

ATTIVITA' VIRUCIDA DELLA FORMULAZIONE DISINFETTANTE ADANTIUM PLUS

(US Labs S.r.L., Via Aldo Bartocci, 33, Terni, Italy)
Poliovirus e Adenovirus (EN14476:2005)

APRILE - GIUGNO 2010

Coordinatore dello studio:

Massimo Clementi,
Laboratorio di Microbiologia e Virologia
Università Vita-Salute San Raffaele, Milan
Italy

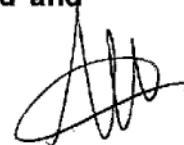
A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a final vertical stroke, located in the bottom right corner of the page.

Scopo dello studio. Il presente report descrive uno studio finalizzato alla valutazione dell'attività virucida della formulazione ADANTIUM PLUS (US Labs S.r.L., Via Aldo Bartocci, 33, Terni, Italy). Lo studio è stato condotto secondo la procedura descritta in European Standard EN 14476:2005 (phase 2; step 1)¹ valutando l'attività antivirale nei confronti di poliovirus e adenovirus.

Formulazione disinfettante in esame. La formulazione disinfettante ADANTIUM PLUS saggiata nel presente studio è stata fornita direttamente dal distributore (US Labs S.r.L., Via Aldo Bartocci, 33, Terni, Italy) in forma liquida (lotto numero 04AD44-09). Sulla base della dichiarazione del produttore, il principio attivo della formulazione è il seguente: Diphedac®, CAS 790233-27-1. La formulazione disinfettante è stata saggiata alla diluizione 2,5% e alla diluizione 0,5%.

Condizioni dello studio. Lo studio è stato condotto in condizioni di pulito (concentrazione finale nel saggio: 0,3 g. di siero albumina bovina per litro di acqua) e in condizioni di sporco (concentrazione finale nel saggio: 3,0 g. di siero albumina bovina e 0,3 ml di eritrociti per litro di acqua). In breve, il metodo di valutazione seguito nel presente studio è stato il seguente. Un'aliquota della sospensione virale è stata aggiunta al prodotto valutato in condizioni di pulito o in condizioni di sporco. La miscela virus-formulazione disinfettante è stata mantenuta a 20°C per i tempi d'incubazione selezionati. Dopo incubazione, un'aliquota è stata immediatamente raccolta e l'attività virucida è stata soppressa mediante diluizione (1:10 in *minimal essential medium* [MEM] freddo supplementato con

¹ European Committee for standardization. European standard (EN 14476:2005). Chemical disinfectants and antiseptics. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine. Test method and requirements (phase 2/step 1).



2% fetal calf serum [FCS]). Sono state quindi preparate diluizioni in ragione 10 in MEM che sono state trasferite in pozzetti di una micropiastra insieme alla sospensione cellulare (1:1; V:V). Il titolo infettante è stato successivamente calcolato mediante valutazione della ID₅₀ (diluizione della sospensione virale che è capace d'indurre effetto citopatico nel 50% dei pozzetti). In sintesi, sono state adottate le seguenti condizioni sperimentali:

- Concentrazioni di ADANTIUM PLUS testate: 2,5% e 0,5%
- Test in condizioni di pulito e in condizioni di sporco
- Temperatura: 20°C
- Tempi di contatto: 1, 5, 10 e 60 minuti

Culture cellulari e sospensione virale stock. Nel presente studio sono stati utilizzati Adenovirus type 5 (ATCC VR5) and Polivirus 1 Sabin strain. Le sospensioni stock sono state ottenute infettando monostrati cellulari di cellule HeLa confluenti al 90% coltivate in presenza di MEM supplementato del 2% di FCS. In presenza di effetto citopatico (CPE) maggiore dell'80%, cellule e supernatanti sono stati sottoposti a 3 cicli di congelamento-scongelo e successiva centrifugazione a basso numero di giri per scartare i detriti cellulari. Il titolo virale è stato determinato infettando cellule in sospensione con 0,1 ml della sospensione virale stock e successiva valutazione della ID₅₀ (Spearman-Kärber method²).

Validazione della procedura. Effetto citotossico della formulazione disinfettante e capacità del virus a replicare in cellule trattate vs. cellule non trattate. Per la validazione dello studio, 2 parti di acqua bidistillata sterile sono state aggiunte a 8 parti di formulazione in esame. Sono state successivamente preparate diluizioni in ragione 10 in

² Il metodo di Spearman-Kärber prevede che il titolo virale sia calcolato utilizzando la seguente formula:

logaritmo negativo del 50% end-point = logaritmo negativo della più alta concentrazione di virus usata - [(somma delle percentuali infettate ad ogni diluizione / 100 - 0.5) x (logaritmo delle diluizioni)]

MEM che sono state inoculate in monostrati di cellule HeLa. Ogni modifica microscopica, ad ogni diluizione, è stata registrata e successivamente valutata. Infine, i titoli virali sono stati valutati comparativamente in cellule precedentemente trattate con la prima diluizione non citotossica della formulazione o non trattate.

Reference virus inactivation test. Come controllo del test è stata usata formaldeide. Nel saggio di controllo, 10 parti di formaldeide (1,4%, W/V) sono state mescolate con 2 parti della sospensione virale e 8 parti di phosphate-buffered saline (PBS). I tempi di contatto sono stati 60 e 30 minuti. Al termine dell'incubazione, 0,2 ml della mistura sono stati pipettati in un tubo contenente 1,8 ml di MEM freddo + 2% FCS con successiva diluizione sino a 10^{-6} .

Saggio dell'attività virucida. Dopo preparazione del prodotto in esame e della sostanza interferente (condizioni di pulito e condizioni di sporco; vedere sopra), 1 parte della sospensione virale è stata aggiunta ad 8 parti del prodotto in esame. Immediatamente al termine del tempo di contatto, 0,5 parti della mistura sono state mescolate con 5,5 parti di MEM freddo+2% FCS. Dopo incubazione in ghiaccio per 30 minuti, sono state preparate diluizioni fino a 10^{-6} e l'infettività virale è stata valutata come descritto precedentemente mediante calcolo della ID_{50} per ml.

Verifica della metodologia. Il test è stato considerato valido se venivano rispettati i seguenti criteri:

- la sospensione virale ha un titolo di almeno 10^8 ID_{50} per ml o possiede una concentrazione che consente la valutazione di una caduta di titolo di 4 $\log_{10}$;
- la riduzione di titolo rilevabile è di almeno 4 $\log_{10}$;



- la differenza tra il titolo del controllo virale meno il titolo logaritmico del virus test nel test di riferimento dell'inattivazione è tra $10^{-0.5}$ e $10^{-2.5}$ dopo 30 minuti e tra 10^{-2} e $10^{-4.5}$ dopo 60 minuti per poliovirus;
- la citotossicità del prodotto non influisce sulla morfologia cellulare e sulla replicazione virale alla diluizione necessaria per ottenere una diminuzione di 4 Log_{10} del titolo virale;
- la valutazione comparativa del titolo virale su cellule trattate con diluizioni della formulazione o con PBS da una differenza di titolo virale inferiore ad 1 Log_{10} .

Risultati dello studio. Le sospensioni virali stock sono state preparate usando Adenovirus type 5 (ATCC VR5) and Poliovirus 1 Sabin strain. I titoli delle sospensioni virali (espressi come Log_{10} negativo della IC_{50} per ml) sono risultati: Adenovirus type 5 -8.10; Poliovirus 1 -8.20. Monostrati cellulari confluenti al 90% sono stati trattati con la formulazione in esame alla diluizione d'uso (da indiluita a diluita 10^{-4}) per valutare la più alta concentrazione incapace di generare alterazioni morfologiche delle cellule. Tale concentrazione è risultata essere 10^{-1} . Conseguentemente, nel saggio la formulazione è stata utilizzata alla concentrazione d'uso dello 0,5%, poiché dopo l'iniziale incubazione, la formulazione è normalmente soggetta ad una diluizione di 10 volte, prima dell'infezione di monostrati cellulari. Infine, il *reference virus inactivation assay* eseguito come descritto sopra, ha fornito i seguenti dati: Poliovirus 1 ID_{50} controllo non trattato (incubazione con PBS per 60 minuti) -7,90; Poliovirus 1 ID_{50} dopo trattamento con formaldeide 1,4% per 60 minuti -3,80; Poliovirus 1 ID_{50} controllo non trattato (incubazione con PBS per 30 minuti) -7,92; ; Poliovirus 1 ID_{50} dopo trattamento con formaldeide 1,4% per 30 minuti -5,04. Tutti i dati riportati sopra sono in accordo con i criteri richiesti per la verifica della metodologia.



L'attività della formulazione in esame è stata valutata in condizioni di pulito e in condizioni di sporco (vedere sopra). Gli altri parametri sono stati i seguenti: formulazione in esame testata alla diluizione 2,5% e 0,5%; tempi di contatto 1, 5, 10 e 60 minuti; temperatura 20°C. Le seguenti Tabelle A-D mostrano dati ottenuti in termini di titolo virale dopo trattamento con la formulazione in esame alla concentrazione 0,5% e 2,5%, rispettivamente.

A. ADANTIUM PLUS 0,5%. Condizioni di pulito e condizioni di sporco. Poliovirus 1.

Tempo di contatto	Titolo virale (sporco)	Decremento titolo virale (sporco)	Titolo virale (pulito)	Decremento titolo virale (pulito)
60 minuti	nv	nv	nv	nv
10 minuti	-2,40	-5,80	-2,00	-6,20
5 minuti	-4,50	-3,70	-4,30	-3,90
1 minuto	-5,80	-2,40	-5,10	-3,10

* logaritmo negativo del 50% end-point; nv=non valutabile

B. ADANTIUM PLUS 0,5%. Condizioni di pulito e condizioni di sporco. Adenovirus 5.

Tempo di contatto	Titolo virale (sporco)	Decremento titolo virale (sporco)	Titolo virale (pulito)	Decremento titolo virale (pulito)
60 minuti	nv	nv	nv	nv
10 minuti	-2,70	-5,40	-2,20	-5,90
5 minuti	-4,80	-3,20	-4,50	-3,60
1 minuto	-5,90	-2,20	-5,50	-2,60

* logaritmo negativo del 50% end-point; nv=non valutabile

C. ADANTIUM PLUS 2,5%. Condizioni di pulito e condizioni di sporco. Poliovirus 1.

Tempo di contatto	Titolo virale (sporco)	Decremento titolo virale (sporco)	Titolo virale (pulito)	Decremento titolo virale (pulito)
60 minuti	nv	nv	nv	nv
10 minuti	-1,80	-6,40	-1,40	6,80
5 minuti	-3,10	-5,10	-3,00	5,20
1 minuto	-4,80	-3,40	-4,50	3,70

* logaritmo negativo del 50% end-point; nv=non valutabile

B. ADANTIUM PLUS 2,5%. Condizioni di pulito e condizioni di sporco. Adenovirus 5.

Tempo di contatto	Titolo virale (sporco)	Decremento titolo virale (sporco)	Titolo virale (pulito)	Decremento titolo virale (pulito)
60 minuti	nv	nv	nv	nv
10 minuti	-2,10	-6,00	-1,80	-6,30
5 minuti	-3,60	-4,50	-3,10	-5,00
1 minuto	-5,00	-3,10	-4,70	-3,40

* logaritmo negativo del 50% end-point; nv=non valutabile

In accordo con i risultati delle Tabelle A-D, una riduzione superiore a 4 Log₁₀ della carica infettante di Poliovirus 1 e Adenovirus 5 è stata ottenuta utilizzando ADANTIUM PLUS alla diluizione 0,5%, in condizioni di pulito e di sporco, al tempo d'incubazione di 10 minuti e, in utilizzando ADANTIUM PLUS alla diluizione 2,5%, al tempo d'incubazione di 5 minuti.

Test report

EN 14476:2005

Laboratorio: Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, Italy.

Identificazione del campione:

- **nome:** ADANTIUM PLUS
- **numero di lotto:** 04AD44-09
- **distributore:** US Labs S.r.L., Via Aldo Bartocci, 33, Terni, Italy
- **conservazione:** temperatura ambiente
- **diluyente raccomandato dal produttore:** acqua
- **sostanze attive e loro concentrazione:** vedi testo

Condizioni sperimentali

- **Data del saggio:** aprile-giugno 2010
- **Temperatura del saggio:** 20°C
- **Metodo di titolazione:** ID50
- **Concentrazione del prodotto:** 2,5% e 0,5% in acqua dura
- **Tempi di contatto:** 60 minuti, 10 minuti, 5 minuti e 1 minuto
- **Procedura utilizzata per arrestare l'attività del prodotto:** diluizione
- **Sostanza interferente.** Condizioni di pulito e di sporco (vedere testo)
- **Titolo della sospensione virale:** Poliovirus 1 –8.20; Adenovirus 5 –8.10

Risultati: vedere report per i risultati finali .

Conclusioni: Nel presente studio, una riduzione superiore a 4 Log₁₀ della carica infettante di Poliovirus 1 e Adenovirus 5 è stata ottenuta utilizzando ADANTIUM PLUS alla diluizione 0,5%, in condizioni di pulito e di sporco, al tempo d'incubazione di 10 minuti e, in utilizzando ADANTIUM PLUS alla diluizione 2,5%, al tempo d'incubazione di 5 minuti.

Data:

16/08/10

Firma:

