

# VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA VIRUCIDA DI SANI SYSTEM NEI CONFRONTI DEI VIRUS DELL'INFLUENZA A

Estratto del report relativo ai test effettuati dal laboratorio Biolab, Vimodrone (MI), novembre 2009

## Riferimenti:

- ASTM E 1053 - 97: Standard test Method for Efficacy of Virucidal Agents Intended for Inanimate Environmental Surfaces.
- EN 14476: Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative test in virucidal suspension for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine - Test method and requirements (phase2, step1) April 2005.

## Condizioni sperimentali

Sani System Polti è un'apparecchiatura elettro-medica per la sanificazione delle superfici che eroga una miscela di vapore saturo secco surriscaldato fino a 180 °C e HPMed, liquido sanificante. Per valutare l'efficacia virucida di Sani System Polti nei confronti dei virus responsabili dell'influenza A è stato utilizzato il virus H1N1 (ATCC VR-1469), in quanto appartenente alla classe virale in studio. La sospensione virale è stata moltiplicata nella linea cellulare MDCK (NBL-2) ATCC-CCL-34.

L'erogatore di Sani System Polti è stato tenuto a due diverse altezze rispetto alla superficie contaminata con il virus H1N1, 10 cm e 3.5 cm, utilizzando o meno il distanziatore.

Sani System Polti è stato utilizzato con due diversi tempi di nebulizzazione, 15 e 30 secondi, per poter valutare il limite di efficacia del sistema. Per simulare condizioni di sporco e interferenti è stato utilizzato triptone (7.6 g/L).

## Saggi preliminari

Prima di procedere con la prova principale riguardante l'attività virucida, sono state eseguiti diversi test sperimentali per la verifica di più parametri.

E' stato effettuato un test di citotossicità per verificare che le condizioni con cui la prova principale sarebbe stata effettuata non fossero critiche per la vitalità cellulare. Per questo motivo diverse sospensioni cellulari sono state incubate con il medium di coltura in presenza ed in assenza dell'inoculo virale e sono state sottoposte al trattamento con il sistema sotto test. Per i successivi 6 giorni si è proceduto con l'osservazione al microscopio per valutare la comparsa di eventuali effetti citopatici (CPE) dovuti al sistema utilizzato.

La sospensione virale è stata sottoposta a diluizioni seriali per poterne determinare la titolazione. Il virus è stato posto in contatto con la linea cellulare monostrato MDCK e dopo 6 giorni di incubazione sono stati identificati i campioni positivi alla presenza del virus mediante test dell'emoagglutinina, utilizzando eritrociti come substrato. I risultati ottenuti sono stati utilizzati per calcolare l'attività infettante (TCID<sub>50</sub>) secondo il metodo Spaerman - Karber.

E' stata inoltre valutata l'efficacia della neutralizzazione mediante PBS. Con questo proposito è stato allestito un secondo saggio di citotossicità e il campione in esame è stato incubato con PBS e quindi posto in contatto con la linea cellulare MDCK. Il preparato è stato quindi incubato con la sospensione virale di H1N1 e dopo 6 giorni si è proceduto all'identificazione dei campioni positivi al virus con il test dell'emoagglutinina.

## Test di attività virucida di Sani System Polti

Il test è stato condotto utilizzando cinque piastre carrier. Innanzitutto la sospensione virale è stata preincubata con la sostanza interferente e quindi inocolata sulle piastre e lasciata asciugare per 30 minuti a 37 °C. Una piastra è stata immediatamente incubata con il neutralizzante PBS senza aver subito alcun trattamento mentre le altre piastre sono state nebulizzate con Sani System Polti, secondo il seguente schema:

	Tempo: 15 secondi	Tempo 30 secondi
Distanza 3.5 cm	Piastra 2	Piastra 3
Distanza 10 cm	Piastra 4	Piastra 5

L'inoculo virale è stata risospeso nel PBS e sottoposto a diluizioni seriali. Un'aliquota di ogni sospensione è stata messa a contatto con il monostrato di cellule MCDK.

La linea cellulare MCDK incubata con la sospensione virale è stata mantenuta a 37 °C per 7 giorni e, trascorso questo periodo di tempo, sottoposta a indagine microscopica per valutare effetti citopatici causati dal virus H1N1.

Per identificare i campioni positivi alla presenza del virus H1N1 dopo 6 giorni di incubazione sono stati effettuati test dell'emoagglutinina e l'attività infettante (TCID<sub>50</sub>) è stata calcolata secondo il metodo Spaerman - Karber. E' stato utilizzato il test dell'emoagglutinina perchè molti virus, tra cui il virus dell'influenza A, contengono proteine (come l'emoagglutinina) in grado di legarsi alla superficie dei globuli rossi. Questi legami fanno sì che si venga a formare un network che impedisce la sedimentazione degli eritrociti.

### Criteri di validazione dei risultati

L'attività infettante è stata calcolata secondo il metodo di Spaerman – Karber. I valori di TCID<sub>50</sub> (diluizione della sospensione virale che è in grado di indurre CPE nel 50% delle cellule in cultura con cui è incubato) ottenuti sono confrontati nel campione di controllo e nei campioni sottoposti a trattamento con Sani System. Il sistema è considerato virucida quando provoca una riduzione di 4 ordini logaritmici nel campione trattato rispetto al campione di controllo.

Il test di attività virucida è considerato valido all'ottenimento di determinati risultati nei test preliminari. In particolare, il titolo della sospensione virale deve essere compreso tra 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml per poter avere una riduzione di 4 ordini logaritmici che verifichi il metodo.

### Risultati

I risultati dei test preliminari sono stati considerati validi e pertanto si è calcolata l'attività virucida di Sani System Polti rispetto ai virus responsabili dell'influenza A. Come si può vedere dalla tabella seguente, Sani System è stato in grado di ridurre la carica virale per più di 4 ordini logaritmici, con tempo di contatto sia di 15 secondi sia di 30 secondi.

Prodotto	Condizioni del test			Riduzione logaritmica	
	Sostanza interferente	Tempo di contatto (secondi)	Replica	Distanza tra erogatore e superficie	
				3.5 cm	10 cm
SANI SYSTEM POLTI	Tryptone	15	2	> 4.63	> 4.63
			4	> 4.63	> 4.63
		30	3	> 4.38	> 4.38
			5	> 4.38	> 4.38

### Conclusioni

Sulla base dei risultati ottenuti e nelle condizioni sperimentali adottate, Sani System Polti provoca una riduzione maggiore di 4 ordini logaritmici della carica del virus H1N1 già dopo tempi di contatto pari a 15 secondi e, pertanto, il sistema risponde pienamente ai parametri richiesti dalla normativa di riferimento EN14476 per confermare l'attività virucida nei confronti dei virus responsabili dell'influenza A.