



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)<sup>1</sup>, 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]).

<sup>1</sup>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).

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% (ID<sub>50</sub>; 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 dura<sup>2</sup>
- 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 ID<sub>50</sub> (Spearman-Karber method<sup>3</sup>).

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

<sup>2</sup> Preparazione:

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

Sol. B: NaHCO<sub>3</sub> (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.

<sup>3</sup> 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 Log<sub>10</sub>;
- la differenza tra il titolo del controllo virale meno il titolo logaritmico del virus test nel test di riferimento dell'inattivazione è tra 10<sup>-0.5</sup> e 10<sup>-2.5</sup> dopo 30 minuti e tra 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-4.5</sup> 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<sub>10</sub> 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<sub>10</sub>.

## Risultati dello studio.

Nel presente studio sono state eseguite le valutazioni preliminari descritte di seguito:

- per valutare la più bassa concentrazione del prodotto in esame che non genera alterazioni morfologiche cellulari, colture cellulari confluenti al 90% sono state trattate con la formulazione disinfettante in esame (diluita da  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  in acqua dura). Alla diluizione  $10^{-1}$  e alle diluizioni successive non è stato osservato alcun effetto citotossico.
- È stato eseguito il test di referenza per l'inattivazione virale (vedi sopra). Nel test un titolo (poliovirus 1) di  $-7.970$  è stato osservato dopo trattamento con PBS e un titolo di  $-3.820$  dopo trattamento con formaldeide 1.4% per 60 minuti, ottenendo una riduzione superiore a 4  $\text{Log}_{10}$ ; dopo 30 minuti i risultati sono stati  $-7,990$  e  $-6,345$ , rispettivamente. Questi risultati sono in linea con i requisiti previsti dallo standard EN 14476:2005.
- E' stato calcolato il titolo infettante della preparazione virale stock, risultato essere  $-8,26$  ( $\text{Log}_{10}$  negativo della  $\text{IC}_{50}$ ) per Poliovirus 1 e  $-8,16$  per Adenovirus 5. Su cellule trattate con la formulazione in esame alla più bassa diluizione non citotossica ( $10^{-1}$ ) il titolo virale è stato  $-7,42$  per Poliovirus 1 e  $-7,88$  per Adenovirus 5.

L'attività virucida della formulazione in esame Laurit Soluzione (Pharmatek PMC S.r.l., Cremosano, CR) è stata valutata utilizzando il prodotto tal quale (non diluito), in condizioni di pulito e di sporco, alla temperatura di  $20^{\circ}\text{C}$  e ai seguenti tempi: 30 secondi, 1 minuto, 5 minuti e 60 minuti. E' stata altresì saggiata una diluizione in acqua dura (1:50) della stessa formulazione, quale controllo.

**A. Laurit Soluzione (non diluito). Condizioni di pulito e di sporco. Poliovirus 1.**

Tempo di contatto	Titolo virale (sporco)*	Titolo virale (pulito)*
60 minuti	Nd**	Nd**
5 minuti	-2.24	-1.00
1 minuto	-4.10	-2.89
30 secondi	-5.32	-4.20

(\*) logaritmo negativo dell'end-point 50%; (\*\*) titolo virale non rilevabile

**B. Laurit Soluzione (non diluito). Condizioni di pulito e di sporco. Adenovirus 5.**

Tempo di contatto	Titolo virale (sporco)*	Titolo virale (pulito)*
60 minuti	Nd**	Nd**
5 minuti	-2.90	-1.82
1 minuto	-3.85	-2.76
30 secondi	-4.74	-4.10

(\*) logaritmo negativo dell'end-point 50%; (\*\*) titolo virale non rilevabile

Utilizzando la formulazione in esame alla diluizione 1:50 in acqua dura non è stata osservata alcuna riduzione significativa del titolo virale ai tempi di contatto 30 secondi e 1 minuto. Al tempo di contatto di 5 minuti sono state osservate riduzioni inferiori a 1 log per entrambi i virus sia in condizioni di pulito che in condizioni di sporco. Al tempo di contatto di 60 minuti sono stati rilevati i seguenti titoli virali:

*Poliovirus 1*

Condizioni di sporco –6,24; Condizioni di pulito –6,02

*Adenovirus 5*

Condizioni di sporco –7,00; Condizioni di pulito –6,64

In accordo con i risultati riportati nelle Tabelle A e B, seguendo la metodologia richiesta e l'interpretazione dei dati prevista da European Standard EN 14476:2005 (phase 2; step 1), il disinfettante in esame *Laurit soluzione* è risultato possedere attività antivirale (verso Poliovirus 1 e Adenovirus 5) quando utilizzato tal quale, in condizioni di sporco, al tempo di contatto di 1 minuto e, in condizioni di pulito, al tempo di contatto di 30 secondi.



## Test report

EN 14476:2005

### Laboratorio

Microbiologia e Virologia, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano.

### Identificazione del campione

Nome del prodotto: Laurit soluzione

Composizione (in 100 g di prodotto): alcol etilico 30.1 g.  $\pm$  1.0 g.; alcol isopropilico 18.1 g.  $\pm$  0.3 g.; alcol n. propilico 0.2  $\pm$  0.1g.; alcol butilico sec. 0.075 g.  $\pm$  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.

Numero di lotto: 0909437 (scadenza 08/2012)

Produttore: Pharmatek PMC S.r.l., Cremosano, CR, Italy

### Condizioni sperimentali

Data del saggio: Settembre-Ottobre 2009

Temperatura di saggio: 20°C

Metodo di titolazione: ID<sub>50</sub>

Concentrazioni saggiate: tal quale (non diluito) e 1:50 in acqua dura

Tempi di contatto: 60 minuti, 5 minuti, 1 minuto, e 30 secondi

Procedura utilizzata per stoppare l'azione del prodotto: diluizione

Titoli delle sospensioni virali: Poliovirus 1 –8,26; Adenovirus 5 –8,16

Risultati: vedi Tabella A e Tabella B e relativo testo.

### Conclusioni

Seguendo la procedura prevista da European Standard EN 14476:2005 (phase 2; step 1), il disinfettante in esame, *Laurit soluzione*, è risultato possedere attività antivirale (verso Poliovirus 1 e Adenovirus 5) quando utilizzato tal quale, in condizioni di sporco, al tempo di contatto di 1 minuto e, in condizioni di pulito, al tempo di contatto di 30 secondi.

Data: 09/10/2009

Firma:



Prof. Massimo Clementi

**Test report**

EN 14476:2005

**Laboratory**

Laboratory of Microbiology and Virology, Università Vita-Salute San Raffaele, Milan, Italy.

**Identification of the sample**

Name of the product: : Laurit soluzione

Composition (100 g of product): ethyl alcohol 30.1 g.  $\pm$  1.0 g.; isopropyl alcohol 18.1 g.  $\pm$  0.3 g.; n. propyl alcohol 0.2  $\pm$  0.1g.; butyl alcohol sec. 0.075 g.  $\pm$  0.025 g.; methyl alcohol <0.005 g.; polymethacrylate 4.0 g.; triethanolamine 2.0 g.; orthophenylphenolo 0.03 g.; water and other components to 100.0 g.

Batch number: 0909437

Expiry date: 08/2012

Manufacturer: Huckert's International

**Experimental conditions**

Date of testing: September-October 2009

Test temperature: 20°C

Method of titration: ID<sub>50</sub>

Test concentrations: undiluted and diluted 1:50 in hard water

Contact times: 60 minutes, 5 minutes, 1 minute, and 30 seconds

Procedure to stop action of the product: dilution

Titer of virus suspensions: Poliovirus 1 –8,26; Adenovirus 5 –8,16

Results: see this report for final results.

**Conclusions**

Using the disinfectant formulation Laurit soluzione and following the European Standard EN 14476:2005 (phase 2; step 1) , a reduction of virus titers higher than 4 Log<sub>10</sub> was obtained, in the present study, after 1 minute (dirty conditions), and after 30 seconds (clean conditions) of incubation.

Date: 09/10/2009

Signature:



**Prof. Massimo Clementi**

**Attività virucida (Influenza A virus H1N1 [S-OIV])  
di una formulazione disinfettante  
(PHARMATEK PMC Srl, Cremosano, CR)  
(EN 14476:2005)**

**Settembre-Ottobre 2009**

Coordinatore dello studio:  
Massimo Clementi,  
Università Vita-Salute San Raffaele, Milano



**Scopo dello studio.** Il presente report descrive uno studio per la valutazione dell'attività virucida di una formulazione disinfettante per cute non lesa denominata Laurit Soluzione (Pharmatek PMC S.r.l., Cremosano, CR). In particolare, nel presente studio, l'attività del disinfettante è stata valutata contro il virus Influenza A H1N1 (S-OIV), seguendo la procedura descritta dall'European Standard EN 14476:2005 (phase 2; step 1)<sup>1</sup>, che indica le modalità di valutazione dell'attività virucida per sospensioni virali.

**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.; trietanolammina 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

---

<sup>1</sup> 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).



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]). 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% (ID<sub>50</sub>; 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 dura<sup>2</sup>
- Test in condizioni di pulito e di sporco;
- Temperatura: 20°C;
- Tempi di contatto: 30 secondi, 1, 5 e 60 minuti.

**Sospensione virale stock.** Il virus Influenza A H1N1 (S-OIV; swine origin influenza virus) utilizzato nel presente studio è stato isolato nel mese di maggio 2009 (strain A/Milan/UHSR1/2009) presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, Italy, da un tampone faringeo di un paziente affetto da sindrome influenzale. Filogeneticamente, l'isolato virale A/Milan/UHSR1/2009 è strettamente correlato agli isolati messicani e americani della prima fase dell'epidemia 2009 da S-OIV. Il virus è stato coltivato in cellule MDCK (Madin-Darby canine kidney; ATCC n°CCL-34TM). Le cellule sono state infettate in sospensione in Modified Eagle Medium (MEM, GIBCO) con l'aggiunta

<sup>2</sup> Preparazione:

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

Sol. B: NaHCO<sub>3</sub> (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.



di 2 µg/ml di tripsina. Dopo 1 ora a 35°C, 10% fetal bovine serum (GIBCO), 50 µg/ml of penicillin (Gibco), 100 µg/ml of streptomycin (Gibco) and of L-glutamine (2mM) (EuroClone) sono stati aggiunti e le cellule sono state incubate a 35°C, in una atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> per 5 giorni. Le sospensioni virali stock sono state ottenute infettando cellule confluenti al 90% coltivate in MEM con il 2% FCS. In presenza di effetto citopatico (ECP) maggiore dell'80%, le cellule infettate e i sopranatanti sono stati sottoposti a 3 cicli di congelamento-scongelo e successiva centrifugazione a bassa velocità per poter scartare i detriti cellulari. Il titolo virale della sospensione (denominata "sospensione virale test") è stato quindi determinato utilizzando diluizioni seriali della sospensione virale e il calcolo finale della ID<sub>50</sub> (metodo Spearman-Kärber<sup>3</sup>).

**Metodo e scelta delle condizioni sperimentali.** Le procedure analitiche sono state utilizzate in accordo al principio dello Standard EN14476:2005. In breve, un'aliquota della sospensione virale test è stata aggiunta al prodotto in esame in condizioni di pulito e di sporco<sup>4</sup>. La miscela è stata mantenuta a 20°C per i tempi di contatto previsti. Un'aliquota di essa è stata prelevata immediatamente dopo la conclusione dell'incubazione e l'attività virucida del disinfettante è stata subito soppressa mediante diluizione 1:10 (1:10 in MEM freddo al 2% FCS). È stata quindi preparata una serie di diluizioni 1:10 in MEM e ciascuna di esse è stata trasferita in pozzetti di una piastra microtiter insieme alla sospensione virale (1:1, V:V). Dopo incubazione il titolo virale residuo è stato calcolato valutando la ID<sub>50</sub> (metodo di Spearman-Kärber; diluizione della sospensione virale che mostra CPE nel 50% dei pozzetti della micropiastra).

<sup>3</sup> Utilizzando il metodo Spearman-Kärber, il titolo virale viene calcolato mediante la formula:  
logaritmo negativo del punto finale 50% = logaritmo negativo della più elevata concentrazione utilizzata - [(somma del % di infetti a ciascuna diluizione / 100 - 0.5) x (log delle diluizioni)]

<sup>4</sup> 1 parte di sospensione virale, 1 parte di sostanza interferente e 8 parti della formulazione disinfettante



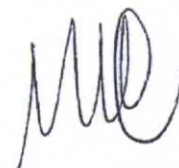
Le seguenti condizioni sperimentali sono state selezionate per il test:

- Concentrazioni della formulazione disinfettante in esame: non diluita
- Test in condizioni di pulito e in condizioni di porco;
- Temperatura d'incubazione: 20°C
- Tempi di contatto: 30 secondi, 1, 5, 60 minuti

**Validazione della procedura. Effetto citotossico della formulazione in esame e sensibilità al virus di cellule trattate e non trattate.**

Le possibili alterazioni strutturali delle cellule indotte dalla formulazione disinfettante sono state valutate partendo dalla formulazione in esame non diluita. Come descritto dallo Standard, 2 parti di acqua bidistillata sono state mescolate a 8 parti della formulazione; diluizioni seriali in ragione 10 sono state successivamente allestite in MEM e inoculate in colture cellulari semiconfluenti. Ogni modificazione microscopica è stata quindi registrata per ciascuna delle diverse diluizioni. Infine i titoli virali sono stati valutati comparativamente utilizzando cellule trattate con la più bassa diluizione non citotossica della formulazione disinfettante in esame.

**Test di referenza dell'inattivazione virale.** Come controllo del sistema è stato utilizzato il test alla formaldeide. Due parti della sospensione virale test sono state mescolate con 8 parti di PBS e 10 parti di formaldeide al 1,4% (w/v). Il tempo di contatto è stato 60 minuti. Al termine, un'aliquota della miscela è stata prelevata e l'attività virucida immediatamente soppressa per diluizione in un volume (1:10) di diluente (MEM+2%FCS). Sono state preparate diluizioni successive in ragione 10 e le diluizioni sono state trasferite in pozzetti di



piastre per colture cellulari. Dopo incubazione, il titolo dell'infettività ( $ID_{50}$ ; metodo di Spearman-Karber) è stato calcolato al fine di valutare l'attività virucida.

**Test dell'attività virucida.** La sospensione virale test (1 parte) è stata aggiunta al prodotto in esame (8 parti) addizionato di sostanza interferente (1 parte). Immediatamente dopo il termine del tempo di contatto scelto, 0,5 ml della miscela test sono stati mescolati con 4,5 ml di MEM freddo + 2% FCS. Dopo incubazione in ghiaccio per 30 minuti, diluizioni in ragione 10 (fino a  $10^{-6}$ ) sono state preparate e il virus è stato quantificato come descritto sopra.

**Verifica della metodologia.** Un test è ritenuto valido se sono completamente rispettati i seguenti criteri:

- la sospensione virale test deve avere almeno un titolo di  $10^8 ID_{50}$  per ml o possedere comunque una concentrazione che consenta la determinazione di una caduta d'infettività di almeno  $4 \log_{10}$ ;
- la riduzione rilevabile del titolo virale deve essere almeno  $4 \log_{10}$ ;
- la differenza tra il titolo logaritmico del virus e il titolo del virus nel test di riferimento deve essere tra  $10^{-0.5}$  e  $10^{-2.5}$  dopo 30 minuti, e tra  $10^{-2}$  e  $10^{-4.5}$  dopo 60 minuti;
- la citotossicità del prodotto non influenza la morfologia, la crescita, e la suscettibilità al virus per le diluizioni del prodotto che determinano una riduzione di  $4 \log_{10}$  dell'infettività del virus;
- la titolazione comparativa su cellule trattate con la formulazione in esame e non trattate (PBS) fornisce una differenza non superiore a 1 log del titolo virale.





## Risultati dello studio.

Le seguenti valutazioni preliminari sono state eseguite nello studio:

- per valutare la più bassa concentrazione del prodotto in esame che non genera alterazioni morfologiche cellulari, cellule MDCK confluenti al 90% sono state trattate con la formulazione disinfettante in esame (indiluita e da  $10^{-1}$  and  $10^{-2}$  in acqua dura). Alla diluizione  $10^{-1}$  non è stato osservato alcun effetto citotossico.
- È stato eseguito il test di referenza per l'inattivazione virale (vedi sopra). Nel test un titolo di  $-7.990$  è stato osservato dopo trattamento con PBS e un titolo di  $-3.950$  dopo trattamento con 1.4% formaldeide per 60 minuti, ottenendo una riduzione superiore a 4  $\text{Log}_{10}$ ; dopo 30 minuti i risultati sono stati  $-7,990$  e  $-6,345$ . Questi risultati sono in linea con i requisiti dello standard.
- E' stato calcolato il titolo infettante della preparazione virale stock, risultato essere  $-8,22$  ( $\text{Log}_{10}$  negativo della  $\text{IC}_{50}$ ). Su cellule trattate con la formulazione in esame alla più bassa diluizione non citotossica ( $10^{-1}$ ) il titolo virale è stato  $-7,65$ .

L'attività virucida della formulazione in esame è stata valutata tal quale, in condizioni di pulito e di sporco, alla temperatura di  $20^{\circ}\text{C}$  e ai seguenti tempi: 30 secondi, 1 minuto, 5 minuti e 60 minuti.



La Tabella 1 mostra i dati ottenuti ( $\log_{10}$  negativo del titolo) dopo trattamento con la formulazione in esame Laurit Soluzione .

Tabella 1

**Laurit Soluzione** ATTIVITÀ VIRUCIDA. CONDIZIONI DI PULITO E DI SPORCO. Virus dell'Influenza A H1N1 S-OIV. Formulazione tal quale (condizioni d'impiego). Preparazione virale stock: -8,22

Tempo di contatto	Titolo virale (condizioni di sporco)*	Titolo virale (condizioni di pulito)*
60 minuti	Nd**	Nd**
5 minuti	-1,20	-1,02
1 minuto	-3,04	-2,99
30 secondi	-4,12	-4,00

\*logaritmo negativo dell'end point 50% ; \*\* titolo virale non rilevabile

Laurit Soluzione ATTIVITÀ VIRUCIDA. CONDIZIONI DI PULITO E DI SPORCO. Virus dell'Influenza A H1N1 S-OIV. Formulazione diluita  $10^{-5}$  (diluizione di controllo). Preparazione virale stock: -8,25

Tempo di contatto	Titolo virale (condizioni di sporco)*	Titolo virale (condizioni di pulito)*
60 minuti	-1,92	-2,04
5 minuti	-4,92	-4,46
1 minuti	-6,60	-6,10
30 secondi	-7,20	-6,84

\*logaritmo negativo dell'end point 50%

In accordo con i dati riportati in Tabella 1, utilizzando la formulazione in esame non diluita per i tempi indicati e incubazione a 20°C, una riduzione del titolo virale (virus dell'Influenza A H1N1; S-OIV) superiore a 4  $\log_{10}$  è stata ottenuta, in condizioni di pulito e in condizioni di sporco, dopo un'incubazione di 30 secondi.

**Test report**  
EN 14476:2005

**Laboratorio**

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

**Prodotto in esame**

Denominazione prodotto: Laurit soluzione

Gel alcoolico per la disinfezione delle mani

Composizione (in 100 g di prodotto): alcol etilico 30.1 g.  $\pm$  1.0 g.; alcol isopropilico 18.1 g.  $\pm$  0.3 g.; alcol n. propilico 0.2  $\pm$  0.1g.; alcol butilico sec. 0.075 g.  $\pm$  0.025 g.; alcol metilico <0.005 g.; polimetacrilato 4.0 g.; trietanolammina 2.0 g.; ortofenilfenolo 0.03 g.; essenza acqua e coloranti q.b. a 100.0 g.

Numero di lotto: 0909437 (scadenza 08/2012)

Produttore: Pharmatek PMC S.r.l., Cremosano, CR, Italy

**Condizioni sperimentali**

Data del saggio: Settembre-Ottobre 2009

Temperatura di saggio: 20°C

Metodo di titolazione: ID<sub>50</sub>

Concentrazioni saggate: tal quale (non diluito) e 1:50 in acqua dura

Tempi di contatto: 60 minuti, 5 minuti, 1 minuto, e 30 secondi

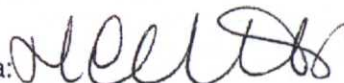
Procedura utilizzata per stoppare l'azione del prodotto: diluizione

Titolo della sospensione virale Influenza A H1N1 (S-OIV): -8.22

Risultati: Tabella 1

**Conclusioni:** utilizzando la formulazione in esame non diluita per i tempi indicati e incubazione a 20°C, una riduzione del titolo virale (virus dell'Influenza A H1N1; S-OIV) superiore a 4 log<sub>10</sub> è stata ottenuta, in condizioni di pulito e in condizioni di sporco, dopo un'incubazione di 30 secondi.

Data: 09/10/2009

Firma: 

**Prof. Massimo Clementi**

**Test report**  
EN 14476:2005

**Laboratory**

Laboratory of Microbiology and Virology, Università Vita-Salute San Raffaele, Milan, Italy.

**Identification of the sample**

Name of the product: : Laurit soluzione

Composition (100 g of product): ethyl alcohol 30.1 g.  $\pm$  1.0 g.; isopropyl alcohol 18.1 g.  $\pm$  0.3 g.; n. propyl alcohol 0.2  $\pm$  0.1g.; butyl alcohol sec. 0.075 g.  $\pm$  0.025 g.; methyl alcohol <0.005 g.; polymethacrylate 4.0 g.; triethanolamine 2.0 g.; orthophenylphenolo 0.03 g.; water and other components to 100.0 g.

Batch number: 0909437

Expiry date: 08/2012

Manufacturer: Huckert's International

**Experimental conditions**

Date of testing: September-October 2009

Test temperature: 20°C

Method of titration: ID<sub>50</sub>

Test concentrations: undiluted and diluted 1:50 in hard water

Contact times: 60 minutes, 5 minutes, 1 minute, and 30 seconds

Procedure to stop action of the product: dilution


Titer of virus suspensions: Influenza A H1N1 (S-OIV): -8.22

Results: see this report for final results.

**Conclusions**

Using the disinfectant formulation Laurit soluzione and following the European Standard EN 14476:2005 (phase 2; step 1) , a reduction of virus titers higher than 4 Log<sub>10</sub> was obtained, in the present study, after 30 seconds (dirty and clean conditions) of incubation.

Date: 09/10/2009

Signature: 

**Prof. Massimo Clementi**