

最終報告書

ウイルス性硬質表面における有効性試験- S A R S 関連コロナウイルス2
(SARS-CoV-2) (COVID-19ウイルス)

試験物質

TMXPAE

ロット番号

TMXPAE-200326-1

TMXPAE-200326-2

TMXPAE-200326-3

試験微生物

S A R S 関連コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2)(COVID-19 ウイルス),
隔離: USA-WA1/2020 提供元: BEi Resources, NR-52281

試験ガイドライン

EPA (2018) ガイドライン 810.2000 and 810.2200 (G)

著者

Cory Chiossone

プロジェクト完了日

08/24/20

試験実施機関

Microbac Laboratories, Inc.
105 Carpenter Drive
Sterling, VA 20164

プロジェクト識別番号

596-102

実施要綱識別番号

596.1.04.13.20

依頼主

Laboratoire M2
4005-A, Rue de la Garlock
Sherbrooke (Québec) J1L 1W9
Canada

データ機密保持の不主張

この報告書に含まれる情報については、いかなる根拠にも関わらず機密保持の主張を行いません。情報は、連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法FIFRA規制第10条 (d) (1) (A)、(B)、または (C) の範囲内に指定されておらず、登録済みまたは過去に登録済みの農薬に関連する情報は、機密扱いに該当しません。よってFIFRA 第10条 (g) に基づく多国籍企業への開示に関する規定に従い一般に公開されます。

Submitter signature: Denise Burnside Date: 08/24/2020
Typed Name of Signer: Denise Burnside
Typed Name of Company: Agent for Laboratoire M2

優良試験所基準への準拠

試験で使用された慣行と40CFRパート§160で要求された慣行とのすべての違いの詳細は以下のとおりです。:

- 試験物質の同一性、強度、純度、安定性、均一性、および用量溶液分析に関する情報は、試験の依頼主が保有します。

Study Director Signature:



Date: 08/24/2020

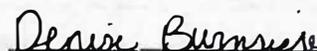
Typed Name:

Cory Chiossone

Typed Name of Laboratory:

Microbac Laboratories, Inc.

Sponsor Signature:



Date: 08/24/2020

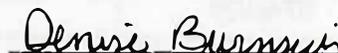
Typed Name of Signer:

Denise Burnside

Typed Name of Company:

Agent for Laboratoire M2

Submitter Signature:



Date: 08/24/2020

Typed Name of Signer:

Denise Burnside

Typed Name of Company:

Agent for Laboratoire M2

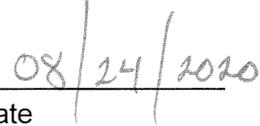
品質保証チームによる声明

Microbacの品質保証チームは、プロジェクト番号596-102が、現優良試験所基準
(40CFR§160) に準拠していることを精査しました。

精査実施日、経営陣および研究責任者への結果通知日は以下のとおりです。

精査事項	精査日	研究責任者への通知日	経営陣への通知日
実施要綱	06/02/20 06/04/20	06/04/20	06/04/20
試験中 (キャリア準備)	06/02/20	06/04/20	06/04/20
最終報告書草案	07/07/20 07/08/20	07/14/20	07/14/20
最終報告書	08/24/20	08/24/20	08/24/20


Danielle Downs, RQAP-GLP
Quality Assurance Specialist III


Date

目次

最終報告書 - 表紙.....	1
データ機密保持の不主張.....	2
優良試験所基準への準拠.....	3
品質保証チームによる声明.....	4
目次.....	5
試験物質の特性評価.....	6
試験の概要.....	6-8
試験の手順.....	8-11
実施要綱の修正.....	11-12
実施日および場所.....	12
保持すべき記録.....	12
試験判定基準.....	13
計算.....	13-14
結果.....	14-16
試験物質の評価基準.....	16
結論.....	16
参考文献.....	17
付録 I.....	18
署名済み実施要綱.....	19-34
プロジェクトシート.....	35-37
付録 II.....	38
分析証明書.....	39-41

試験物質の特性評価

同一性、強度、純度、溶解性、および組成に関する試験物質の特性評価は、試験開始前に40CFR、パート160、サブパートF[160.105]（米国政府規制である「優良研究所における試験・制御・および参照物質基準」）に準拠して文書化されました。依頼主から提供された試験物質分析証明書レポートは、付録IIにあります。

試験の概要

- 試験名: ウイルス性硬質表面有効性試験-S A R S 関連コロナウイルス2
(SARS-CoV-2) (COVID-19ウイルス)
- プロジェクト番号: 596-102
- 実施要綱番号: 596.1.04.13.20
- 試験方法: ASTM国際E1053-20「無生物の非多孔質環境表面の消毒を目的とした化学物質のウイルス活性を評価するための標準試験方法」
- 依頼主: Laboratoire M2
4005-A, Rue de la Garlock
Sherbrooke (Quebec) J1L 1W9
Canada
- 試験実施機関: Microbac Laboratories, Inc.
105 Carpenter Drive
Sterling, VA 20164
- 試験の目的: この試験は、SARSCoV-2で汚染された硬い表面に対する試験物質の消毒能力を測定することにより、試験物質の殺ウイルス効果の主張を立証するために実施されました。試験は、消費者使用を想定して設計されており、EPA OCSPP 810.2000 (2018) および810.2200 (2018) 製品パフォーマンステストガイドライン、2018シリーズ810のよくある質問の製品パフォーマンステストガイドラインに準拠して実施されました。: 抗菌効果テストガイドライン (2018)、カナダ保健省の消毒薬 (2020年4月)、および表面消毒薬の安全性と有効性の要件 (2020年4月)。
- 実施日: プロジェクト開始日: 06/02/20
試験開始日: 06/02/20
試験終了日: 06/11/20
プロジェクト完了日: 1 ページ目を参照

試験の概要 (前頁から続く)

試験物質:	TMXPAE <ul style="list-style-type: none">ロット番号: TMXPAE-200326-1, 受領日: 04/01/20, DS No. K346ロット番号: TMXPAE-200326-2, 受領日: 04/01/20, DS No. K347ロット番号: TMXPAE-200326-3, 受領日: 04/01/20, DS No. K348液性: 液体保管条件: 室温有効成分: チモール0.212% (TMXPAE-200326-1)、チモール0.213%(TMXPAE-200326-2)、チモール0.208% (TMXPAE-200326-3)希釈: 1:1.03 (試験物質1+希釈剤0.03) (TMXPAE-200326-1 および TMXPAE-200326-2)原液使用(TMXPAE-200326-3)希釈剤: 滅菌DI水
試験の条件:	有機質汚染負荷: ウイルス接種した5.0%ウシ胎児血清(NCS) 接触時間: 55秒 接触温度: 室温 (20±1°C) (実測: 21°C) 接触時湿度: 相対湿度 (RH) 34-35% 注: 試験の条件はすべての試験およびコントロールキャリアに適用。
攻撃ウイルス:	S A R S 関連コロナウイルス2 (SARS-CoV-2)(SARS-関連コロナウイルス2) (COVID-19ウイルス) <ul style="list-style-type: none">隔離: USA-WA1/2020提供元: BEI Resources, NR-52281 <p>USA-WA 1/2020ウイルスは、最近中国のウイルス発症地への旅行から戻り2020年1月に米国ワシントンで臨床疾患 (COVID-19) を発症した呼吸器疾患の患者の口腔咽頭スワブから分離されました。</p>
インジケータ細胞:	Vero E6 細胞 <ul style="list-style-type: none">提供元: ATCC CRL-1586
培養時間:	4 - 9 日間 (実質: 9 日間)
培養温度:	気温 36±2°C、CO ₂ 量 5±3%
希釈培地 (DM):	最小必須培地 (MEM) + 2%ウシ胎児血清 (NCS)

試験の手順 (前項から続く)

ウイルスを用いた試験物質のロットごとに1つのキャリアを使用した。ウイルスを用いたプレートリカバリー対照のために1つのキャリアを調製した。さらに、接種材料としてウイルスの代わりに希釈培地を使用して、中和剤の有効性/ウイルス干渉および細胞毒性の対照に、接種材料としてウイルスの代わりに希釈培地を使用したキャリアを試験物質のロットごとに調製した。

試験物質の適用および暴露条件: _____

試験物質は、その希釈濃度で、Microbacが提供するスプレーボトルに分注され、3回反転された。依頼主の指定に従って、試験物質の各バッチを少なくとも2つの空のペトリ皿にスプレーすることにより、模擬スプレー試験を水準した。各皿に分配された量を測定し、各バッチについて平均した。バッチあたりの平均スプレー量は2.0mlであり、該当するすべての水準の中和剤量に適用した。3ロットの模擬スプレーの平均量を、プレートリカバリー対照に追加された希釈培地の量として使用した。

試験物質バッチごとに1つのキャリアを評価した。4つのスプレーボトルを使用して、製品を6~8インチの距離からテストキャリアにスプレーした。乾燥したウイルス膜は完全に試験物質で覆われていた。製品をスプレーした後ストップウォッチを開始し、テストキャリアを21℃、相対湿度34~35%で55秒間水平位置で保持した。

サンプルの回収: _____

接触時間後、模擬スプレーで決定された量に従い、試験物質を2.0mlの中和剤で中和した。混合物をセルスクレーパーでキャリア表面からこすり落とした。この中和後のサンプル (PNS) は、 10^{-1} 希釈と見なされた。PNS0.5mlに対しDM4.5mlを添加し、順次10倍希釈した。

選択した希釈液を24ウェル宿主細胞プレートに1ウェルあたり1.0ml、希釈液あたり4ウェルで接種し、 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $5 \pm 3\% \text{CO}_2$ (実測: $35.91 \pm 0.37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$) で24時間49分間吸着させた。吸着後、培地を吸引した。細胞を1.0mlの新鮮なDMでリフィーディングし、 $5 \pm 3\% \text{CO}_2$ (実測: $36.26 \pm 0.28^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$)、 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ の培養器に戻しさらに8日間培養した。

感染力試験: _____

対照テストとコントロールの両方に残っている感染性ウイルスは、ウイルス誘発性細胞変性効果 (CPE) によって検出された。CPEは、細胞の丸みと細胞単層の脱落として定義される。 $5 \pm 3\% \text{CO}_2$ 、 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (実測: $36.22 \pm 0.31^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$) で9日間培養した後プレートを取り出し、スコアを付け、試験物質固有の細胞毒性効果および/またはウイルス特異的細胞変性効果 (CPE) の記録を行った。

試験の手順 (前項から続く)

中和剤の有効性とウイルス干渉制御 (NE/VI) :

中和後に残留有効成分が存在するか (中和剤の有効性)、または中和された試験物質がウイルス感染性を妨げるか (ウイルス干渉) を評価するために、試験と同時に対照を実施した。NE/VIは、キャリアにウイルスの代わりに0.4mlのDMが使用されたことを除いて、試験サンプルと同じように調製された。試験物質を4回キャリアにスプレーし、接触時間 (55秒) 保持した。次に、2.0mlの中和剤を加え、試験物質の適用と中和後、サンプルはNE/VI用と細胞毒性用の2つに分けられた (以下を参照)。NE/VIは、PNS0.5mlに対し4.5mlDMを添加し、順次10倍希釈し、100 μ lのウイルスストック

(1413TCID₅₀ユニットを含む) を4.5 mlの選択した希釈液に個別に添加し、接触時間以上 (実測: 55秒) 保持した。この中和後のサンプル (PNS) は、10倍希釈と見なされた。選択した希釈液を、1ウェルあたり1.0ml、希釈液あたり4ウェルで指標細胞のプレートに接種し、テストサンプルと同じ方法で培養した。

細胞毒性制御 (CT) :

この対照テストは、指標細胞に対する試験物質の細胞毒性効果を評価するために試験と同時に実施した。CT (NE/VIから入手) は、指標細胞プレートに接種した希釈液にウイルスを添加しなかったことを除いて、NE/VIと同じように調製し試験サンプルと同じ方法で培養した。テストは、試験物質の各ロットごとに1回実施した。PNS0.5mlに対しDM4.5mlを添加し、順次10倍希釈した。選択した希釈液を、1ウェルあたり1.0 ml、希釈液あたり4ウェルで指標細胞プレートに接種し、テストサンプルと同じ方法で培養した。

プレートリカバリー対照 (PRC) :

この対照テストは、単一の接種されたキャリアを用いた試験と同時に実施され、投与ウイルス量を確立し、試験物質の結果と比較して、試験物質によるウイルスの減少を評価した。乾燥ウイルス接種物を処理するために試験物質の代わりに2.0mlのDMを使用したことを除いて、PRCを試験サンプルと同じように調製した。3ロットの模擬スプレーの平均量を、プレートリカバリー対照に追加された希釈培地の量として適用した。処理後、キャリアは試験物質に使用した接触時間と同様に55秒間保持された。接触時間後2.0mlの中和剤を加えた。この中和後サンプル (PNS) は、10⁻¹希釈と見なされた。PNS0.5mlに対しDM4.5mlを添加し、順次10倍希釈した。選択した希釈液を、1ウェルあたり1.0 ml、希釈液あたり4ウェルで指標細胞プレートに接種し、テストサンプルと同じ方法で培養した。

試験の手順 (前項から続く)

細胞の可視性制御(CVC) :

この対照テストは、指標宿主細胞が生存し続けていることを実証し、培養期間を通して使用された培地の無菌性を確認するために、試験と同時に実施された。1.0mlのDMを4ウェルの指標細胞に加え、テストサンプルと同じ方法で培養した。

ウイルスストック力価制御(VST) :

この対照テストは、ストックウイルスの力価が使用に適切であり、ウイルス感染性評価が適切に実施されたことを実証するために、試験と同時に実施された。この研究で使用されたウイルス接種物0.5mlに対しDM4.5mlを添加し、順次10倍希釈された。選択した希釈液を指標細胞プレートに接種し、テストサンプルと同じ方法で培養した。宿主細胞プレートに、1ウェルあたり1.0ml、希釈液あたり4ウェルで接種した。

実施要綱の修正

実施要綱の修正:

1. 実施要綱15ページには、有機負荷はウシ胎児血清であると記載されていますが、実際には新生子牛血清で実施されます。この修正は実施要綱15ページに適用されます。
2. 実施要綱「参照」セクションの4には、次のようにリストされています。
米国環境保護庁化学物質安全および汚染防止局、製品性能テストガイドライン、2019年8月のOCSP 810.2000、810.2100、および810.2200に関するよくある質問 (FAQ)。
上記内容は以下のとおりに修正されます。
米国環境保護庁化学物質安全および汚染防止局、2018シリーズ810のよくある質問-製品性能試験ガイドライン：抗菌効果試験ガイドライン、2019年8月。
3. 実施要綱の「参考文献」セクションでは、参考文献5および6を次のように示しています。
 5. カナダ保健省、2014年1月ガイダンス文書-消毒薬。
 6. カナダ保健省、2014年1月ガイダンス文書-硬質表面消毒薬の安全性と有効性の要件。

これらは以下のとおりに修正されます。

5. カナダ保健省、2020年4月ガイダンス文書-消毒薬。
6. カナダ保健省、2020年4月ガイダンス文書-表面消毒薬の安全性と有効性の要件。

実施要綱の修正（前項から続く）

4. 実施要綱の維持すべき記録のセクションには、「実施要綱のあらゆる修正と要綱からの逸脱は、依頼主に送られ承認と署名を得るものとする」と記載されています。当該内容の明確化のため、「試験の手順に関する実施要綱のあらゆる修正と要綱からの逸脱は、依頼主に送られ承認と署名を得るものとする」に修正する必要があります。

5. 試験物質調製セクションには、「調製された試験物質の温度が規定の試験温度範囲内でない場合、事前に試験温度に平衡化される」と記載されています。当該内容の明確化のため、「試験温度および試験物質（または該当する場合は調製された試験物質）の温度が室温である場合、事前平衡化は必要ありません。いずれかの温度が室温でない場合、試験物質（または調製された）試験に使用する試験物質（該当する場合は、事前に試験温度に平衡化されなければならない）」に修正する必要があります。

実施要綱からの逸脱:

この試験における実施要綱からの逸脱はありませんでした。

試験実施日および場所

この試験は、20164バージニア州スターリング カーペンター通り105にあるMicrobac(株)研究所のBSL-3実験室で、2020年6月2日から2020年6月11日まで実施されました。試験ディレクターは2020年6月2日に実施要綱に署名しました。試験の完了日は、プロジェクト責任者が最終報告書に署名した日です。実施日の詳細は以下のとおりです。

- 試験は、2020年6月2日の午後3時28分に開始され、2020年6月11日の午後3時30分に終了しました。

実施要綱のすべての変更または改訂は文書化され、試験ディレクターによって署名され、日付が付され、実施要綱とともに保管されました。

保管すべき記録

すべての試験データ、試験要綱、試験要綱の修正、試験物質の記録、最終報告書、およびMicrobacと依頼主間の通信記録は、Microbac Laboratories, Inc.、105 Carpenter Drive, Sterling, VA 20164の記録保管所、または施設外の管理された場所に保管されます。

試験判定基準

以下の基準を満たしたため、試験は試験物質の評価に許容できると見なされた。

- 中国から回収された感染性ウイルスは1キャリアあたり4.8 Log₁₀ TCID₅₀ ユニット以上であった。
- ウイルス誘発性CPEは、試験物質誘発性細胞毒性（存在する場合）と区別できた。
- ウイルスは、細胞毒性を示さないNE/VIコントロールの希釈液から回収された。
- 細胞可視性制御（アッセイネガティブコントロール）はウイルスを示さなかった。

計算

NE/VI希釈あたりのウイルス添加量の計算：

$$D = C * (A / B)$$

- where: A = ストックウイルス1mlあたりのウイルスの単位（対数ではなく自然数-認定された力価に基づく）
B = 希釈の倍数（対数ではなく自然数）
C = NE/VI希釈ごとに追加された希釈ウイルスの量
D = NE/VI希釈あたりのウイルスの単位

力価の計算:

1mlあたりの50%組織培養感染量（TCID₅₀ / mL）は、次の式を用いたSpearman-Kärber法により決定されました。

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

- where: m = 試験容量に対するウェルの半分が感染する希釈の対数

x_k = すべての培養液で感染を誘発する最小投与量の対数
d = 希釈係数の対数
p_i = 希釈時iの陽性結果の割合
∑p_i = p_iの合計（100%の感染を生成する最高希釈から開始）

値は、1.0mlのサンプル接種物を使用してTCID₅₀ / mLに変換された。

ウイルス量の計算:

- キャリアあたりのウイルス量（Log₁₀ TCID₅₀）
=ウイルス力価（Log₁₀ TCID₅₀ / mL）+ Log₁₀ [サンプルあたりの量(ml)]

計算 (前項から続く)

ウイルス減少の計算:

$$\text{Log}_{10} \text{ 減少量} = \text{初期ウイルス量 (Log}_{10} \text{ TCID}_{50}^*) - \text{出力ウイルス量 (Log}_{10} \text{ TCID}_{50}^*)$$

* 分析された容量およびキャリアあたり

結果

結果は表1-5に記載。

Key (すべての表に対応):

- T/y = 接種されたyウェルで観察された細胞毒性; ウイルスの細胞変性効果 (CPE) を決定できなかった。
- X/y = 接種されたyウェルのうちXウェルは陽性のウイルス細胞変性効果を示した。
- O/y = 接種されたyウェルのうちOは陽性のウイルスCPEを示した。接種されたウェルのいずれにも細胞毒性または細菌汚染は観察されなかった。

表 1
プレート回復制御 (PRC)

希釈*	PRC
10 ⁻³	4/4
10 ⁻⁴	4/4
10 ⁻⁵	4/4
10 ⁻⁶	3/4
10 ⁻⁷	0/4
10 ⁻⁸	0/4
力価(Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)	6.25
ウイルス量 (Log ₁₀ TCID ₅₀)**	5.85

*希釈とは、ウイルス接種物からの希釈の倍数を指す。

**1キャリアあたり (0.40mlの未希釈[10⁰])

結果 (前項から続く)

表 2
テスト物質

希釈*	TMXP AE		
	ロット番号 TMXP AE-200326-1	ロット番号 TMXP AE-200326-2	ロット番号 TMXP AE-200326-3
10 ⁻²	T/4	T/4	T/4
10 ⁻³	0/4	0/4	0/4
10 ⁻⁴	0/4	0/4	0/4
10 ⁻⁵	0/4	0/4	0/4
10 ⁻⁶	0/4	0/4	0/4
10 ⁻⁷	0/4	0/4	0/4
力価 (Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)	≤ 2.50	≤ 2.50	≤ 2.50
ウイルス量 (Log ₁₀ TCID ₅₀)**	≤ 2.10	≤ 2.10	≤ 2.10
Log ₁₀ 減少量***	≥ 3.75	≥ 3.75	≥ 3.75

* 希釈とは、ウイルス接種物からの希釈の倍数を指す。

** 1キャリアあたり (0.40mlの未希釈[100])

*** 分析された容量およびキャリアあたり

表 3
中和剤の有効性ウイルス干渉 (NE/VI) および細胞毒性 (CT) の制御

希釈*	TMXP AE					
	ロット番号 TMXP AE-200326-1		ロット番号 TMXP AE-200326-2		ロット番号 TMXP AE-200326-3	
	NE/VI	CT	NE/VI	CT	NE/VI	CT
10 ⁻²	T/4	T/4	T/4	T/4	T/4	T/4
10 ⁻³	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4
10 ⁻⁴	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4

* 希釈とは、ウイルス接種物からの希釈の倍数を指す。

結果 (前項から続く)

表 4
細胞生存率制御 (CVC)

CVC
0/4
細胞は生存。培地は無菌。

表 5
ウイルスストック力価コントロール (VST)

希釈*	VST
10 ⁻³	4/4
10 ⁻⁴	4/4
10 ⁻⁵	4/4
10 ⁻⁶	4/4
10 ⁻⁷	1/4
10 ⁻⁸	0/4
力価 (Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)	6.75

*希釈とは、ウイルス接種物からの希釈の倍数を指す。

試験物質評価基準

米国環境保護庁によると、以下の基準を満たした場合、試験物質は試験に合格するものとする。

- 試験物質は、中和のレベルを考慮に入れて、細胞毒性の存在下または非存在下で、各試験担体で3以上のLog₁₀の減少を示さなければならない。細胞毒性が存在する場合は、必要に応じてウイルス制御力価を上げて、細胞毒性および中和レベルを超えて各表面でウイルス力価が3log₁₀以上減少することを示す必要がある。

結論

試験の結果、TMXPAE-200326-1、TMXPAE-200326-2、TMXPAE-200326-3のすべてのロットにおいて、5.0%の新生子牛血清を含み、室温21°C、相対湿度34-35%で55秒間試験物質に曝露されたS A R S 関連コロナウイルス2 (SARS-CoV- 2)(COVID-19ウイルス) は完全な不活化を示した。

すべての制御は有効なテスト基準を満たしている。これらの結論は観察データに基づいたものである。

参照

1. ASTM E1053-20 : 無生物の非多孔質環境表面の消毒を目的とした化学物質のウイルス活性を評価するための標準試験方法。ASTMインターナショナル、ペンシルベニア州西コンショホッケン、2020年。
2. 米国環境保護庁化学物質安全および汚染防止局、製品性能試験ガイドラインOCSP 810.2200 : 環境表面で使用するための消毒剤、有効性試験のガイダンス、2018年2月。
3. 米国環境保護庁化学物質安全および汚染防止局、製品性能試験ガイドラインOCSP 810.2000 : 公衆衛生抗菌農薬の試験に関する一般的な考慮事項、有効性試験のガイダンス、2018年2月。
4. 米国環境保護庁化学物質安全および汚染防止局、2018シリーズ810のよくある質問-製品性能試験ガイドライン : 抗菌効果試験ガイドライン、2019年8月。
5. カナダ保健省2020年4月ガイダンス文書-消毒薬。
6. カナダ保健省2020年4月ガイダンス文書-表面消毒薬の安全性と有効性の要件。
7. 米国環境保護庁農薬プログラム局微生物学研究所SOP MB-30-02 : 抗菌製品の調製のための硬水およびその他の希釈剤の調製のための標準操作手順、2019年8月21日。
8. 公式分析化学者協会 (AOAC) インターナショナル、公式メソッド960.09 : 消毒剤の殺菌および洗剤消毒作用。AOACの公式分析方法、2013年版。
9. 経済協力開発機構 (OECD) 、硬い非多孔質表面で使用される殺菌剤の活性を評価するための定量的方法に関するガイダンス文書、2013年6月21日。試験評価No.187シリーズおよび殺生物剤No.6シリーズ。

APPENDIX I



Microbac Protocol

VIRUCIDAL HARD-SURFACE EFFICACY TEST -

Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (COVID-19 Virus)

Testing Facility

Microbac Laboratories, Inc.
105 Carpenter Drive
Sterling, VA 20164

Prepared for

Laboratoire M2
4005-A, Rue de la Garlock
Sherbrooke (Québec) J1L 1W9
Canada

April 30, 2020

Microbac Protocol: 596.1.04.13.20

Microbac Project: 5910-102

Microbac Laboratories, Inc.
105 Carpenter Drive | Sterling, VA 20164 | 703.925.0100 p | 703.925.9366 f | www.microbac.com

OBJECTIVE:

This test is designed to substantiate virucidal effectiveness claims for a liquid or spray test substance to be labeled as a virucide. It determines the potential of the test substance to disinfect hard surfaces contaminated with the test virus. The test is designed to simulate consumer use and conforms to EPA OCSPP 810.2000 (2018) and 810.2200 (2018) Product Performance Test Guidelines, Frequently Asked Questions (FAQ) for OCSPP 810.2000 (2018), 810.2100 (2018), and 810.2200 (2018), as well as the Health Canada “Guidance Document – Safety and Efficacy Requirements for Hard Surface Disinfectant Drugs” (January 2014). This protocol follows the procedure outlined in the ASTM International test method designated E1053-20, “Standard Test Method to Assess Virucidal Activity of Chemicals Intended for Disinfection of Inanimate, Nonporous Environmental Surfaces”. The study design also aligns with EPA guidance provided to Scientific & Regulatory Consultants, Inc. (Letter from K. Willis, EPA OPP AD Science Branch Chief, March 25, 2020).

TESTING CONDITIONS:

Virus will be dried on a suitable sterile hard surface at ambient temperature. Three lots of one test substance (liquid) will be tested in compliance with the EPA Lower Certified Limit Policy in 810.2000 at one contact time and one replicate (N=1). The test substance will be used to treat the dried virus on a glass Petri dish carrier. One carrier will be tested for each lot of test substance and the appropriate controls. After a defined exposure period as specified by the Sponsor, the test substance-virus mixture will be neutralized, scraped off from the surface, collected, and tested for the presence of infectious virions.

MATERIALS:

- A. Test, control and reference substances will be supplied by the Sponsor of the study. Microbac will append the Sponsor-provided Certificate(s) of Analysis (CoA) to this study report, as per CFR 40.160.105:
- The identity, strength, purity, and composition, or other characteristics which will appropriately define the test, control, or reference substance shall be determined and shall be documented by the Sponsor before its use in a study. Methods of synthesis, fabrication, or derivation of the test, control, or reference substance shall be documented and retained by the Sponsor.

When relevant to the conduct of the study the solubility of each test, control, or reference substance shall be determined by the Sponsor before the experimental start date. The stability of the test, control, or reference substance shall be determined by the Sponsor before the experimental start date or concomitantly according to written standard operating procedures, which provide for periodic analysis.

The test substance will be tested as supplied by the Sponsor unless directed otherwise. All operations performed on the test substance such as dilution or specialized storage conditions must be specified by the Sponsor before initiation of testing.

The Sponsor assures Microbac testing facility management that the test substance/formulation has been appropriately tested for identity, strength, purity, stability, and uniformity as applicable.

Microbac will retain all unused test substances for a period of one year upon completion of the test, and then discard them in a manner that meets the approval of the safety officer or return them to the Sponsor. The test materials and the paper records will be retained in accordance with FIFRA. Microbac will contact the Study Sponsor to arrange for transfer of records when/if the test substance is returned to the Sponsor.

B. Materials supplied by Microbac, including, but not limited to:

1. Challenge virus (requested by the Sponsor of the study): Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (COVID-19 Virus) (SARS-Related Coronavirus 2), Strain: USA-WA1/2020, Source: BEI Resources, NR-52281. Strain USA-WA1/2020 was isolated from an oropharyngeal swab from a patient with a respiratory illness who had recently returned from travel to the affected region of China and developed clinical disease (COVID-19) in January 2020 in Washington, USA (<https://www.beiresources.org/Catalog/animalviruses/NR-52281.aspx>).
2. Host cell line: Vero E6 cells, ATCC CRL-1586
3. Laboratory equipment and supplies.

4. Fetal Bovine Serum or another appropriate source of serum as the soil load used for testing with SARS-CoV-2 (if applicable) as requested by the Sponsor.
5. Media and reagents:

Media and reagents relevant to the virus-host system and test substance being tested will be documented in the first project sheet and data pack.

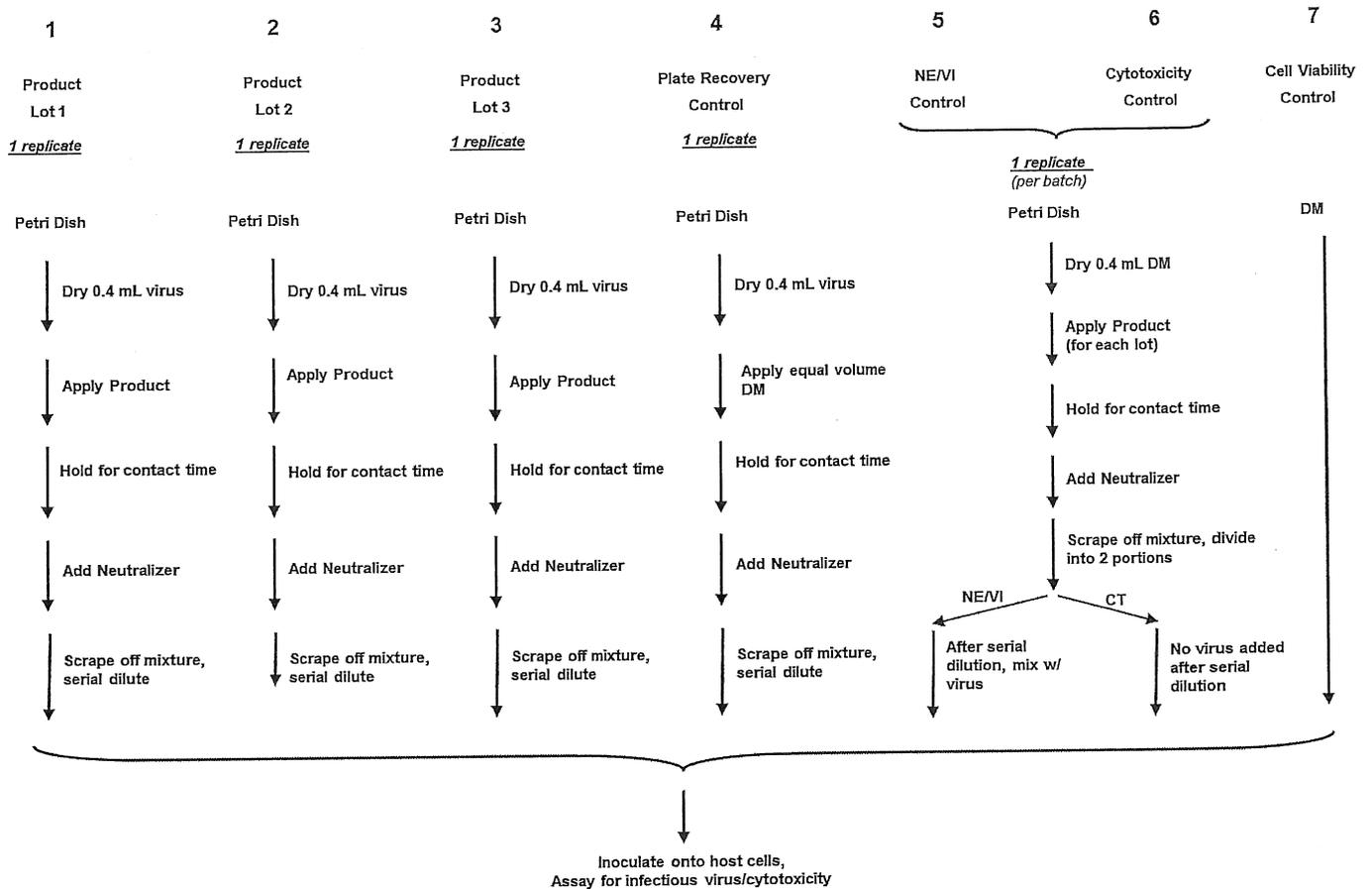
TEST SYSTEM IDENTIFICATION:

All Petri dishes, dilution tube racks, and host-containing apparatus will be appropriately labeled with the following information: virus, host, and test substance and/or project number.

EXPERIMENTAL DESIGN:

All of the procedures involved in performance of this study are described in a detailed series of SOPs that are maintained at Microbac. SOPs and Logs are referred to in the raw data and are required as part of GLP regulations. The study flow diagram is shown in Figure 1, with details described in the following sections.

FIGURE 1



DM: Dilution Medium

NE/VI: Neutralizer Effectiveness/Viral Interference control CT: Cytotoxicity Control

Note: One test substance, three lots, will be tested at one exposure (contact) time and one replicate (N=1). The NE/VI and CT controls will be performed at one replicate per lot.

A. Inoculum preparation:

Viral stocks are purchased from reputable sources that identify them by scientifically accepted methods and may have been further propagated at Microbac. Records are maintained that demonstrate the origin of the virus. The virus stocks are stored at an ultra-low temperature.

Frozen viral stocks will be thawed on the day of the test. Serum will be added to the viral stock to achieve an organic load of 5.0% (if not already 5.0%), unless otherwise directed by the Sponsor and pre-agreed by Microbac. If the challenge virus culture is

standardized by concentration or dilution, or if a column is used, these manipulations must be documented and reported.

Note: A level of approximately 4.8 – 6.3 Log₁₀ virus challenge per carrier (as indicated by the plate recovery control load) when there is no cytotoxicity associated with the test substance, or approximately 3.0 – 4.5 Log₁₀ per carrier beyond the level of cytotoxicity when present, should be achieved whenever possible.

B. Carrier preparation:

For each lot of the test substance an aliquot of 0.4 mL of stock virus will be added, and spread with a cell scraper over the bottom of pre-sterilized glass Petri dishes (100mm diameter). This volume will remain consistent among all test and control runs. Carriers treated with virus will be dried at ambient temperature. The drying time, temperature, and relative humidity will be recorded and reported.

One carrier will be prepared for each lot of the test substance using virus. One carrier will be prepared for the plate recovery control using virus. Additionally, one carrier will be prepared for each lot of test substance for the neutralizer effectiveness/viral interference and cytotoxicity controls using dilution media in lieu of virus as the inoculum.

C. Test substance preparation:

Note: Information on the identity, strength, purity, stability, uniformity, and dose solution analysis of the test substance/formulation resides with the Sponsor of the study.

The test substance will be prepared exactly according to the Sponsor's directions (if provided). If the Sponsor requests dilution of the test substance, the diluted test substance will be used for testing within three hours of preparation. The prepared test substance, if not within the stipulated test temperature range, will be pre-equilibrated to the test temperature prior to use in the study as applicable.

D. Test:

Three lots of the test substance (liquid) will be tested at one contact time and one replicate (N=1). Note: The temperature and relative humidity during the exposure period will be recorded and reported.

For direct liquid application test substance, for each run, after the inoculum has dried, 2.0 mL of the test substance will be added. After addition, a stopwatch will immediately be started to measure the contact time. The dried virus film must be completely covered by the test substance. The plates will remain at the temperature and for the time specified by the Sponsor. After the contact period, the test substance will be neutralized with 2.0 mL of appropriate neutralizer and the mixture will be scraped from the surface of the dish with a cell scraper. This post-neutralized sample (PNS) will be considered approximately a 10^{-1} dilution. The temperature and relative humidity during the exposure period will be recorded and reported.

For a spray application test substance, an aliquot of the test substance, ready-to-use, will be dispensed into a sterilized spray bottle, if not provided by the Sponsor. Unless otherwise directed by the Sponsor, the spray bottle will then be shaken 2 – 3 times to ensure homogeneity and sprayed to charge the spray bottle. A mock spray action will be performed by applying the test substance as the Sponsor directs onto at least two blank Petri dishes. Then the volume dispensed onto each dish will be measured and averaged. This averaged volume from the mock spray runs will be used for the neutralizer volume for all applicable runs and for the Plate recovery control runs. The test substance will be sprayed onto the virus carriers in a horizontal position until thoroughly wet from a distance of 6" – 8" or as directed by the Sponsor. Each carrier will be held in a horizontal position for the exposure time as specified by the Sponsor. After the contact period, the test substance will be neutralized with an appropriate neutralizer using the averaged volume from the mock spray runs. The neutralizer-test substance mixture will be scraped off from the surface of the dish with a cell scraper. This post-neutralized sample (PNS) will be considered approximately a 10^{-1} dilution. The temperature and relative humidity during the exposure period will be recorded and reported.

If Sephacryl columns are used to aid in the neutralization and to further reduce the cytotoxicity, each inoculum/test substance/neutralizer mixture sample will be loaded onto a pre-spun Sephacryl column. Following the passage through columns, the eluates will be aseptically collected and serially ten-fold diluted in DM. If columns are not used, serial ten-fold dilutions of the inoculum/test substance/neutralizer mixture will directly be prepared in DM.

E. Infectivity assay:

The residual infectious virus in all test and control samples will be detected by viral-induced cytopathic effect (CPE).

Selected dilutions of the neutralized inoculum/test substance mixture (test samples) and control samples will be added to cultured host cells (at least four wells per dilution, per reaction mixture) and incubated at $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ with $5\pm 3\%$ CO_2 for total 4 – 9 days. The host cells may be washed twice with phosphate buffered saline prior to inoculation. The inoculated culture will be observed and refed with fresh media as necessary, during the incubation period. These activities, if applicable, will be recorded. The host cells will then be examined microscopically for presence of infectious virions. The resulting virus-specific CPE and test substance-specific cytotoxic effects will be scored by examining all test and control samples. These observations will be recorded.

F. Controls:

1. Plate recovery control (PRC):

This concurrent control will be performed with a single inoculated carrier, concurrently with the test substance runs. The temperature and relative humidity during the exposure period will be recorded and reported.

The virus inoculum will be spread over the surface of a sterile glass Petri dish and left to dry at ambient temperature. A volume of DM equivalent to that of the test substance will be added to the dried virus and the plate held for the Sponsor requested contact time at the requested exposure temperature. Post-contact time, virus will be subjected to the identical neutralization procedure as used for the test substance. Serial 10-fold dilutions of the samples will be prepared in DM and selected dilutions of the sample will be added to cultured cell monolayers at a minimum of four wells per dilution per sample, as described in Section E “Infectivity Assay”. This control will determine the relative loss in virus infectivity resulting from drying and neutralization alone.

To achieve a valid test, at least 4.8-Log_{10} of infectious virus per carrier must be recovered from this control following drying and neutralization. The titer from this control will be used to calculate the \log_{10} reduction of the virus titer

post treatment with the test substance (see below).

2. Neutralizer effectiveness/Viral interference control (NE/VI):

This concurrent control will determine if residual active ingredient is present after neutralization and if the neutralized test substance interferes with the virus infection system. This control will be performed for each lot of test substance at one replicate per lot concurrently with testing. The temperature and relative humidity during the exposure period will be recorded and reported.

The test substance will be processed exactly as the test procedure but in lieu of virus inoculum, dried DM will be exposed to the test substance and assayed as previously described. Post-treatment and neutralization, the neutralized DM/test substance mixture will be divided into two portions, one for the cytotoxicity control and the other for the neutralizer effectiveness/viral interference control and processed as in the test.

If columns are used, each portion will be passed through individual columns and the eluate will be serially diluted ten-fold in DM. If columns are not used, each portion will be directly diluted using serial ten-fold dilutions in DM.

The neutralizer effectiveness/viral interference control sample will be diluted as follows: using dilution test tubes and appropriate pipette, an aliquot of the PNS will be used for making serial 10-fold dilutions in DM (for example, 0.5 mL sample + 4.5 mL DM). Following serial dilution, 0.1 mL of a low titered virus, containing approximately 1,000 – 5,000 infectious units of virus, will be added to 4.5 mL of each dilution and held for a period of no shorter than the contact time.

Selected dilutions of these samples will be added to cultured cell monolayers at a minimum of four wells per dilution per sample, as described in the “Infectivity Assay” section.

3. Cytotoxicity control (CT):

This concurrent control will be performed for each lot of test substance at one replicate per lot.

The cytotoxicity sample, acquired from the neutralizer effectiveness/viral interference control run, will be diluted and have no virus added. Selected dilutions will be inoculated onto host cells and incubated in the same manner as the rest of the test and control samples. Cytotoxicity will be scored at the same time as the test samples; cytotoxic effects are distinct from virus-induced cytopathic effects, which will be evident in the plate recovery control cultures.

4. Column titer control (to be performed only if a Sephacryl column is used):

This concurrent control will be performed to determine any affect the columns may have on infectious virus titer. It will be performed in a single run.

The sample for this control will be acquired from a portion of the PRC, prior to passing through the columns and will be serially diluted in DM, then processed in the same manner as the test.

5. Cell viability control:

This concurrent control will be performed in a single run. It will demonstrate that cells remain viable throughout the course of the assay period. In addition, it will confirm the sterility of the DM employed throughout the assay period. At least four wells of cells will receive only DM and will be incubated and processed with both test and other controls. This will serve as the negative control.

6. Virus Stock Titer control (VST)

This concurrent control will be performed in a single run. An aliquot of the virus used in the study will be directly serially diluted and inoculated onto the host cells to confirm the titer of the stock virus. This control will demonstrate that the titer of the stock virus is appropriate for use and that the viral infectivity assay is performed appropriately.

G. Calculation:

The 50% tissue culture infective dose per mL (TCID₅₀/mL) will be determined using the method of Spearman-Kärber (Kärber G., Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 1931, 162: 480-483). The TCID₅₀/carrier, i.e., the viral load per carrier, will be calculated as follows:

The Virus Load (TCID₅₀/carrier) will be calculated in the following manner:

Virus Load (Log₁₀ TCID₅₀) = Virus Titer (Log₁₀ TCID₅₀/mL) + Log₁₀ [Volume per sample (mL)]

The Log₁₀ Reduction Factor (LRF) will be calculated in the following manner:

Log₁₀ Reduction Factor = Initial viral load (Log₁₀ TCID₅₀, per assayed volume and per carrier) – Output viral load (Log₁₀ TCID₅₀, per assayed volume and per carrier)

These analyses will be described in detail in the final report. The test results will be reported as the log₁₀ reduction of the virus titer per carrier and per volume post-treatment with the test substance.

TEST ACCEPTANCE CRITERIA:

The test will be acceptable for evaluation of the test results if the criteria listed below are satisfied. The study director may consider other causes that may affect test reliability and acceptance.

- The infectious virus recovered from the PRC control must be at least 4.8 log₁₀ TCID₅₀ units per carrier.
- Viral-induced cytopathic effect must be distinguishable from test substance induced cytotoxic effects (if any).
- Virus must be recovered from the neutralizer effectiveness/viral interference control (not exhibiting cytotoxicity).
- The Cell Viability Control (assay negative control) must not exhibit virus.

TEST SUBSTANCE EVALUATION CRITERIA:

According to the US Environmental Protection Agency, the test substance passes the test if the following are met:

- The product must demonstrate a ≥ 3 log₁₀ reduction on each surface in the presence or absence of cytotoxicity and taking into account the level of neutralization; and
- If cytotoxicity is present, the virus control titer should be increased, if necessary, to demonstrate a ≥ 3 log₁₀ reduction in viral titer on each surface beyond the cytotoxic and neutralization level.

PERSONNEL AND TESTING FACILITIES:

A study director will be assigned prior to initiation of the test. Resumes are maintained and are available on request. This study will be conducted at Microbac Laboratories, Inc., 105 Carpenter Drive, Sterling, Virginia 20164.

REGULATORY COMPLIANCE AND QUALITY ASSURANCE (GLP studies only):

This study will be performed in compliance with the US Environmental Protection Agency's Good Laboratory Practices (GLP) regulations, 40 CFR 160 (note: information on the identity, strength, purity, stability, uniformity, and dose solution analysis of the test substance/formula resides with the Sponsor of the study unless otherwise stated).

The Quality Assurance Unit of Microbac will inspect the conduct of the study for GLP compliance. The dates and a description of the phase(s) inspected, and the dates that findings are reported to management and the study director will be included in the final report.

PROTOCOL AMENDMENTS AND DEVIATIONS:

Any protocol amendment(s) and protocol deviation(s) identified will be reported in project sheet(s) and included in the final report.

REPORT FORMAT:

A draft report will be provided to the Sponsor for review prior to finalization. The report will contain all items required by EPA GLP (40 CFR Part 160.185), EPA 810.2000 (2018) and 810.2200 (2018) and be in compliance with EPA PR Notice 2011-3. Microbac employs a standard report format for each test design. Each final report will provide all the information in the citations above including (but not limited to):

- Sponsor identification
- Test substance identification
- Manufacture date for each product lot
- Type of assay and project number
- Study start and end time (clock time)
- Interpretation of results and conclusions

- Test results presented in tabular form
- Methods and evaluation criteria
- Description of protocol deviations and protocol amendments (if applicable)
- Dates of study initiation and completion (GLP studies only)
- Signed Quality Assurance and Compliance Statements (GLP studies only)
- Certificate of Analysis for each test lot (for GLP studies only; if provided by the Sponsor)
- List of personnel (and respective titles) involved in the study

RECORDS TO BE MAINTAINED:

For all GLP studies, the original signed final report or an electronic copy will be sent to the Sponsor. The original signed final report, or a copy thereof, will be maintained in the study file. If requested, a draft report will be provided to the Sponsor for review prior to finalization of the report.

All raw data, protocol, protocol modifications, test substance records, the final report (or copy thereof), and correspondence between Microbac and the Sponsor will be stored in the archives at Microbac Laboratories, Inc., 105 Carpenter Drive, Sterling, Virginia 20164 or in a controlled facility off site.

All changes or revisions to this approved protocol will be documented, signed by the study director, dated and maintained with this protocol. The Sponsor will be notified of any change, resolution, and impact on the study as soon as practical.

The proposed experimental start and termination dates, additional information about the test substance, challenge virus identity, host cell line monolayers, and the type of neutralizers employed in the test will be addressed in a project sheet issued separately for each study. The date the study director signs the protocol will be the study initiation date. All project sheets issued containing protocol amendments or deviations will be forwarded to the study Sponsor for approval and signature.

REFERENCES (if applicable)

1. ASTM E1053-20, Standard Test Method to Assess Virucidal Activity of Chemicals Intended for Disinfection of Inanimate, Nonporous Environmental Surfaces, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2020.
2. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Product Performance Test Guidelines, OCSPP 810.2200: Disinfectants for Use on Environmental Surfaces, Guidance for Efficacy Testing, February 2018.
3. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Product Performance Test Guidelines, OCSPP 810.2000: General Considerations for Testing Public Health Antimicrobial Pesticides, Guidance for Efficacy Testing, February 2018.
4. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Product Performance Test Guidelines, Frequently Asked Questions (FAQ) for OCSPP 810.2000, 810.2100, and 810.2200, August 2019.
5. Health Canada, January 2014. Guidance Document – Disinfectant Drugs.
6. Health Canada, January 2014. Guidance Document – Safety and Efficacy Requirements for Hard Surface Disinfectant Drugs.
7. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs Microbiology Laboratory SOP MB-30-02: Standard Operating Procedure for Preparation of Hard Water and Other Diluents for Preparation of Antimicrobial Products, August 21, 2019.
8. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, Official Method 960.09: Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants. Official Methods of Analysis of the AOAC, 2013 edition.
9. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidance Document on Quantitative Methods for Evaluating the Activity of Microbicides Used on Hard Non-Porous Surfaces. Series on Testing Assessment No. 187 and Series on Biocides No. 6, June 21, 2013.

MISCELLANEOUS INFORMATION:

The following information is to be completed by the Sponsor prior to initiation of the study (please check all applicable open boxes):

B. Test substance information:

Test substance name	TMXPAE		
EPA Reg. No.	87742-1	87742-1	87742-1
Test substance lot numbers	TMXPAE-200326-1	TMXPAE-200326-2	TMXPAE-200326-3
Manufacture Date	03/26/2020	03/26/2020	03/26/2020
Expiration Date	03/26/2021	03/26/2021	03/26/2021
Active ingredient(s)	Batch TMXPAE-200326-1: 0.212% Thymol Batch TMXPAE-200326-2: 0.213% Thymol Batch TMXPAE-200326-3: 0.208% Thymol		
Test substance storage conditions	<input checked="" type="checkbox"/> Ambient <input type="checkbox"/> Refrigerated <input type="checkbox"/> Other: _____		
Level of active ingredients in testing	<input checked="" type="checkbox"/> Lower Certified Limit (LCL) <input type="checkbox"/> At or below nominal		
SDS provided	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	C of A provided	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Dilution	<input checked="" type="checkbox"/> Ready to use: See below* <input checked="" type="checkbox"/> See below* (See below* parts test substance + See below* parts diluent)		
Diluent	<input type="checkbox"/> Not applicable <input type="checkbox"/> 400 ppm ± 2.9% AOAC hard water <input type="checkbox"/> 375 ppm OECD hard water (acceptable range: 338-394 ppm) <input type="checkbox"/> 200 ppm unsoftened tap water (acceptable range: 180-210 ppm) <input checked="" type="checkbox"/> Other: <u>sterile DI water</u>		
Contact time	55 seconds		
Contact temperature	<input checked="" type="checkbox"/> Room Temperature (20±1°C) <input type="checkbox"/> Other : _____		
Organic Load	<input type="checkbox"/> 5.0% serum in viral inoculum <input checked="" type="checkbox"/> Other: <u>5.0% FBS in viral inoculum</u>		

*Dilutions for testing:

- Batch TMXPAE-200326-1 - Dilute 1:1.03 (1 part test substance + 0.03 parts diluent)
- Batch TMXPAE-200326-2 – Dilute 1:1.03 (1 part test substance + 0.03 parts diluent)
- Batch TMXPAE-200326-3 - Ready to Use (no dilution)

Test substance information (continued):

Test substance preparation (spray)	<input type="checkbox"/> Shake sprayer _____ times and spray into waste container to prime before use <input type="checkbox"/> Do not shake sprayer; spray into waste container to prime before use <small>Invert (do not shake) sprayer at least three times and spray into waste container to</small> <input checked="" type="checkbox"/> Other: <u>prime before use</u> <input type="checkbox"/> Not applicable
Test substance application	<input type="checkbox"/> Apply directly to dried virus via pipetting <input checked="" type="checkbox"/> Spray from <u>6-8"</u> inches using <u>≥ 4</u> sprays or until thoroughly wet <input type="checkbox"/> Spray from _____ inches for _____ seconds or until thoroughly wet <input type="checkbox"/> Other: _____
Study conduct	<input checked="" type="checkbox"/> GLP <input type="checkbox"/> Non-GLP
Report submission	<input checked="" type="checkbox"/> EPA <input checked="" type="checkbox"/> Health Canada <input type="checkbox"/> Other: _____

PROTOCOL APPROVAL BY SPONSOR:

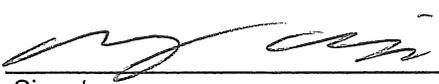
Sponsor Signature: Denise Burnside Date: 05/08/2020

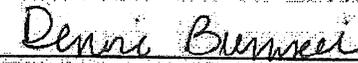
Printed Name: Denise Burnside, Agent for Laboratoire M2

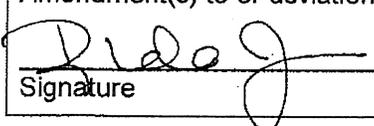
PROTOCOL APPROVAL BY STUDY DIRECTOR (Microbac):

Study Director Signature: Cory Chiossone Date: 06/02/2020

Printed Name: Cory Chiossone

Date Issued: 06/02/20		Project Sheet No. 1		Page No. 1		Laboratory Project Identification No. 596-102	
STUDY TITLE: VIRUCIDAL HARD-SURFACE EFFICACY TEST – Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (COVID-19 Virus)				STUDY DIRECTOR: Cory Chiossone			
				 Signature		06/02/20 Date	
TEST MATERIAL(S): TMXPAE		LOT NO. TMXPAE-200326-1 TMXPAE-200326-2 TMXPAE-200326-3		DATE RECEIVED: 04/01/20 04/01/20 04/01/20		DS NO. K346 K347 K348	
PERFORMING DEPARTMENT(S): Virology and Toxicology		STORAGE CONDITIONS: Location: F5 <input 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:					
PROTECTIVE PRECAUTION REQUIRED: MSDS <input checked="" type="checkbox"/> Yes / <input type="checkbox"/> No							
PHYSICAL DESCRIPTION: <input type="checkbox"/> Solid <input checked="" type="checkbox"/> Liquid <input type="checkbox"/> Aerosol							
PURPOSE: See attached protocol. AUTHORIZATION: See client signature.							
PROPOSED EXPERIMENTAL START DATE: 06/02/20 TERMINATION DATE: 06/10/20							
CONDUCT OF STUDY: <input type="checkbox"/> FDA <input checked="" type="checkbox"/> EPA <input type="checkbox"/> R&D <input checked="" type="checkbox"/> GLP <input type="checkbox"/> GCP <input checked="" type="checkbox"/> Other: Health Canada							
SPONSOR: Laboratoire M2 4005-A, Rue de la Garlock Sherbrooke (Québec) J1L 1W9 Canada				CONTACT PERSON: Denise Burnside dburnside@srccconsultants.com			
TEST CONDITIONS:							
Challenge organisms:		Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (COVID-19 Virus), Strain USA-WA1/2020; BEI Resources, NR-52281					
Host:		Vero E6 cells, ATCC CRL-1586					
Organic load:		5.0% Newborn Calf Serum in viral inoculum					
Disinfectant application:		Spray from 6-8 inches using ≥ 4 sprays until thoroughly wet.					
Active Ingredient:		0.212% Thymol (K346), 0.213% Thymol (K347), 0.208% Thymol (K348)					
Dilution medium:		Minimum Essential Medium (MEM) + 2% Newborn Calf Serum (NCS)					
Dilution:		1:1.03 (1 part test substance + 0.03 parts diluent) (K346 and K347), Ready to use (K348)					
Diluent:		Sterile DI Water					
Neutralizer(s):		MEM + 10% NCS + 0.5 % polysorbate-80 + 0.5% lecithin + 3% HEPES + 0.025N NaOH					
Contact time:		55 seconds					
Contact temperature:		Ambient room temperature (20±1°C)					
Incubation time(s):		4 – 9 days					
Incubation temperature(s):		36±2C in 5±3% CO ₂					
PROTOCOL AMENDMENTS:							
1. Protocol page 15 states that the organic load will be Fetal Bovine Serum. The organic load will actually be Newborn Calf Serum. This amendment serves to correct the organic load source on protocol page 15.							

Date Issued: 07/27/20		Project Sheet No. 2		Page No. 1		Laboratory Project Identification No. 596-102	
STUDY TITLE: VIRUCIDAL HARD-SURFACE EFFICACY TEST – Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (COVID-19 Virus)				STUDY DIRECTOR: Cory Chiossone			
				Signature 		Date 07/30/20	
TEST MATERIAL(S): TMXPAE		LOT NO.: TMXPAE-200326-1 TMXPAE-200326-2 TMXPAE-200326-3		DATE RECEIVED: 04/01/20 04/01/20 04/01/20		DS NO.: K346 K347 K348	
PERFORMING DEPARTMENT(S): Virology and Toxicology		STORAGE CONDITIONS: Location: F5 <input 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:					
CONDUCT OF STUDY: <input type="checkbox"/> FDA <input checked="" type="checkbox"/> EPA <input type="checkbox"/> R&D <input checked="" type="checkbox"/> GLP <input type="checkbox"/> GCP <input checked="" type="checkbox"/> Other: Health Canada							
SPONSOR: Laboratoire M2 4005-A, Rue de la Garlock Sherbrooke (Québec) J1L 1W9 Canada				CONTACT PERSON: Denise Burnside dburnside@sroconsultants.com			
PROTOCOL AMENDMENTS:							
2. Protocol References section, reference 4, is listed as: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Product Performance Test Guidelines: Frequently Asked Questions (FAQ) for OCSPP 810.2000, 810.2100, and 810.2200, August 2019. The reference should be instead: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Frequent Questions for the 2018 Series 810-Product Performance Test Guidelines: Antimicrobial Efficacy Test Guidelines, August 2019. This amendment serves to correct reference 4 in the References section of the protocol.							
3. The References section of the Protocol give References 5 and 6 as: 5. Health Canada, January 2014. Guidance Document – Disinfectant Drugs. 6. Health Canada, January 2014. Guidance Document – Safety and Efficacy Requirements for Hard Surface Disinfectant Drugs. These references should be: 5. Health Canada, April 2020. Guidance Document – Disinfectant Drugs. 6. Health Canada, April 2020. Guidance Document – Safety and Efficacy Requirements for Surface Disinfectant Drugs. This amendment serves to update references 5 and 6 in the References section of the Protocol.							
4. The records to be maintained section of the protocol states that all protocol amendments and deviations will be sent to Sponsor for approval and signature. It should state that "all protocol amendments and deviations related to test procedure will be sent to Sponsor for approval and signature". This amendment serves to clarify the protocol regarding this statement.							
Amendment(s) to or deviation(s) from the protocol accepted by the sponsor:							
Signature 				Date 07/30/2020			

Date Issued: 08/20/20		Project Sheet No. 3		Page No. 1		Laboratory Project Identification No. 596-102	
STUDY TITLE: VIRUCIDAL HARD-SURFACE EFFICACY TEST – Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (COVID-19 Virus)				STUDY DIRECTOR: Cory Chiossone 			
				Signature _____		Date 08/21/20	
TEST MATERIAL(S): TMXPAE				LOT NO. TMXPAE-200326-1 TMXPAE-200326-2 TMXPAE-200326-3		DATE RECEIVED: 04/01/20 04/01/20 04/01/20	
				DS NO. K346 K347 K348			
PERFORMING DEPARTMENT(S): Virology and Toxicology				STORAGE CONDITIONS: Location: F5 <input 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:			
CONDUCT OF STUDY: <input type="checkbox"/> FDA <input checked="" type="checkbox"/> EPA <input type="checkbox"/> R&D <input checked="" type="checkbox"/> GLP <input type="checkbox"/> GCP <input checked="" type="checkbox"/> Other: Health Canada							
SPONSOR: Laboratoire M2 4005-A, Rue de la Garlock Sherbrooke (Québec) J1L 1W9 Canada				CONTACT PERSON: Rhonda Jones rjones@srcconsultants.com			
PROTOCOL AMENDMENTS: 5. The test substance preparation section states "The prepared test substance, if not within the stipulated test temperature range, will be pre-equilibrated to the test temperature prior to use in the study as applicable". To clarify, it should state, "If the test temperature and the test substance (or prepared test substance, as applicable) temperature are ambient, no pre-equilibration is required. If either temperature is non-ambient, the test substance (or prepared test substance, as applicable) to be used in testing must be pre-equilibrated to the test temperature prior to use in the study". This amendment serves to clarify the test substance preparation section.							
Amendment(s) to or deviation(s) from the protocol accepted by the sponsor:							
				8-21-20			
Signature				Date			

APPENDIX II

APPENDIX B: CERTIFICATES OF ANALYSIS

Product Safety Labs

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product: TMXPAE

Lot #: TMXPAE-200326-1

PSL Reference No.: 200331-4D

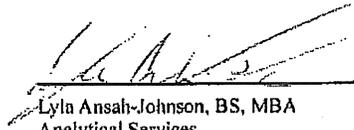
Date of Analysis: April 2, 2020

Date of Manufacture: March 26, 2020

Result:

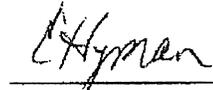
Thymol: 0.212%

Approval:


Lyla Ansah-Johnson, BS, MBA
Analytical Services
Product Safety Labs

May 4, 2020
Date

QA Release:


Quality Assurance
Product Safety Labs

May 4, 2020
Date

*This material was analyzed in compliance with Good Laboratory Practice (40 CFR 160) standards.
Data are reported in PSL GLP Study No. 52634*

Product Safety Labs

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product: TMXPAE

Lot #: TMXPAE-200326-2

PSL Reference No.: 200331-5D

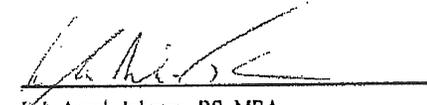
Date of Analysis: April 2, 2020

Date of Manufacture: March 26, 2020

Result:

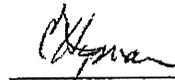
Thymol: 0.213%

Approval:


Eyla Ansah-Johnson, BS, MBA
Analytical Services
Product Safety Labs

May 4, 2020
Date

QA Release:


Quality Assurance
Product Safety Labs

May 4, 2020
Date

*This material was analyzed in compliance with Good Laboratory Practice (40 CFR 160) standards.
Data are reported in PSL GLP Study No. 52634*

Product Safety Labs

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product: TMXPAE

Lot #: TMXPAE-200326-3

PSL Reference No.: 200331-6D

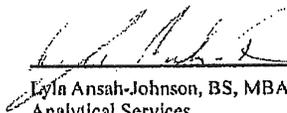
Date of Analysis: April 2, 2020

Date of Manufacture: March 26, 2020

Result:

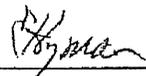
Thymol: 0.208%

Approval:


Lyla Ansah-Johnson, BS, MBA
Analytical Services
Product Safety Labs

May 4, 2020
Date

QA Release:


Quality Assurance
Product Safety Labs

May 4, 2020
Date

*This material was analyzed in compliance with Good Laboratory Practice (40 CFR 160) standards.
Data are reported in PSL GLP Study No. 52634*