



“CONFERENZA SULLA RICERCA PER IL CONTRASTO ALLA PANDEMIA DA COVID 19”

Un nuovo approccio di “testing” per la valutazione di innovativi sistemi di igienizzazione

Dr. Claudio Angelinetta – Direttore Tecnico Scientifico



INTRODUZIONE

la pandemia di Coronavirus ha modificato i nostri comportamenti quotidiani introducendo nuovi modi al fine di rendere più sicuri e sani i luoghi in cui trascorriamo il nostro tempo. Siamo stati costretti ad imparare nuove terminologie che, tradizionalmente, erano esclusivamente bagaglio di saperi settoriali; tra queste, le parole:

- ✓ **sanificazione,**
- ✓ **decontaminazione,**
- ✓ **disinfezione,**
- ✓ **igienizzazione,**
- ✓ **detersione,**
- ✓ **pulizia,**
- ✓ **sterilizzazione.**

INTRODUZIONE

L'Istituto superiore di sanità (ISS) ha redatto Report e raccomandazioni in tema di trasmissione dell'infezione da SARS-CoV-2, di sopravvivenza del virus su diverse superfici e di efficacia dei prodotti utilizzati per la pulizia e la disinfezione/sanitizzazione dei locali estremamente utili e chiare.

Le indicazioni contenute nel documento mettono in evidenza anche

- ✓ **l'impatto ambientale**
- ✓ **i potenziali rischi per la salute umana connessi al loro utilizzo**

Chiarisce, inoltre la differenza tra disinfettante, sanificante, igienizzante per l'ambiente e detergente.

INTRODUZIONE

Oggi esiste una maggiore sensibilità, conoscenza e cultura nel come difendersi dalla pandemia ed abbiamo compreso che dovremo conviverci.

Per questo motivo è fondamentale impostare strategie nuove e supportare la difesa dalla pandemia con un approccio modulato usando **prodotti innovativi a supporto dei vari prodotti comunemente usati.**

Gli aspetti

- ✓ **tossicologici,**
- ✓ **di efficacia,**

devono essere valutati e misurati.

INTRODUZIONE

Da qui la necessità di trovare metodi efficaci e innovativi per valutare tossicità ed efficacia.

Da anni la nostra struttura esegue test normati, ma nel contempo progetta nuovi test, studiati ad hoc, su prodotti innovativi per supportarne la sicurezza e l'efficacia appartenenti ai settori:

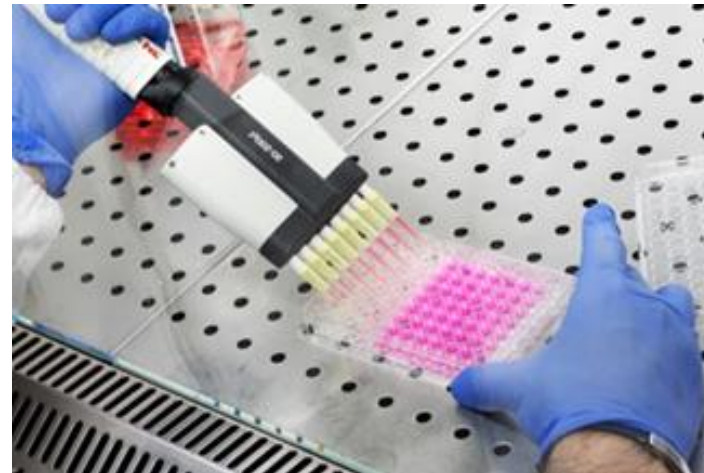
- ✓ **cosmetico,**
- ✓ **dispositivi medici,**
- ✓ **integratori alimentari,**
- ✓ **presidio medico chirurgici**
- ✓ **biocidi.**

Per far questo molti progetti sono studiati in collaborazione con istituti Universitari Italiani ed i laboratori sono inseriti nel PTS Parco Tecnologico Scientifico Pavia.

Colture cellulari

Gruppo omogeneo di cellule eucariotiche, di origine tissutale, in grado di crescere e moltiplicarsi in un semplice sistema 2D

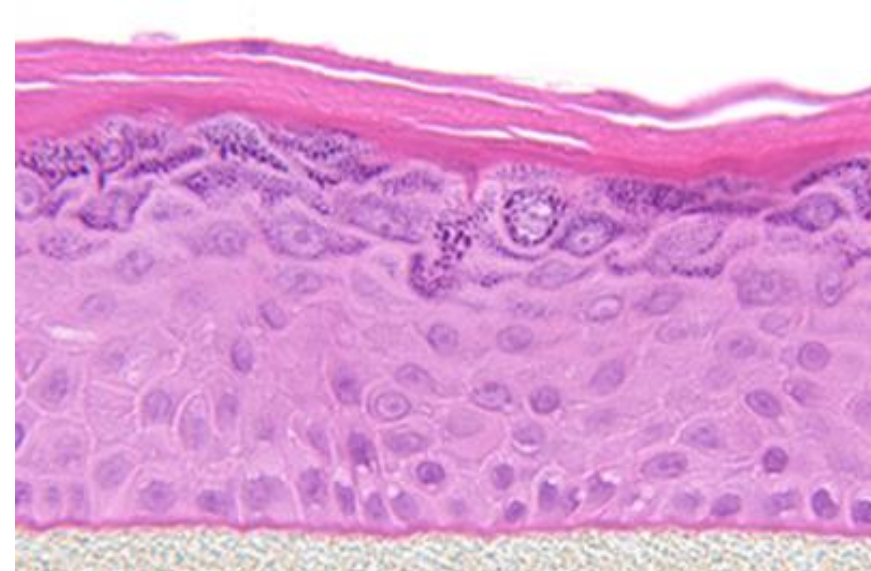
- ✓ **Origine animale o umana**
- ✓ **Coltivate in sospensione o adesione**
- ✓ **Condizioni controllate di crescita**



Tessuti umani ricostruiti

Cellule umane coltivate su un filtro inerte di policarbonato a formare strutture con caratteristiche morfologiche, istologiche e biochimiche paragonabili a quelle dei tessuti umani *in vivo*

- ✓ Risultati più predittivi e riproducibili rispetto a colture cellulari monostrato
- ✓ Ottima correlazione *vitro-vivo*
- ✓ Applicazione del prodotto come *in vivo*



VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA': Test di sicurezza

TEST STANDARD

- ✓ Citotossicità
- ✓ Irritazione cutanea su epidermide umana ricostruita (OECD 439)
- ✓ Irritazione oculare (OECD 492)
- ✓ Sensibilizzazione cutanea (OECD 442 e metodo morfologico)

TEST SPECIFICI in base al target di utilizzo del prodotto in studio

- ✓ Citotossicità
 - ❖ Cellule mucosa orale
 - ❖ Cellule mucosa nasale
 - ❖ Cellule tracheali
 - ❖ Cellule bronchiali
 - ❖ Cellule alveolari

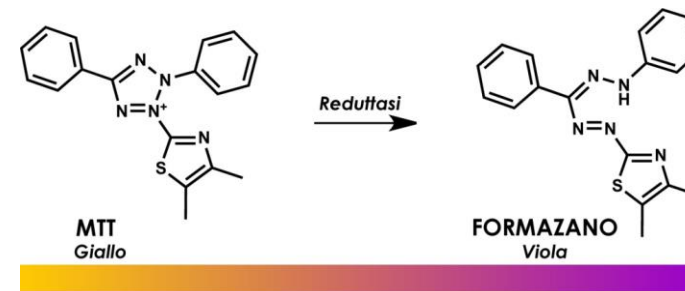
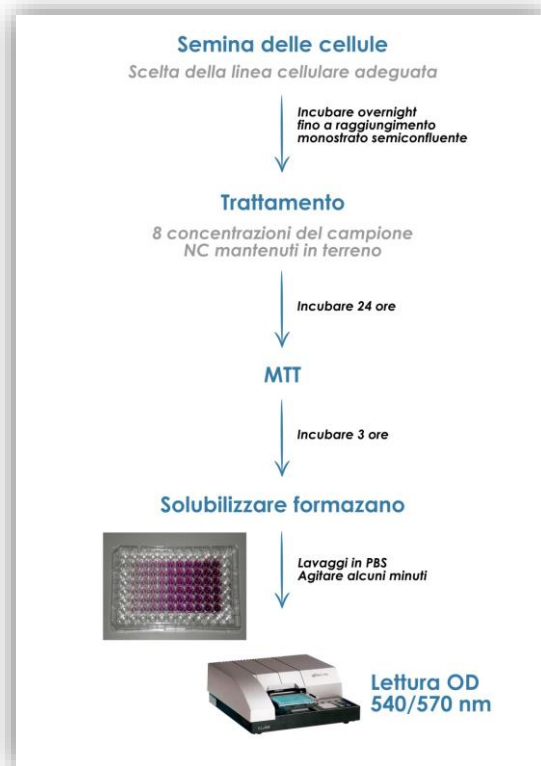
Irritazione della mucosa orale

Irritazione della mucosa nasale/alte vie respiratorie

TEST DI SICUREZZA STANDARD

CITOTOSSICITA-SAGGIO MTT

ESECUZIONE DEL TEST: Il test MTT consente di valutare il potenziale rilascio di sostanze citotossiche da parte di un prodotto cosmetico utilizzando colture in vitro di fibroblasti (o cheratinociti). Il saggio MTT è semplice, preciso e dà risultati riproducibili. Il componente chiave è 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil tetrazolio bromide o MTT. Questo prodotto è di colore giallastro in soluzione. Le Deidrogenasi mitocondriali delle cellule vitali scindono l'anello tetrazolio, che porta alla formazione di cristalli viola insolubili in soluzioni acquose. I cristalli sono ridisciolti in isopropanolo acidificato e la soluzione viola risultante viene misurata spettrofotometricamente. Un aumento o una diminuzione del numero delle cellule, concomitante ad un cambiamento della quantità di formazano formata, indica il grado di citotossicità causata dal materiale di prova. Vengono testate diverse concentrazioni del prodotto in esame e per ciascuna concentrazione si calcola la vitalità cellulare rispetto a cellule non trattate e viene calcolato il valore di IC50.



MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il valore IC50 indica la concentrazione del prodotto cosmetico necessaria per inibire la vitalità cellulare del 50%.

IC50 è un parametro che consente di valutare il potenziale citotossico di un composto, secondo lo schema seguente:

IC50 < 0,5 indica effetto citotossico.

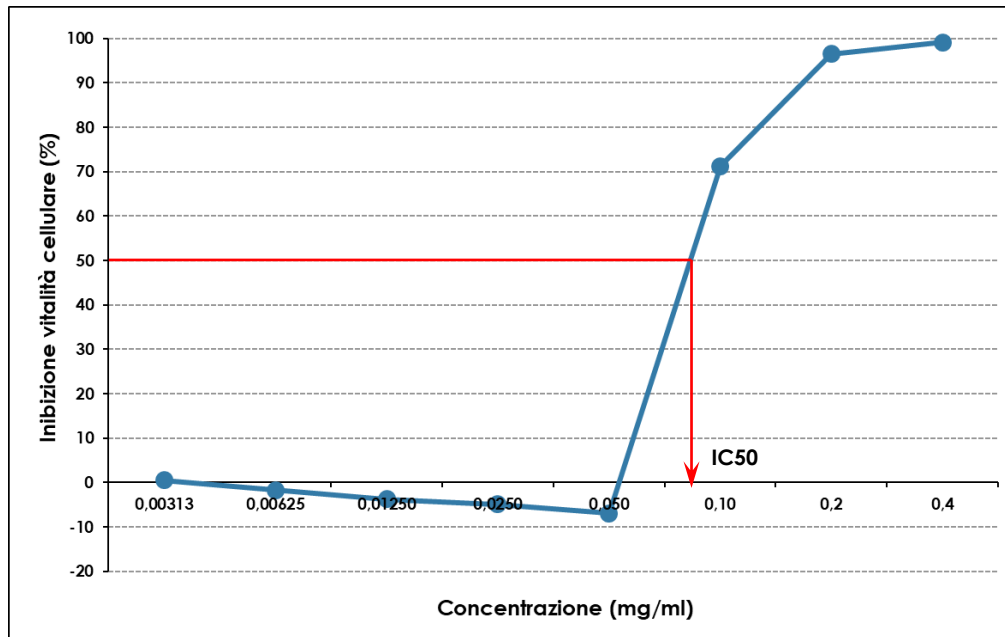
IC50 > 0,5 indica assenza di effetto citotossico

CITOTOSSICITA-SAGGIO MTT: Calcoli- Interpretazione-Applicabilità

$OD_{NC} = 100\%$ vitalità

$OD_{TS} = X\%$ vitalità

$$X = \frac{OD_{TS} \cdot 100}{OD_{NC}}$$



APPLICABILITA'

Fibroblasti/Cheratinociti
Cellule mucosa orale
Cellule mucosa nasale
Cellule tracheali
Cellule bronchiali
Cellule alveolari

IC50 → INDICE DI CITOTOSSICITA'

TEST DI SICUREZZA STANDARD

Test di irritazione cutanea *in vitro* - OECD TG 439

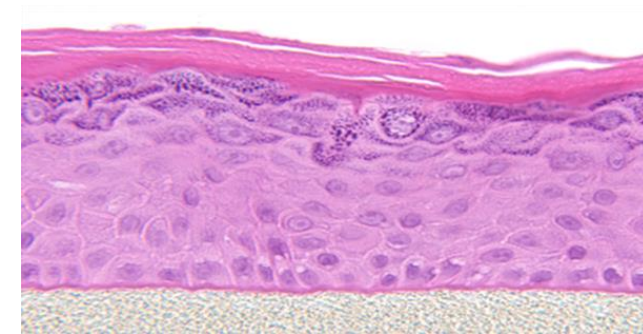
- ✓ Test condotto su epidermide umana ricostruita
- ✓ Modelli altamente indicati allo studio della irritazione cutanea pur in assenza di vascolarizzazione

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI- MODEL24 SIT
A) Pre-incubation				
Incubation time	18- 24 hours	18-24 hours	≥ 2 hours	15-30 hours
Medium volume	2mL	0.9mL	0.3 or 1mL	0.5mL
B) Test chemical application				
For liquids	10µL (26µL/cm ²)	30µL (47µL/cm ²)	16µL (32µL/cm ²)	25µL (83µL/cm ²)
For solids	10mg (26mg/cm ²) + DW (5µL)	25mg (39mg/cm ²) + DPBS (25µL)	16mg (32mg/cm ²) + DW (10µL)	25mg (83mg/cm ²) + DW (25µL)
Use of nylon mesh	Not used	If necessary	Applied	Not used
Total application time	15 minutes	60 minutes	42 minutes	15 minutes
Application temperature	RT	a) at RT for 25 minutes b) at 37°C for 35 minutes	RT	RT
C) Post-incubation volume				
Medium volume	2 mL	0.9mL x 2	2 mL	1 mL
D) Maximum acceptable variability				
Standard deviation between tissue replicates	SD≤18	SD≤18	SD≤18	SD≤18

RT: Room temperature

DW: distilled water

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffer Saline



- ✓ Applicazione topica del prodotto tal quale su almeno 3 tessuti
- ✓ 42 ore di post-incubazione
- ✓ Saggio di vitalità cellulare (MTT)

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Risultati *in vitro*

Previsione *in vivo*

Vitalità media ≤ 50%

Irritante

Vitalità media > 50%

Non irritante

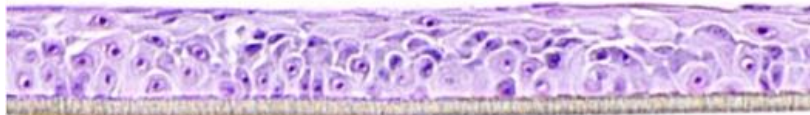
TEST DI SICUREZZA STANDARD

Test di irritazione oculare su epitelio ricostruito (OECD 492)

SCOPO: applicare il campione testato sulla superficie dell'epitelio oculare ricostruito e determinare quantitativamente la vitalità cellulare che permette la classificazione del campione come irritante o non irritante.

ESECUZIONE DEL TEST

- ✓ Eseguito su tessuti oculari umani ricostruiti (Cornea umana ricostruita)



- ✓ Sostanza testata tal quale sul almeno 2 tessuti
- ✓ Un unico tempo di contatto (30 minuti)
- ✓ Valutazione della vitalità cellulare con MTT

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Risultati *in vitro*

Vitalità media $\leq 60\%$

Vitalità media $> 60\%$

Classificazione GHS

Categoria 1 o 2

No Category

TEST DI SICUREZZA STANDARD

SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA – OECD 442E



DEFINIZIONE: Reazione di ipersensibilità ritardata indotta da molecole a basso peso molecolare che include:

- ✓ Legame dell'allergene alle proteine della pelle (evento chiave 1)
- ✓ Rilascio di molecole segnale pro-infiammatorie dai cheratinociti epidermici (evento chiave 2)
- ✓ Attivazione e maturazione delle cellule dendritiche (evento chiave 3) Migrazione delle cellule dendritiche ai linfonodi locali Proliferazione dei linfociti T (evento chiave 4)

Procedura che quantifica i cambiamenti nell'espressione di due specifici antigeni di membrana (CD54 e CD86) associati al processo di attivazione di monociti e cellule dendritiche

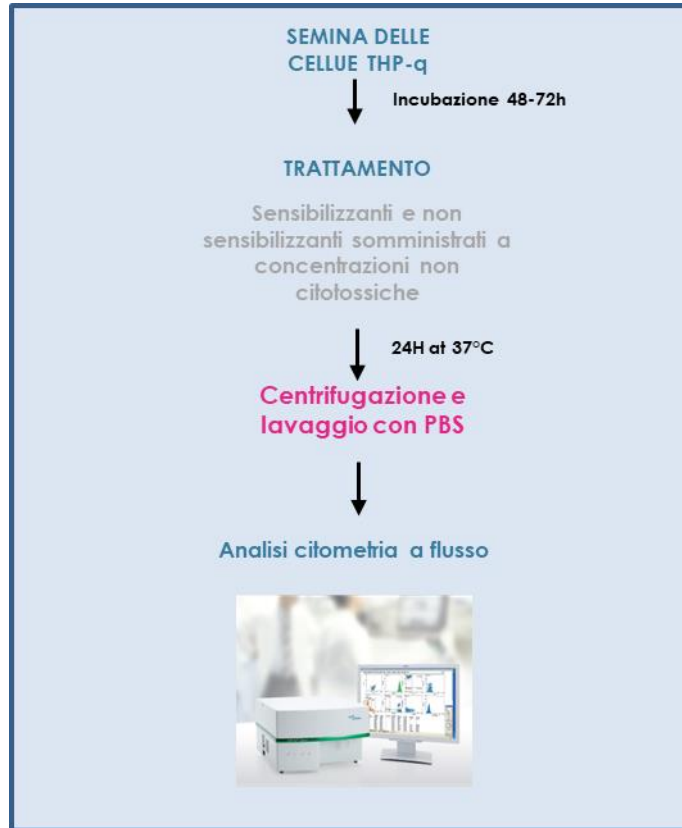
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le cellule non trattate sono definite da un unico cluster di eventi, mentre le cellule trattate con sostanze sensibilizzanti mostrano una seconda sottopopolazione situata nella parte superiore sinistra di quella principale caratterizzata da un segnale FSC inferiore e valori di SSC leggermente elevati

TEST DI SICUREZZA STANDARD

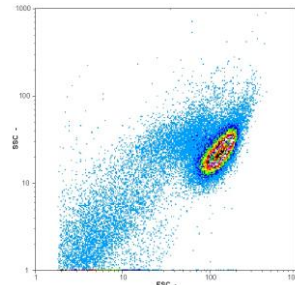
SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA – METODO MORFOLOGICO

metodo alternativo in vitro per discriminare tra sostanze sensibilizzanti e non sensibilizzanti basato sull'analisi dei parametri di diffusione citometrica

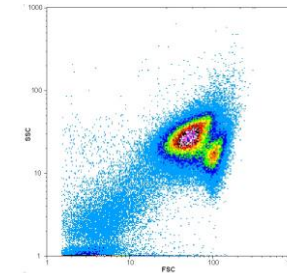


INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

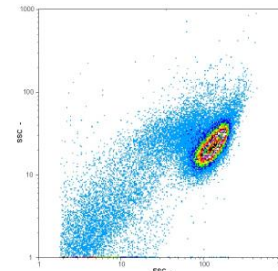
Le cellule non trattate sono definite da un unico cluster di eventi, mentre le cellule trattate con sostanze sensibilizzanti mostrano una seconda sottopopolazione situata nella parte superiore sinistra di quella principale caratterizzata da un segnale FSC inferiore e valori di SSC leggermente elevati



Cellule non trattate



Cellule trattate con sensibilizzante DNCB



Cellule trattate con Glicerolo non-sensibilizzante

Le cellule trattate con sostanze non sensibilizzanti mostrano una distribuzione simile delle cellule non trattate

TEST DI SICUREZZA SPECIFICI

PRODOTTI SPRAY con possibile inalazione

- VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITA IN VITRO MEDIANTE SAGGIO MTT SU CELLULE DELLA MUCOSA NASALE
- VALUTAZIONE IN VITRO DEL POTENZIALE CITOTOSSICO/IRRITANTE SU EPITELIO NASALE
- VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITA IN VITRO MEDIANTE SAGGIO MTT SU CELLULE ALVEOLARI

SCOPO: verificare l'effetto citotossico del prodotto in studio su colture in vitro di cellule alveolari (A549) mediante saggio MTT e quindi valutarne la possibile tossicità a livello polmonare.

TEST AD HOC sulla base di riferimenti bibliografici

Al fine di scegliere le concentrazioni di prodotto da applicare sulle cellule simulando la quantità di prodotto che potrebbe raggiungere gli alveoli polmonari

"Exposure of 19 substances to lung A549 cells at the air liquid interface or under submerged conditions reveals high correlation between cytotoxicity in vitro and CLP classifications for acute lung toxicity" Katrin Gohlscha, Harald Mücktera, Dirk Steinritzab, Michaela Aufderheidec, Sebastian Hoffmannnd, Thomas Gudermann, Andreas Breita - Toxicology Letters Volume 316, November 2019, Pages 119-126

PRODOTTI LIQUIDI con possibile ingestione/contatto con mucosa boccale

- VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITA IN VITRO MEDIANTE SAGGIO MTT SU CELLULE DELLA MUCOSA ORALE/GENGIVALE
- VALUTAZIONE IN VITRO DEL POTENZIALE CITOTOSSICO/IRRITANTE SU EPITELIO ORALE/GENGIVALE RICOSTRUITO

VALUTAZIONE EFFICACIA IGIENIZZANTE – BIOCIDIA

La dimostrazione dell'efficacia di un disinfettante, sia esso battericida, fungicida, sporicida o virucida, è un chiaro requisito del BPR e dell'EPA è richiesta ai produttori di disinfettante per ottenere la registrazione.

2 APPROCCI

METODI NORMALI:

In Europa, l'immissione sul mercato e l'uso di biocidi sono regolamentati dal Biocidal Products Regulation (BPR) 528/2012

Negli Stati Uniti, i disinfettanti chimici sono registrati e regolamentati dall'Agenzia statunitense per la protezione dell'ambiente (EPA) ai sensi del Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA) (40 CFR Parts 150-189) [2]. Secondo il FIFRA, i disinfettanti chimici sono da considerare "pesticidi antimicrobici".

METODI INTERNI AD HOC

Metodi messi a punto ad hoc nei laboratori di testing al fine di valutare l'efficacia di prodotti/dispositivi igienizzanti sulla base della tipologia e del target d'uso (mani, superfici, aria, ambiente...)

VALUTAZIONE EFFICACIA IGIENIZZANTE- BIOCIDA

METODI NORMATI – ALCUNI ESEMPI

UNI EN 14476:2019 - Disinfettanti chimici e antisettici - Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività virucida in area medica - Metodo di prova e requisiti (Fase 2/Stadio 1)

Si applica a prodotti che sono utilizzati **in area medica** per l'applicazione come "handrub", "handwash", disinfezione degli strumenti per immersione, disinfezione delle superfici con rimozione meccanica per mezzo di salviette, disinfezione per mezzo di spray, "flooding" o altri mezzi, disinfezione dei tessuti.

Questa norma Europea si applica ad aree e situazioni dove la disinfezione è indicata per motivi medici. Questo avviene nella cura dei pazienti, per esempio:

- ✓ in ospedali, in altre istituzioni cliniche, presso istituti per la cura dei denti, in cliniche scolastiche, di asili e di case di cura;
- ✓ può anche avvenire sul posto di lavoro e a casa. Può anche includere servizi come lavanderie e cucine che forniscono prodotti direttamente ai pazienti.

VALUTAZIONE EFFICACIA IGIENIZZANTE- BIOCIDA

METODI NORMATI – ALCUNI ESEMPI

UNI EN 1276:2019 - Disinfettanti chimici ed antisettici - Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività battericida di disinfettanti chimici e antisettici usati in campo alimentare, industriale, domestico e istituzionale - Metodo di prova e requisiti (fase 2, stadio 1)

La norma specifica un metodo di prova ed i requisiti minimi per l'attività battericida di disinfettanti chimici e di prodotti antisettici che formano un preparato omogeneo e fisicamente stabile, quando vengono diluiti con acqua a dura o, nel caso di prodotti pronti all'uso, con acqua. I prodotti possono essere testati solo ad una concentrazione dell'80% o minore, siccome avviene sempre una diluizione quando vengono aggiunti gli organismi da testare.

Questo documento si applica a prodotti che sono utilizzati in campo alimentare, industriale, domestico ed istituzionale, escludendo le aree e le situazioni dove la disinfezione è già medicalmente indicata ed escludendo prodotti usati su tessuti vivi tranne quelli per l'igiene delle mani nelle aree considerate sopra

UNI EN 1499:2013 - Disinfettanti chimici ed antisettici - Lavaggio igienico delle mani - Metodo di prova e requisiti (fase 2, stadio 2)

Metodo di prova che simula le condizioni pratiche per stabilire se un prodotto, utilizzato per il lavaggio igienico delle mani, riduce la flora batterica transitoria, sulle mani quando è utilizzato per il lavaggio igienico delle mani di volontari, artificialmente contaminate

METODI NORMATI – ALCUNI ESEMPI

UNI EN 17387:2021 Disinfettanti chimici ed antisettici - Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività battericida, levuricida e/o fungicida di disinfettanti chimici in area medica, su superfici non porose senza azione meccanica - Metodo di prova e requisiti (fase 2, stadio 2)

si applica a prodotti utilizzati in area medica per disinfettare superfici non porose, senza aiuto di azione meccanica.

Questa norma si applica in aree e situazioni dove la disinfezione o l'antisepsi è medicalmente prescritta AD ES nell'ambito della cura dei pazienti, ad esempio:

- ✓ negli ospedali, nelle strutture mediche pubbliche e negli studi dentistici
- ✓ negli ambulatori scolastici degli asili nido e degli asili; od anche nei luoghi di lavoro o in quelli domestici.

Sono inclusi i servizi che forniscono prodotti direttamente ai pazienti come la lavanderia o la cucina.

METODI NORMATI – ALCUNI ESEMPI

UNI EN 1650:2019 - Disinfettanti chimici ed antisettici - Prova quantitativa in sospensione per la valutazione di attività fungicida o levuricida di disinfettanti chimici e antisettici utilizzati in campo alimentare, industriale, domestico e istituzionale - Metodo di prova e requisiti (fase 2, stadio 1)

metodo di prova ed i requisiti minimi per l'attività fungicida o levuricida di disinfettanti chimici e di prodotti antisettici che formano un preparato omogeneo e fisicamente stabile, quando vengono diluiti con acqua a dura o, nel caso di prodotti pronti all'uso, con acqua. I prodotti possono essere testati solo ad una concentrazione dell'80% o minore, siccome avviene sempre una diluizione quando vengono aggiunti gli organismi da testare.

Questo documento si applica a prodotti che sono utilizzati in **campo alimentare, industriale, domestico** ed istituzionale, escludendo le aree e le situazioni dove la disinfezione è già medicalmente indicata ed escludendo prodotti usati su tessuti vivi tranne quelli per l'igiene delle mani nelle aree considerate sopra.

UNI EN 1500:2013 Disinfettanti chimici ed antisettici - Trattamento igienico delle mani per frizione - Metodo di prova e requisiti (fase 2, stadio 2)

specifica un metodo di prova che simula le condizioni pratiche per stabilire se un prodotto, utilizzato per il trattamento igienico delle mani per frizione, riduce la flora batterica transitoria, quando è utilizzato per la frizione delle mani di volontari, artificialmente contaminate.

METODI INTERNI AD HOC – es. PRODOTTI IGIENIZZANTI MANI

Al fine di valutare la capacità del campione testato di mantenere sotto controllo la carica microbica viene valutata l'efficacia antimicrobica dello stesso nei confronti di specifici microorganismi.

I ceppi microbici vengono scelti in base alla tipologia di prodotto, alla destinazione e alla modalità di utilizzo dello stesso.

Le sospensioni dei microorganismi scelti vengono trattate, per tempi prestabiliti, con specifiche concentrazioni del campione scelte sulla base della tipologia di prodotto (leave on (prodotto tal quale) o rinse off (diluizione 1:10)).

MICROORGANISMI – CEPPI STANDARD

- ✓ S. aureus
- ✓ S. epidermidis
- ✓ E. coli
- ✓ P. aeruginosa
- ✓ C. Albicans
- ✓ A. brasiliensis

è possibile utilizzare altri microorganismi specifici

METODI INTERNI AD HOC – es. LAMPADA UVC x superfici

VALUTAZIONE dell'AZIONE BATTERICIDA-FUNGICIDA-SPORICIDA

AZIONE BATTERICIDA: es. Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli

AZIONE FUNGICIDA: es. Candida albicans, Aspergillus brasiliensis

AZIONE SPORICIDA: es. Bacillus subtilis spores

ESECUZIONE DEL TEST:

3 tempi di irraggiamento (esempio 15 sec-30 sec- 1 min)

- ✓ Preparazione sospensione cellulare a carica nota in soluzione fisiologica sterile
- ✓ Irraggiamento con il dispositivo in studio secondo le modalità d'uso
- ✓ Semina su terreno della sospensione microbica non irraggiata, irraggiata e soluzione fisiologica sterile
- ✓ Incubazione e conta

-Calcolo indice di abbattimento confrontando il campione irraggiato e quello non trattato

METODI INTERNI AD HOC – es. LAMPADA UVC x superfici

VALUTAZIONE dell'AZIONE VIRUCIDA

Effetto virucida: Herpes virus canino - alternativa in vitro a Coronaviridae in quanto:

- ✓ Entrambi i virus agiscono a livello polmonare e sull'epitelio olfattivo
- ✓ Per entrambi i virus è noto un coinvolgimento delle cellule NK

ESECUZIONE DEL TEST:

3 tempi di irraggiamento (esempio 15 sec - 30 sec- 1 min ma da confermare)

- ✓ Preparazione multiwell con cellule target cresciute al 80% della confluenza
- ✓ Preparazione sospensione virale a titolo noto e irraggiamento con il dispositivo in studio secondo le modalità d'uso
- ✓ Infezione delle cellule target e incubazione
- ✓ Valutazione efficacia virus (EFFETTO CITOPATICO) tramite osservazione microscopica previa colorazione

-Calcolo dell'indice di abbattimento virale

CONCLUSIONI

Abbiamo visto come sia possibile verificare e testare **prodotti innovativi che possono venire a supporto dei vari prodotti comunemente usati.**

Valutandone gli aspetti

- ✓ **tossicologici,**
- ✓ **di efficacia,**

Così da poter combattere e difenderci in sicurezza e con efficacia dalla pandemia

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

CONTATTI



BIO BASIC EUROPE S.r.l.

Via Antonio Panizzi n.10, 20146, Milano (MI)
+39 024155729 - info@biobasiceurope.it
www.biobasiceurope.it – P.IVA/CF 11930080152



CDC – Istituto di Ricerche Dermo-Cliniche

Viale Misurata n. 59, 20146, Milano (MI)
info@cdcdermoistitute.it



BIO BASIC LAB

presso “Parco Tecnico Scientifico” – Università degli Studi di Pavia
Via Taramelli n. 24, 27100, Pavia (PV)
testing@biobasiceurope.it

