



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**

Via Bianchi, 9 - 25124 Brescia  
Tel 030 22901 - Fax 030 2425251 - Email info@izsler.it  
C.F. - P.IVA 00284840170 - N. REA CCIAA di Brescia 88834



**CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA PER LE MALATTIE VESCICOLARI (CERVES)**

Tel. 030-2290310 Fax 030-2290369

**OIE REFERENCE LABORATORY FOR SWINE VESICULAR DISEASE**

Brescia, 16/04/2012

**Risultati delle prove sperimentali per la verifica della efficacia del prodotto VIROCID per  
l'inattivazione dell'Enterovirus della Malattia Vescicolare del Suino (SVDV)**

**Laboratorio che ha eseguito le prove:**

Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Vescicolari, OIE Reference Laboratory for Swine Vesicular Disease, presso IZSLER, Brescia, Italy.

**Clienti:**

*Prima valutazione:*

CID-LINES  
Waterpoortstraat 2  
8900 IEPER  
Belgium

*Valutazione integrativa:*

UNITEC SRL  
Via Canzio, 10  
20131 Milano  
Italia

**Identità del prodotto esaminato:**

**VIROCID, lotto S 11505**

Expiration date: December 2014

## CONDIZIONI DI VALUTAZIONE CONCORDATE

- 1) Procedura adottata conforme alla **norma di riferimento UNI EN 14675: 2006** (*Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and aseptics used in the veterinary area. Test method and requirements (phase 2, step 1)*), adattata alla verifica dell'attività virucida sul virus MVS.
- 2) **Prova preliminare**, consistente nella **valutazione della citotossicità** del prodotto VIROCID sul substrato cellulare IB-RS2, sensibile al virus della Malattia Vescicolare del Suino (SVDV) ed utilizzato per le prove di verifica dell'efficacia di inattivazione. Tali prove sono effettuabili solo se i prodotti presentano un livello di citotossicità non interferente con la verifica stessa.
- 3) Valutazione del potere inattivante del prodotto VIROCID sul virus SVDV alle seguenti condizioni:
  - a) concentrazioni del presidio **VIROCID 0.5%**, **tempo d'azione 1, 5, 15, 30 minuti** alla Temperatura di 10°C, in presenza di sostanze interferenti ad alta concentrazione, consistenti in sieralbumina bovina 1% ed estratto di lievito 1% (*high level soiling*);
  - b) concentrazioni del presidio **VIROCID 0.5%**, **tempo d'azione 1, 5, 15, 30 minuti** alla Temperatura di 10°C, in assenza di sostanze interferenti;
  - c) concentrazioni del presidio **VIROCID 2.5%**, **tempo d'azione 1, 5, 15, 30 minuti** alla Temperatura di 10°C, in presenza di sostanze interferenti ad alta concentrazione, consistenti in sieralbumina bovina 1% ed estratto di lievito 1% (*high level soiling*);
  - d) concentrazioni del presidio **VIROCID 2.5%**, **tempo d'azione 1, 5, 15, 30 minuti** alla Temperatura di 10°C, in assenza di sostanze interferenti.

Sulla base dei risultati riscontrati è stato richiesto e concordato di procedere ad un secondo set di prove per valutare l'efficacia del prodotto alle seguenti ulteriori condizioni:

- e) concentrazioni del presidio VIROCID **1.0%**, **tempo d'azione 1, 5, 15, 30 minuti** alla Temperatura di 10°C;
- f) concentrazioni del presidio VIROCID **1,5%**, **tempo d'azione 1, 5, 15, 30 minuti** alla Temperatura di 10°C;
- g) concentrazioni del presidio VIROCID **2.0%**, **tempo d'azione 1, 5, 15, 30 minuti** alla Temperatura di 10°C.

Le valutazioni integrative sono state condotte sia in assenza di sostanze interferenti, che in presenza di sostanze interferenti ad alta concentrazione, consistenti in sieralbumina bovina 1% ed estratto di lievito 1% (*high level soiling*), anche per confermare l'effetto di precipitazione osservato nel corso del primo set di valutazioni con conseguente inibizione dell'attività del prodotto sul virus SVDV.

### Test addizionali eseguiti

Oltre ai test concordati sono stati effettuate verifiche del potere virucida del presidio in valutazione su altri virus, in particolare sono stati scelti:

- il virus dell'afta epizootica (FMDV), appartenente alla stessa famiglia virale del virus SVDV (*Picornaviridae*), quindi avente caratteristiche strutturali simili, ma una maggiore sensibilità ai trattamenti chimico-fisici;
- il virus della Stomatite Vescicolare (VSV), strutturalmente diverso dai precedenti, in quanto dotato di envelope.

Per entrambi i virus le condizioni testate sono state:

- a) concentrazioni del presidio VIROCID 0.5%, tempo d'azione 30 minuti alla Temperatura di 10°C, in presenza di sostanze interferenti ad alta concentrazione, consistenti in sieroalbumina bovina 1% ed estratto di lievito 1% (high level soiling);
- b) concentrazioni del presidio VIROCID 0.5%, tempo d'azione 30 minuti alla Temperatura di 10°C, in assenza di sostanze interferenti.

## **METODOLOGIA ADOTTATA**

### **Virus utilizzati:**

- Swine Vesicular Disease Virus, ceppo di referenza Italia 72 (equivalente al ceppo UK72)
- Vesicular Stomatitis Virus, strain Indiana
- Foot-and-Mouth Disease Virus, sierotipo Asia 1, strain Nepal 29/97
- Foot-and-Mouth Disease Virus, sierotipo O, strain O<sub>1</sub>Manisa

Le matrici virali sono conservate a -80°C in terreno di coltura MEM addizionato col 2% di Siero Fetale Bovino.

### **Linea cellulare sensibile impiegata per tutti i virus:**

- IB-RS2 (rene suino)

### **AMBIENTI in cui sono state eseguite le prove:**

I virus SVDV e FMDV possono essere manipolati esclusivamente in Laboratori autorizzati, elencati nella Direttiva europea 2003/85/EC; tali strutture devono essere conformi a quanto disposto nel documento “*Minimum standards for Laboratories working with FMDV in vitro and in vivo*» - *European Commission for the control of Foot and Mouth Disease*”.

Pertanto le prove sono state effettuate nei laboratori ad elevato contenimento (BSL3+) del Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Vescicolari, presso l'IZSLER, Brescia, che è l'unica sede italiana autorizzata dal Ministero della Salute all'utilizzo di questi agenti virali.

Il Laboratorio è incaricato quale Centro di referenza OIE per la Malattia Vescicolare del Suino.

#### **1. Prova preliminare:**

Allestimento di 8 diluizioni seriali in base 10 del presidio, a partire dalla concentrazione più alta in esame, corrispondente al 2.5% (1/40), in terreno di coltura MEM con 5% Siero Fetale Bovino. Semina di 10 repliche di ciascuna delle concentrazioni scalari del prodotto (range 1/40→1/400.000.000,  $10^{-1,6}$ → $10^{-8,6}$ ) su colture cellulari della linea IB-RS2, coltivate in micropiastre a 96 pozzetti, seguita da valutazione mediante lettura microscopica dell'eventuale effetto citotossico fino a 48 h di incubazione.

#### **2. Verifica dell'attività inattivante:**

Determinazione comparativa del titolo infettante di una matrice di enterovirus della Malattia Vescicolare del Suino ad elevato titolo, pre-trattata con il presidio alle condizioni sopra esposte e non trattata come controllo di riferimento. La prova è effettuata in micropiastre per colture cellulari a 96 pozzetti. Il titolo infettante virale è valutato su cellule IB-RS2 ed è espresso in TCID<sub>50</sub>/ml: n° 1 TCID<sub>50</sub>/ml equivale alla dose infettante il 50% delle colture cellulari inoculate (n° 5 colture per ciascuna diluizione del virus), contenuta in 1ml.

## RISULTATI

### NOTA

L'aggiunta del prodotto alla sospensione virale in presenza delle sostanze interferenti (sieroalbumina bovina 1% ed estratto di lievito 1%, *high level soiling*) determina una immediata precipitazione, quantitativamente e visivamente proporzionale alla concentrazione del prodotto stesso. Entro pochi minuti si assiste ad una flocculazione con successiva separazione di fase, il che può comportare un'attività interferente da parte delle suddette sostanze.

L'aggiunta del prodotto alla sospensione virale, in assenza di sostanze proteiche, comporta la comparsa di una torbidità omogenea proporzionale alla concentrazione del prodotto.

### 1) Prova preliminare: citotossicità causata dalle soluzioni del prodotto in esame

**Il prodotto ha presentato effetto citotossico su IB-RS2 fino alla concentrazione 0,025%:** di conseguenza, la valutazione della capacità infettante del virus trattato con il prodotto è leggibile solo alle diluizioni virali in cui la concentrazione del prodotto a contatto con la coltura cellulare è scesa sotto lo 0,025%.

Per la determinazione del titolo infettante, la metodologia prevede la semina in colture cellulari sensibili di diluizioni seriali in base 10 della sospensione virale; nelle valutazioni dell'attività virucida, trascorso il tempo di contatto della matrice virale con il prodotto, la sospensione virale (trattata e non trattata) viene diluita serialmente e seminata in colture cellulari. Questa operazione comporta anche la diluizione seriale in base 10 del prodotto, a partire dalla concentrazione soggetta a verifica. Nel caso di VIROCID valutato alla concentrazione del 2.5% la lettura dell'infettività virale dopo trattamento, senza rischio di confusione/sovrapposizione con l'azione citotossica del presidio, è quindi possibile a partire dalla diluizione della sospensione virale 1/1000 ( $10^{-3}$ ), a cui corrisponde la concentrazioni del prodotto 0.0025% ormai priva di effetto citotossico.

Per poter effettuare la prova è necessario disporre di una matrice virale che raggiunga un titolo infettante molto elevato, per avere una finestra di lettura di almeno 4 Log10 (equivalenti alla diminuzione del titolo infettante dopo trattamento necessaria per affermare l'efficacia del prodotto in conformità alla EN 14675) a partire dalla diluizione  $10^{-3}$ .

La matrice utilizzata è conforme a questo requisito, avendo dimostrato un titolo infettante medio di  $10^{9,6}$  (range  $10^{9,1} - 10^{9,9}$  TCID<sub>50</sub>/ml) nella prima serie di valutazione e  $10^9$  (range  $10^{8,70} - 10^{9,30}$  TCID<sub>50</sub>/ml) nella seconda serie di prove (dettaglio nelle tabelle allegate).

## 2) Valutazione attività inattivante

### Prima serie di valutazioni concordate

Ogni condizione è stata esaminata in due prove indipendenti.

I risultati della titolazione parallela di matrici virali non trattate (controllo) e trattate con il prodotto in esame alle condizioni concordate, in presenza o in assenza di sostanze interferenti, sono espressi nelle tabelle seguenti (*i valori sono riportati come medie delle due repliche*).

*Risultati della titolazione di SVDV non trattato e trattato con VIROCID  
Risultati espressi come Log10 TCID<sub>50</sub>/ml*

Condizioni esaminate : Temperatura di contatto **10 °C**  
**senza sostanze interferenti**

<b>Controllo non trattato*</b>	<b>VIROCID 0.5%</b>				<b>Controllo non trattato*</b>	<b>VIROCID 2.5%</b>			
	1'	5'	15'	30'		1'	5'	15'	30'
<b>9.7</b>	8.3	8.3	7.3	7.3	<b>9.3</b>	7.5	6.6	5.6	5.2
<b>Δ Log10</b>	<b>1.4</b>	<b>1.4</b>	<b>2.4</b>	<b>2.4</b>	<b>Δ Log10</b>	<b>1.8</b>	<b>2.7</b>	<b>3.6</b>	<b>4.1</b>

Condizioni esaminate : Temperatura di contatto **10 °C**  
**in presenza di sieroalbumina bovina 1% e estratto di lievito 1%**

<b>Controllo non trattato*</b>	<b>VIROCID 0.5%</b>				<b>Controllo non trattato*</b>	<b>VIROCID 2.5%</b>			
	1'	5'	15'	30'		1'	5'	15'	30'
<b>9.7</b>	9.5	9.7	9.3	9.0	<b>9.7</b>	9.3	8.8	8.3	8.5
<b>Δ Log10</b>	<b>0.2</b>	<b>0.0</b>	<b>0.4</b>	<b>0.7</b>	<b>Δ Log10</b>	<b>0.4</b>	<b>0.9</b>	<b>1.4</b>	<b>1.2</b>

\*: Il virus di controllo non trattato è stato semplicemente incubato a 10°C per 30 minuti.

NOTA: nella determinazione del titolo infettante basata sulla semina di diluizioni seriali in base 10, variazioni di 1 log10 in prove indipendenti possono rientrare nella variabilità biologica del metodo.

Il dettaglio dei risultati di ciascuna prova, con il riferimento alle date di esecuzione, è fornito come allegato.

### Seconda serie di valutazioni concordate

Risultati e data di esecuzione delle prove sono riportati nelle tabelle seguenti.

#### *Risultati della titolazione di SVDV non trattato e trattato con VIROCID Risultati espressi come Log10 TCID<sub>50</sub>/ml*

Condizioni esaminate : Temperatura di contatto **10 °C**  
**senza sostanze interferenti**

VIROCID 1%					VIROCID 1.5%					VIROCID 2%				
20/02/2012					22/02/2012					27/02/2012				
C*	1'	5'	15'	30'	C*	1'	5'	15'	30'	C*	1'	5'	15'	30'
8.70	7.10	6.30	5.50	5.90	9.10	8.30	7.10	5.50	5.50	9.30	6.50	5.90	5.50	5.50
<b>Δ Log10</b>	<b>1.60</b>	<b>2.40</b>	<b>3.20</b>	<b>2.80</b>	<b>Δ Log10</b>	<b>0.80</b>	<b>2.0</b>	<b>3.60</b>	<b>3.60</b>	<b>Δ Log10</b>	<b>2.80</b>	<b>2.40</b>	<b>3.80</b>	<b>3.80</b>

Condizioni esaminate : Temperatura di contatto **10 °C**  
**in presenza di sieralbumina bovina 1% e estratto di lievito 1%**

VIROCID 1%					VIROCID 1.5%				
21/02/2012					24/02/2012				
C*	1'	5'	15'	30'	C*	1'	5'	15'	30'
9.10	9.50	8.30	8.30	8.90	8.90	8.90	8.30	8.50	7.70
<b>Δ Log10</b>	<b>-0.4</b>	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>	<b>0.2</b>	<b>Δ Log10</b>	<b>0</b>	<b>0.6</b>	<b>0.4</b>	<b>1.2</b>

\*: Il virus di controllo non trattato è stato semplicemente incubato a 10°C per 30 minuti.

NOTA: nella determinazione del titolo infettante basata sulla semina di diluizioni seriali in base 10, variazioni di 1 log10 in prove indipendenti possono rientrare nella variabilità biologica del metodo.

### CONCLUSIONE

In accordo alla Norma UNI EN 14675 2006, il prodotto in esame è considerato efficace quando si dimostra una riduzione del titolo infettante di quattro Log10 o superiore, in un tempo d'azione di 30 minuti o inferiore, alla temperatura di 10°C, nelle condizioni di sostanze interferenti scelte per la prova.

Dall'esame dei risultati della prima serie di valutazioni si evince che VIROCID determina una riduzione del titolo infettante di SVDV di almeno 4 Log (abbattendo la carica virale del 99.99%) rispetto al virus non trattato nel tempo di 30 minuti, alla concentrazione più alta esaminata (2.5%) e senza aggiunta di sostanze proteiche. Alle stesse condizioni, la concentrazione di prodotto equivalente allo 0.5% ha determinato una riduzione di infettività di 2.4 Log (equivalente al 99.6%).

Con la seconda serie di prove si è voluto verificare se la medesima efficacia virucida osservata con la concentrazione 2.5% poteva essere raggiunta con concentrazioni intermedie (1%, 1.5%, 2%) del prodotto.

I risultati hanno evidenziato che l'efficacia delle concentrazioni di VIROCID 1.5% e 2% è pressoché equivalente e non si discosta significativamente da quella dimostrata dalla concentrazione 2.5%. Con ciascuna delle tre concentrazioni, dopo un tempo d'azione di 15 minuti, il prodotto

VIROCID ha abbattuto la carica infettante di 3,6 – 3,8 Log10 (99,975% - 99,984% rispettivamente); prolungando il tempo d'azione a 30 minuti, si è osservato un ulteriore aumento dell'efficacia, fino a superare la soglia di quattro Log10 rispetto al controllo, solo con la concentrazione di VIROCID più elevata (2,5%). Si sottolinea tuttavia che la differenza dei titoli infettanti residui osservati dopo il trattamento con le tre concentrazioni 1.5%, 2% e 2.5% è minima e potrebbe rientrare nella variabilità tra repliche insita nei test biologici.

L'insieme dei risultati porterebbe ad ipotizzare che l'efficacia del VIROCID a 10°C raggiunge un plateau d'azione, equivalente all'abbattimento di 3.6 – 4.1 Log10, in 15-30 minuti alla concentrazione dell'1.5%; per avvalorare l'ipotesi sarebbe necessaria la prova di efficacia di una concentrazione decisamente superiore a quella massima valutata, ad esempio del 5%, al fine di verificare se all'aumentare della concentrazione corrisponde un ulteriore aumento di efficacia o no.

E' rilevante segnalare che in condizioni di *high level soiling*, generate dalla presenza di sieralbumina bovina 1% ed estratto di lievito 1%, l'efficacia del prodotto è pressoché annullata, suggerendo che una elevata carica proteica inattiva le sostanze del prodotto efficaci sul virus SVDV.

**Personale coinvolto:**

Dr. Emiliana Brocchi – responsabile del centro di referenza: coordinamento e stesura del report.

Dr. Marco Bugnetti – dirigente di laboratorio: esecuzione e lettura delle prove.

Dott.ssa Emiliana Brocchi

(responsabile Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Vescicolari)

## TEST ADDIZIONALI ESEGUITI SU ALTRI VIRUS

Visto l'effetto che sostanze proteiche provocano sull'efficacia virucida del prodotto e al fine di indagare sui meccanismi d'azione e sulla efficacia delle diverse sostanze attive presenti nel prodotto VIROCID, la valutazione è stata estesa ad altre due tipologie di virus, selezionati in base ai seguenti criteri:

- il virus dell'afta epizootica (FMDV), perché appartenente alla stessa famiglia virale del virus SVDV (*Picornaviridae*), quindi simile per le caratteristiche strutturali, ma caratterizzato da una maggiore sensibilità ai trattamenti chimico-fisici; in particolare la prova è stata ripetuta con due diversi sierotipi aftosi, il sierotipo O e il sierotipo Asia 1.
- il virus della Stomatite Vescicolare (VSV), un rhabdovirus strutturalmente diverso dai precedenti e dotato di envelope lipoproteico.

Per entrambi i virus le condizioni selezionate per la valutazione del potere virucida del prodotto in esame sono state la concentrazione dello 0.5%, tempo di contatto 30 minuti a 10 °C, sia in assenza che in presenza di sostanze interferenti (condizione: high level soiling).

I risultati, riportati nella tabella che segue, dimostrano che:

- per i Picornavirus FMDV è confermata la piena efficacia del VIROCID in assenza di sostanze interferenti, con oltre 4 Log di riduzione dell'infettività anche alla concentrazione dello 0.5%, coerentemente con la nota, maggiore labilità di FMDV rispetto a SVDV;
- è altresì confermato l'annullamento dell'efficacia delle sostanze attive sui Picornavirus in presenza di alta carica proteica (BSA 1% + estratto di lievito 1%);
- con un virus strutturalmente diverso come VSV, VIROCID è efficace allo 0.5% in entrambe le condizioni, "clean" (senza aggiunta di sostanze interferenti) e "high level soiling".

Le ragioni plausibili per questa diversa reattività possono dipendere dalla struttura dei virus esaminati e dai diversi meccanismi d'azione delle sostanze attive presenti nel prodotto. Ad esempio, virus con envelope sono sensibili all'azione di alcol, mentre virus senza envelope (come i Picornavirus) sono resistenti; tra i componenti del VIROCID la glutaraldeide è efficace in idonee concentrazioni sui virus SVDV e FMDV.

E' probabile che il fenomeno di precipitazione e flocculazione che si osserva in condizioni di high level soiling sia dovuto alla polimerizzazione delle proteine ad opera della glutaraldeide e che una elevata concentrazione proteica segreggi l'attività della glutaraldeide, rendendo inefficace il prodotto sui picornavirus. Diversamente, il VSV, dotato di envelope lipoproteico esterno, rimane sensibile all'azione del componente alcolico presente nel VIROCID.

Temperatura di contatto **10 °C, TEMPO 30'**  
**VIROCID 0.5%**

Virus	Trattamento	Senza sostanze interferenti		BSA 1%+Lievito 1%		Data
		Titolo virale	$\Delta$ Log10	Titolo virale	$\Delta$ Log10	
VSV	Controllo	8.1	$\geq 4.6$	8.1	$\geq 4.6$	4/2/2012
	Trattato	$\leq 3.5$		$\leq 3.5$		
FMDV Asia 1	Controllo	7.9	$\geq 4.4$	7.5	1.4	7/2/2012
	Trattato	$\leq 3.5$		6.1		
FMDV O	Controllo	7.1	$\geq 3.6$	non esaminato		5/1/2012
	Trattato	$\leq 3.5$				

## ALLEGATO

*Risultati della titolazione di matrici virali MVS non trattate e trattate con VIROCID*

*Dettaglio delle repliche effettuate per la prima serie di prove*

***Risultati espressi come Log 10 TCID<sub>50</sub>/ml***

SVDV + VIROCID 0.5% IN MEM SENZA SOSTANZE INTERFERENTI										
	1' 10° C		5' 10° C		15' 10° C		30' 10° C		CONTR. 30' 10° C	
data	4/1/12	9/1/12	4/1/12	9/1/12	4/1/12	9/1/12	4/1/12	9/1/12	4/1/12	9/1/12
Log10 TCID <sub>50</sub> /ml	8.50	8.10	6.70	8.50	7.10	7.50	7.50	7.10	9.70	9.70

SVDV + VIROCID 2.5% IN MEM SENZA SOSTANZE INTERFERENTI										
	1' 10° C		5' 10° C		15' 10° C		30' 10° C		CONTR. 30' 10° C	
data	11/1/12	18/1/12	11/1/12	18/1/12	11/1/12	18/1/12	11/1/12	18/1/12	11/1/12	18/1/12
Log10 TCID <sub>50</sub> /ml	7.50	7.50	6.50	6.70	5.70	5.50	5.50	4.90	9.50	9.10

SVDV + VIROCID 0.5% IN MEM CON SIERALB. BOVINA 1% ed ESTR. DI LIEVITO 1%										
	1' 10° C		5' 10° C		15' 10° C		30' 10° C		CONTR. 30' 10° C	
data	16/1/12	21/1/12	16/1/12	21/1/12	16/1/12	21/1/12	16/1/12	21/1/12	16/1/12	21/1/12
Log10 TCID <sub>50</sub> /ml	9.50	9.50	10.30	9.10	9.10	9.50	8.90	9.10	9.50	9.90

SVDV + VIROCID 2.5% IN MEM CON SIERALB. BOVINA 1% ed ESTR. DI LIEVITO 1%										
	1' 10° C		5' 10° C		15' 10° C		30' 10° C		CONTR. 30' 10° C	
data	13/1/12	20/1/12	13/1/12	20/1/12	13/1/12	20/1/12	13/1/12	20/1/12	13/1/12	20/1/12
Log10 TCID <sub>50</sub> /ml	9.70	8.90	8.50	9.10	8.10	8.50	8.70	8.30	9.90	9.50

NOTA: nella determinazione del titolo infettante basata sulla semina di diluizioni seriali in base 10, variazioni nelle repliche di 1 log<sub>10</sub> rientrano nella variabilità biologica del metodo.