



Università Vita-Salute San Raffaele

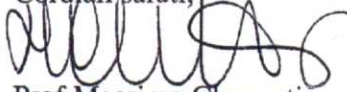
Prof. Massimo Clementi
Ordinario di Microbiologia
e Virologia

Spett. Pharmatek PMC Srl
Cremona (CR)

Milano, 09.10.2009

Si inviano i report conclusivi della valutazione dei dati degli studi di attività virucida (Poliovirus e Adenovirus e Influenza A\H1N1) condotti secondo la procedura descritta dallo standard europeo EN14476:2005. I due report, siglati in ogni pagina e firmati in originale, includono la scheda conclusiva della valutazione in lingua italiana e in lingua inglese.

Cordiali saluti,



Prof Massimo Clementi

**VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ VIRUCIDA
DI UNA FORMULAZIONE DISINFETTANTE**

(PHARMATEK PMC Srl, Cremosano, CR)

(EN 14476:2005)

Settembre-Ottobre 2009

Coordinatore dello studio:

Prof. Massimo Clementi
Università Vita-Salute San Raffaele, Milano



Scopo dello studio. Il presente report descrive uno studio eseguito per valutare l'attività virucida di una formulazione disinfettante per cute non lesa denominata Laurit Soluzione (Pharmatek PMC S.r.l., Cremosano, CR). 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. La formulazione disinfettante Laurit Soluzione si presenta come soluzione liquida gelatinosa. La composizione, per 100 g. di soluzione secondo i dati forniti dal produttore (Pharmatek PMC S.r.l., Cremosano, CR), è la seguente: alcol etilico 30.1 g. ± 1.0 g.; alcol isopropilico 18.1 g. ± 0.3 g.; alcol n. propilico 0.2 ± 0.1g.; alcol butilico sec. 0.075 g. ± 0.025 g.; alcol metilico <0.005 g.; polimetacrilato 4.0 g.; trietanolamina 2.0 g.; ortofenilfenolo 0.03 g.; essenza acqua e coloranti q.b. a 100.0 g. Il lotto della formulazione analizzata e direttamente fornita dal produttore è il numero 0909437 (scadenza 08\2012).

Condizioni dello studio. Lo studio è stato condotto sia in *condizioni di pulito* (sostanza interferente in concentrazione finale nel saggio: 0,3 g. di siero albumina bovina per litro di acqua), che in *condizioni di sporco* (sostanza interferente in concentrazione finale nel saggio: 3,0 g. di siero albumina bovina e 0,3 ml di eritrociti per litro di acqua). Brevemente, un'aliquota di ciascuna sospensione virale è stata aggiunta al prodotto in presenza di sostanza interferente. La miscela virus-formulazione disinfettante è stata mantenuta a 20°C per i tempi d'incubazione selezionati. Dopo l'incubazione, un'aliquota della miscela è stata immediatamente raccolta e l'attività virucida è stata soppressa mediante diluizione (in *minimal essential medium* [MEM] freddo supplementato con 2% fetal calf serum [FCS]).

¹European 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).

Sono state quindi preparate diluizioni in ragione 10 in MEM che sono state trasferite successivamente in pozzetti di micropiastra insieme alla sospensione cellulare (1:1; V:V). Il titolo infettante è stato successivamente calcolato mediante calcolo della dose infettante 50% (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:

- Concentrazione testata: prodotto tal quale e 1:50 in acqua dura²
- Test in condizioni di pulito e di sporco;
- Temperatura: 20°C;
- Tempi di contatto: 30 secondi, 1, 5 e 60 minuti.

Colture cellulari e sospensione virale stock. Nel presente studio sono stati utilizzati Adenovirus type 5 (ATCC VR5) and Poliovirus 1 (LSc-2ab strain). Le sospensioni stock sono state ottenute infettando monostrati cellulari di cellule HeLa confluenti al 90%, coltivate in presenza di MEM più 2% fetal calf serum (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-Karber method³).

Validazione della procedura. Effetto citotossico della formulazione disinfettante e capacità del virus a replicare in cellule trattate vs. cellule non trattate. Per la

² Preparazione:

Sol. A: MgCl₂ (19,84 g.) CaCl₂ (46,24 g.) in 1000 ml di acqua; conservata per non oltre 1 mese a 2°C-8°C dopo sterilizzazione

Sol. B: NaHCO₃ (35,02 g.) in 1000 ml di acqua; conservata per non oltre 1 mese a 2°C-8°C dopo sterilizzazione

Per l'uso 600 ml di acqua distillata sono stati aggiunti, in una fiasca, a 6.0 ml di soluzione A e a 8.0 ml di soluzione B. Successivamente la miscela è stata portata a 1.000 ml.

³ Il metodo di Spearman-Karber 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)]

validazione dello studio, 2 parti di acqua bidistillata sterile sono state aggiunte a 8 parti delle formulazioni in esame. Sono state preparate diluizioni in ragione 10 in MEM che, successivamente, sono state inoculate in monostrati di cellule HeLa. Ogni modifica microscopica, ad ogni diluizione, è stata registrata e valutata. Infine, i titoli virali sono stati analizzati comparativamente in cellule precedentemente trattate con la prima diluizione non citossica della formulazione o non trattate.

Test di riferimento dell'inattivazione virale. 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 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 Log₁₀;
- 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 Log₁₀ 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 Log₁₀.

