>2</sub>		
<b>Exposure Distance:</b>	Approximately 5 cm		