

DISINFETTANTI VS PSA: STATO DELL'ARTE TRA CONOSCENZE E LACUNE

DISINFECTANTS VS PSA: AN OVERVIEW BETWEEN KNOWLEDGE AND GAPS

BEATO M.S., D'ERRICO F., FELIZIANI F.

*CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER LE PESTI SUINIE, (CEREP)
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE
"TOGO ROSATI",
Via G. Salvemini 1, 06126 Perugia, Italy*

Parole chiave: Peste Suina Africana, disinfettanti

Keywords: African Swine Fever, disinfectants

RIASSUNTO

La Peste Suina Africana (PSA) è una malattia infettiva virale con un alto tasso di mortalità nei suidi domestici e selvatici, causata da un virus a DNA a doppio filamento (dsDNA), attualmente classificato come unico membro della famiglia *Asfarviridae*, genere *Asfivirus*. Il virus si trasmette per contatto diretto attraverso animali infetti e/o zecche e indiretto attraverso fomite quali superfici, indumenti, calzature, attrezzature e mezzi di trasporto. L'uomo svolge un importante ruolo di veicolo meccanico.

La malattia è riscontrata in Unione Europea dal 2014, colpendo 14 su 27 paesi, tra cui, di recente, la penisola italiana. Al momento non sono disponibili vaccini sicuri e efficaci per combattere la malattia, pertanto l'applicazione di rigorose misure di biosicurezza rappresenta una misura di controllo essenziale. Corrette procedure di pulizia e decontaminazione sono necessarie sia come strumenti di prevenzione che di mitigazione del rischio, da attuare in corso di focolai di PSA. La rapida diffusione della PSA ha evidenziato le molteplici carenze di conoscenza su diversi aspetti della malattia e sulle caratteristiche del virus, tra cui la resistenza ad agenti chimici e fisici. La disponibilità di dati sulla resistenza ad agenti chimici del virus consente di individuare misure e strumenti idonei per corrette azioni di decontaminazione.

Attraverso uno studio approfondito sui dati disponibili attualmente in letteratura, è stato possibile individuare e riassumere i principali composti chimici testati sperimentalmente contro il virus della PSA. Inoltre sono stati analizzati i metodi adottati per valutarne l'attività virucida contro la PSA in comparazione a metodi standard applicati per la registrazione di prodotti biocidi in Europa. Tale studio ha fatto emergere le conoscenze disponibili e le lacune di dati e approcci per lo studio di sostanze chimiche ad attività virucida contro la PSA.

ABSTRACT

African swine fever (ASF) is an infectious viral disease with a high mortality rate in domestic and wild pigs, caused by a double-stranded DNA virus (dsDNA), currently classified as the only member of the family *Asfarviridae*, genus *Asfivirus*. The virus is transmitted by direct contact through infected animals or ticks and indirectly through fomites such as surfaces, clothing, footwear and agricultural implements. ASF reached the European Union in 2014, affecting 14 of the 27 EU countries including, recently, the Italian peninsula. Its rapid spread has revealed many gaps in knowledge about the mode of transmission and environmental resistance of the virus.

There are currently no safe and effective vaccines available to combat the disease; therefore biosecurity is an essential control measure. Cleaning and disinfection procedures are needed both

as prevention and mitigation tools to be implemented in the field during ASF outbreaks. Through an in-depth study of the data available in the literature, it has been possible to identify and summarize the main chemical compounds effective against ASF and the standardized methods adopted to evaluate their virucidal activity. Such study highlighted the gaps in knowledge regarding data on chemicals active against ASFV and the experimental protocols adopted to investigate the virucidal activity of chemical compounds.

INTRODUZIONE

La Peste Suina Africana (PSA) è una malattia emorragica che colpisce suidi domestici e selvatici di tutte le età mostrando tassi di mortalità molto elevati (1). La malattia è causata da un virus a DNA a doppio filamento (dsDNA) di grandi dimensioni del genere *Asfivirus* unico membro della famiglia *Asfarviridae* (2). Il virione ha una struttura complessa, di tipo icosaedrico con oltre 170 Open Reading Frames (ORF) che codificano per numerose proteine con funzioni ancora incerte e/o da scoprire (3-5). Ad oggi sono riconosciuti 24 genotipi (I-XXIV) (6-11), tutti rilevati nel continente africano, e classificati in base alle caratteristiche del gene B646L codificante per la proteina p72, su cui si basa anche la diagnosi molecolare. Le modalità di trasmissione della PSA sono sia dirette, attraverso animali infetti e/o zecche, che indirette attraverso fomite contaminati, oggetti e superfici inanimate che fungono da vettori di trasmissione. Inoltre l'uomo svolge un importante ruolo di veicolo meccanico. In assenza di vaccini, la biosicurezza rappresenta lo strumento essenziale di prevenzione e di controllo di questa infezione.

La PSA è diventata probabilmente la malattia epizootica più rilevante dal punto di vista della salute animale nell'ultimo decennio, colpendo diverse regioni a livello globale. A seguito dell'introduzione del genotipo II in Georgia nel 2007, il virus è stato identificato in Russia con successiva diffusione verso ovest, in Europa nel 2014 e verso est in Cina nel 2018 (12,13). Successivamente la PSA è stata riscontrata anche in diversi paesi asiatici (14,15). La sua rapida diffusione nell'ultimo decennio ha suscitato grande preoccupazione per le conseguenze sulla salute animale e per gli impatti economici diretti e indiretti. Tale preoccupazione è aumentata drammaticamente con l'effettiva conferma della PSA in 14 dei 27 paesi dell'UE e, di recente, anche nei cinghiali nell'Italia peninsulare (16,17). I recenti focolai di PSA registrati nei paesi europei hanno evidenziato la scarsità di dati e informazioni su diversi aspetti della malattia e del virus. Uno di questi è rappresentato dalla resistenza agli agenti fisici e chimici del virus. I dati sull'efficacia di prodotti e composti chimici utilizzabili contro la PSA sono utili per pianificare corrette azioni di decontaminazione. Pertanto il presente lavoro, intende fornire una panoramica dei dati sinora disponibili su prodotti e composti chimici testati contro la PSA e sulle metodologie applicate per determinarne l'attività virucida evidenziando la presenza di dati frammentari e di metodologie non idonee a mimare situazioni di campo.

MATERIALI E METODI

Iter autorizzativo per i biocidi

Nel 2012 è stato adottato il Regolamento Europeo (EU) n.528/2012 (BPR) entrato in vigore dall'1 Gennaio 2013, che concerne l'immissione sul mercato e l'uso di biocidi, utilizzati per la tutela dell'uomo, degli animali, dei materiali o contro organismi nocivi, quali parassiti, batteri o virus, mediante l'azione dei principi attivi contenuti nel biocida. Il Regolamento EU n.528/2012 abroga la direttiva 98/8/CE, e inserisce i disinfettanti nella categoria dei biocidi e non più nella categoria dei presidi medico-chirurgici (PMC). Pertanto a seguito dell'introduzione del nuovo regolamento Europeo (n.528/2012), i prodotti presenti sul mercato nazionale possono essere commercializzati come PMC ancora per due anni (fino al 2024) prima di dover essere obbligatoriamente autorizzati come biocidi. L'Agenzia europea per le sostanze chimiche

(ECHA), che attua la legislazione dell'Unione europea in materia di sostanze chimiche, è l'organo tecnico di approvazione dei biocidi in Europa. Tutti i biocidi devono ottenere un'autorizzazione prima di poter essere immessi sul mercato. L'approvazione dei principi attivi avviene a livello dell'Unione Europea e la successiva autorizzazione dei biocidi viene attuata a livello degli Stati membri. Il processo autorizzativo può avvenire in uno dei seguenti modi:

- Autorizzazione nazionale per immettere il biocida nel mercato di un singolo Stato membro
- Autorizzazione per riconoscimento reciproco per estendere l'autorizzazione al commercio del biocida in altri Stati membri dell'Unione
- Autorizzazione dell'Unione ossia richiesta di autorizzazione al commercio del biocida in tutti gli Stati membri

Ai fini dell'autorizzazione i principi attivi devono essere testati in base ad alcuni protocolli definiti (Standard) e in base al tipo di prodotto ("Product type"- PT) ovvero l'uso. I prodotti usati per l'"Igiene veterinaria" appartengono ai prodotti di tipo 3 (PT3) ovvero sono: "[.....] disinfettanti, saponi disinfettanti, prodotti per l'igiene orale o corporale o con funzione antimicrobica. Prodotti usati per disinfettare i materiali e le superfici associati al ricovero o al trasporto degli animali".

Per la presentazione delle domande e lo scambio di dati e informazioni tra richiedente, ECHA, autorità competenti dello Stato membro e Commissione europea è utilizzata un'apposita piattaforma informatica, il registro per i biocidi (R4BP 3) in cui però non sono presenti i prodotti commercializzati ancora come PMC.

Protocolli per testare l'attività virucida dei composti chimici nel settore veterinario

Secondo la classificazione di Holl e Youngner 1959 (18) e sulla base della loro resistenza agli agenti chimici, i virus possono essere distinti in 3 categorie:

Categoria A: virus di dimensioni medio-grandi, contengono envelope e sono molto suscettibili ai detergenti, saponi e tutti i disinfettanti, alla disidratazione e spesso non persistono a lungo a meno che l'ambiente non sia umido e fresco

Categoria B: virus di dimensioni inferiori, privi di membrana lipidica e sono relativamente resistenti ai disinfettanti lipofili come i detergenti

Categoria C: virus che hanno caratteristiche intermedie per dimensioni e sensibilità ai disinfettanti antivirali rispetto al gruppo A e al gruppo B.

Il virus della PSA appartiene alla categoria A, cui appartengono virus sensibili all'azione di comuni disinfettanti antivirali quali: alcali, aldeidi, acidi, cloro e composti a base di cloro, composti a base di iodio, agenti ossidanti, composti fenolici e composti di ammonio quaternario. Nell'UE, i metodi per testare l'efficacia di disinfettanti e antisettici sono stati sviluppati dal Comitato Tecnico 216 (TC216) del Comitato europeo di normalizzazione (CEN) dal 1989 (19-21). Questi metodi prevedono tre fasi di test su disinfettanti e antisettici. Questo modello è appunto identificato come tri-fasico. Ogni fase consta di test (Standard) da eseguire per verificarne l'efficacia. In breve:

Fase 1: Test di sospensione generico, utilizzato per determinare l'attività virucida di un disinfettante indipendentemente dalle aree di applicazione

Fase 2-Step 1: Test di sospensione, specifico per campo di applicazione, utilizzato per simulare in laboratorio differenti condizioni d'uso (UNI EN 14675:2015) (22)

Fase 2-Step 2: Test in modalità carrier, che prevede l'essiccazione del virus su differenti tipologie di superfici che simulano l'ambiente di utilizzo (UNI EN 17122:2020) (23)

Fase 3: Test condotti in campo, in condizioni pratiche di utilizzo, attualmente non sviluppati ovvero per i quali non è disponibile nessuno standard

Il test di sospensione (Fase 2-stadio 1) è basato sul contatto del virus in coltura cellulare con il disinfettante in forma liquida. Al contrario, nel test in modalità carrier (Fase 2- stadio 2), il virus è essiccato su una superficie (porosa o non porosa), e successivamente esposto ad un

disinfettante, spruzzato o messo a contatto nella sua forma liquida. Successivamente le due tipologie di test saggiano al termine di un tempo di contatto prestabilito, la quantità di virus vitale residua (Figura 1 e 2). Gli standard indicano l'abbattimento della carica virale post contatto del disinfettante (valore espresso come differenza tra la quantità di virus pre e post- esposizione) che si deve ottenere per indicare che il disinfettante ha superato il test. Una riduzione del titolo di 3 o 4 log₁₀, a seconda del PT, stabilisce l'efficacia del prodotto. In breve, i composti chimici da testare vengono diluiti con acqua ad una determinata durezza (Tabella 1, Figura 1). Il test di sospensione secondo la norma UNI EN 14675:2015 indica la possibilità di eseguire le prove in presenza sostanze interferenti: l'albumina sierica bovina (BSA) (3,0 g/L) simula un livello basso delle condizioni di "sporco" mentre una maggiore concentrazione di BSA (10 g/L) più estratto di lievito (YE) 10 g/L simula una condizione di sporco di alto livello. Una parte della sospensione del virus è mescolata con una parte della sostanza interferente e incubata a +10 °C per 2 minuti (min). Successivamente, vengono aggiunte otto parti della sostanza chimica da testare. La miscela ottenuta, composta da virus, sostanza chimica da testare e sostanza interferente (miscela in esame - "test substance") viene incubata a +10 °C per 30 min, condizione di prova identificata come obbligatoria. Temperature e tempi di contatto aggiuntivi a quelli obbligatori (+10 C e 30 min) possono essere testati secondo le indicazioni d'uso del composto chimico in esame. Successivamente a questo tempo di contatto, la miscela è posta in ghiaccio allo scopo di fermare l'attività virucida del prodotto chimico in esame. La miscela in esame è successivamente diluita al fine di eseguire una titolazione virale in coltura cellulare e valutare il titolo residuo del virus dopo il contatto con il prodotto/disinfettante in esame (Figura 1).

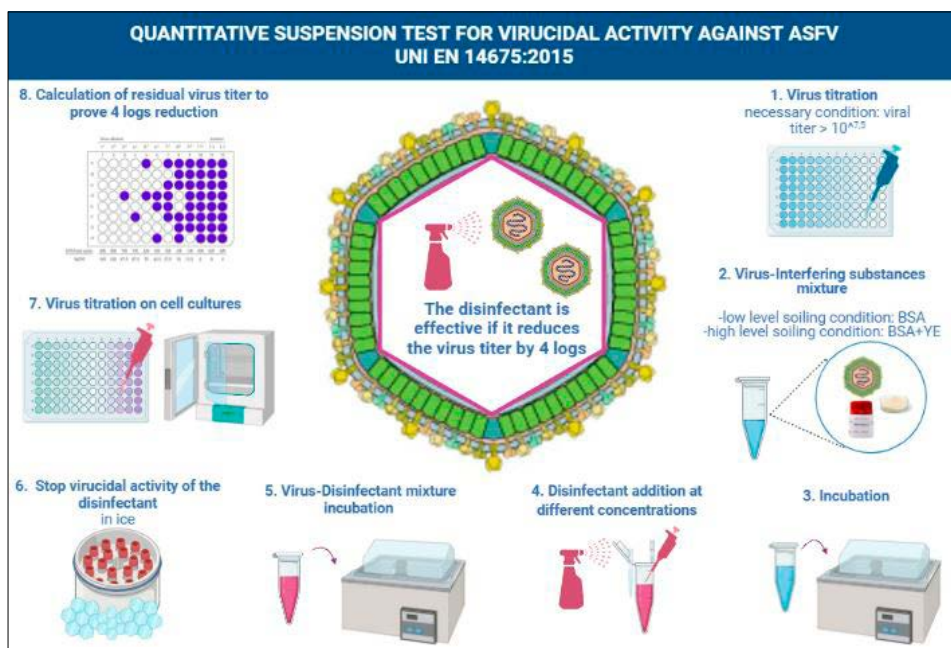


Figura 1. Test in sospensione per valutare l'attività virucida dei disinfettanti contro la PSA secondo la norma UNI EN 14675:2015. Creato in Biorender.com (<https://biorender.com/>), ultimo accesso l'8 marzo 2022.

Figure 1. Quantitative Suspension Test for virucidal activity against ASFV according to the UNI EN 14675:2015 standard. Created in Biorender.com (<https://biorender.com/>), last accessed on 8th March 2022.

Le norme UNI EN che descrivono i protocolli da adottare per valutare l'attività virucida di una sostanza/principio attivo per il settore veterinario indicano che tutti i prodotti devono essere testati contro il *Bovine enterovirus 1* per poi essere riconosciuti e autorizzati come virucidi e pertanto utilizzabili contro tutti i virus in ambito veterinario. Ne consegue che a scopo regolatorio una sostanza, per essere immessa sul mercato con la dicitura "virucida" in etichetta, deve essere testata secondo il modello trifase sopra descritto e obbligatoriamente contro il *Bovine enterovirus 1* e non necessariamente contro altri virus.

In USA il processo è simile, poiché gli standard da seguire prevedono test in sospensione (ASTM 1052:20) e in modalità carrier (ASTM 1053:20); tuttavia ogni prodotto è registrato specificatamente contro il virus utilizzato nel test (Figura 2).

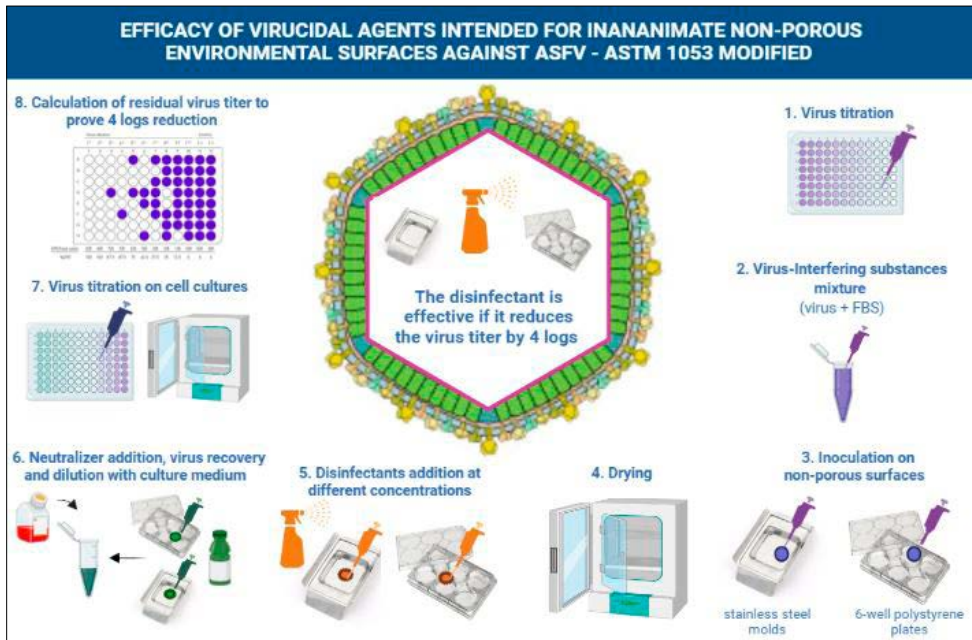


Figura 2. Metodo di prova applicato per valutare l'attività virucida del disinfettante su inanimati non porosi superfici ambientali secondo gli standard ASTM E1053-20. La figura riporta il metodo adottato da Krug et al. (24) per PSA. Creato in Biorender.com (<https://biorender.com/>), ultimo accesso 8 marzo 2022. FBS: siero bovino fetale.

Figure 2. Test-method applied to assess the virucidal activity of disinfectant on inanimate non-porous environmental surfaces according to ASTM E1053-20 standards. The figure reports the method modified by Krug et al; 2011 for ASFV. Created in Biorender.com (<https://biorender.com/>), last accessed on 8th March 2022.

Gli standard a livello internazionale presentano alcune differenze tra loro, quali il rapporto disinfettante/virus, la temperatura obbligatoria, il tempo di contatto, la presenza e la tipologia delle sostanze interferenti, che costituiscono differenze/variabili cruciali tra i metodi di prova (Tabella 1).

Tabella 1. Differenze tra i test in sospensione e i test carrier.
Table 1. Differences between suspension tests and test carriers.

	UNI EN 14675:2015 TEST IN SOSPENSIONE (Fase 2/Step 1)	ASTM E1053-20 TEST CARRIER (VETRO)
VOLUME DEL VIRUS	1000 µL	200 µL
VOLUME DEL DISINFETTANTE	8000 µL	2000 µL
RATIO	1:8	1:10
SOSTENZE INTERFERENTI	1% BSA + 1% YE O SOLO 0.3% BSA	NON RICHiesto
TEMPO DI CONTATTO E TEMPERATURA	30 min ± 10 s + 10 °C ± 1 °C	INDICAZIONI DEL PRODUTTORE + 20–25 °C
ACQUA	400 ppm	400 ppm
RIDUZIONE DEL TITOLO VIRALE	4 log ₁₀	4 log ₁₀

RISULTATI

Dagli studi disponibili in letteratura in merito a prodotti e principi attivi testati contro la PSA, si evince che sono stati applicati: test in sospensione, secondo la UNI EN 14675:2015 o metodi leggermente modificati e test di carrier secondo la ASTM 1053:2020 con alcune modifiche (Figura 2). Il maggior numero di studi è stato eseguito con il metodo in sospensione e un numero minoritario con il metodo carrier, che maggiormente si avvicina a simulare le reali condizioni di campo.

I prodotti e principi attivi testati contro la PSA possono essere raggruppati in otto categorie: acidi, alcali, aldeidi, cloro e composti del cloro, composti dello iodio, agenti ossidanti, composti fenolici e composti dell'ammonio quaternario (QAC). Inoltre, recentemente, diversi estratti vegetali sono stati testati contro la PSA. Un elenco dei prodotti e principi chimici testati contro la PSA, secondo gli studi disponibili in letteratura, è riportato in Tabella 2. I dati disponibili riguardanti l'efficacia dei composti chimici contro la PSA indicano che tutti i gruppi di sostanze chimiche testate sono efficaci contro il virus, differendo per la modalità di azione e l'applicabilità su diversi materiali (Tabella 2). E' da sottolineare che la Tabella 2 elenca i composti e prodotti chimici testati contro la PSA ma che non necessariamente sono stati autorizzati come virucidi per il settore veterinario. Dal punto di vista applicativo è richiesto l'utilizzo di biocidi registrati e che siano virucidi. La lista di principi attivi registrati e autorizzati come virucidi per il settore veterinario ai sensi del nuovo regolamento n.528/2012 è disponibile sul sito web dell'ECHA (<https://echa.europa.eu/it/home>). Tale lista al momento non include i prodotti che sono ancora commercializzati come PMC sul territorio nazionale e che per norma transitoria entro il 2024 devono essere autorizzati come biocidi ai sensi del regolamento n.528/2012.

Tabella 2. Elenco dei principi e composti testati e attivi contro la PSA con le indicazioni dei parametri a cui l'efficacia è stata osservata.

Table 2. List of principles and compounds tested and active against PSA with indications of the parameters at which the efficacy was observed.

GRUPPO CHIMICO/ PRINCIPIO ATTIVO	CONCENTRAZIONE DI UTILIZZO	TEMPO DI CONTATTO (min)	TEMPERATURA (°C)	GENOTIPO	CONDIZIONI	METODO UTILIZZATO	BIBLIOGRAFIA	UTILIZZO SUGGERITO
ALCALI								
IDROSSIDO DI SODIO	1%	5	4	VIII	Liquame suino	sospensione	(25)	Non efficace a TA. Non usare in presenza di alluminio e leghe derivate
	2 e 3%	30	10	I	BSA; BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(26)	
IDROSSIDO DI CALCIO	1%	5	4	VIII	Liquame suino	sospensione	(25)	Utilizzare per pareti e pavimenti
ACIDI								
ACIDO ACETICO	1%	10	22	I	Acciaio e plastica	ASTM E1053 modificata	(24)	
	2%	30	10	I	BSA; BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(26)	
ACIDO CITRICO	2%	30	22	I	Legno di betulla	ASTM E1053 modificata	(27)	Abiti e decontaminazione personale
COMPOSTI DEL CLORO								
SODIO IPOCLORITO	500ppm	10	22	I	Acciaio e plastica	ASTM E1053 modificata	(24)	Efficace nella maggior parte delle applicazioni, in presenza di materiale organico l'efficacia diminuisce. Meno stabile in condizioni climatiche calde e di sole al di sopra dei +15°C. Tossico per occhi e pelle
	2000ppm	30	22	I	Legno di betulla	ASTM E1053 modificata	(27)	
	6%	30	TA	I		sospensione	(28)	
	1%	30	10	I	BSA; BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(26)	

GRUPPO CHIMICO/ PRINCIPIO ATTIVO	CONCENTRAZIONE DI UTILIZZO	TEMPO DI CONTATTO (min)	TEMPERATURA (°C)	GENOTIPO	CONDIZIONI	METODO UTILIZZATO	BIBLIOGRAFIA	UTILIZZO SUGGERITO
ACQUA ELETTROLIZZATA ACIDA	80ppm	30	4	I	5% FBS	sospensione	(29)	
AGENTI OSSIDANTI								
ACQUA OZONIZZATA (O3)	20mg/L	10	20-25	II	Acciaio, plastica e calccestruzzo	sospensione	(30)	
IDROGENO DI POTASSIO	600ppm	10	TA	I		ASTM E1053 modificata	Krug 2018 (31)	Strumentazione di laboratorio.
	1/200	30	20	II		sospensione	(32)	Leggermente corrosivo per i metalli
	1/200	30	4 e 20	II		sospensione	(32)	
	1%	30	10	I	BSA, BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(26)	
	2 e 5%	5, 10	20-25	I	BSA+YE+BM	OECD 2013	(33)	
PEROSSIDO DI IDROGENO VAPORIZZATO	30%	30	30-40	I	5% FBS	Vaporizzazione	(34)	Strumentazione di laboratorio
PEROSSIDI DI IDROGENO (H2O2)	102,6mM (35% soluzione madre)	10	48	I	Plasma	sospensione	(35)	Strumentazione di laboratorio. Risciacquare dopo l'uso
ALDEIDI								
GLUTARALDEIDE	0.1%	30	10	I	BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(36)	Evitare il contatto con occhi e pelle
	1%	30	10	I	BSA	UNI EN 14675:2015	(26)	
COMPOSTI FENOLICI								
FENOLO	1%	30	10	I	BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(26)	Efficace in presenza di materiale organico, risciacquare dopo l'uso

GRUPPO CHIMICO/ PRINCIPIO ATTIVO	CONCENTRAZIONE DI UTILIZZO	TEMPO DI CONTATTO (min)	TEMPERATURA (°C)	GENOTIPO	CONDIZIONI	METODO UTILIZZATO	BIBLIOGRAFIA	UTILIZZO SUGGERITO
o-FENIL-FENOLO	0.5%	60	TA	I		in vivo test	(37)	
SALI QUATERNARI DI AMMONIO								
BENZALCONIO CLORURO	1%	30	10	I	BSA	UNI EN 14675:2015	(26)	
AMMONIO QUATERNARIO	1/200	1	4	II		sospensione	(32)	Per uso personale, non usare con acqua dura
CLORURO DI DIDECILDIMETILAMMONIO	10%	30	TA	I		sospensione	(38)	
AMMONIO QUATERNARIO	800ppm	10	TA	I	Acciaio, plastica e calcestruzzo	ASTM E 1053 modificata	(31)	
COMPOSTI DELLO IODIO								
POVIDONE-IODINE (5% CONTENUTO DI IODIO)	5%	1.5	TA	II		Spray	(39)	
POTASSIO TETRAGLICINA TRIIODURO		30	TA	I		sospensione	(38)	
ESTRAITTI DI PIANTE								
MENTA	30%	30	10	I	BSA; BSA+YE	UNI EN 14675:2015	(40)	
TA: temperatura ambiente BSA: albumina sierica bovina YE: estratto di lievito FBS: siero fetale bovino BM: mucina bovina								

I composti del cloro e gli agenti ossidanti, raccomandati dal manuale WOAHA sulla PSA (41) sono i composti maggiormente testati. Entrambi i gruppi di sostanze chimiche dipendono fortemente dall'assenza di materiale organico per essere altamente efficaci. Pertanto, quando questi composti sono selezionati per un uso in campo, è necessaria un'accurata pulizia preliminare. Sono stati condotti esigui studi su aldeidi, composti fenolici e composti di iodio. In particolare, i composti fenolici sembrano essere efficaci in presenza di materiale organico e sono a basso costo (42), mentre non sono disponibili dati sull'attività virucida degli alcoli contro la PSA. Sulla base dei dati disponibili, l'ipoclorito di sodio ha un'ottima efficacia contro la PSA che diminuisce in presenza di materiale organico. L'ipoclorito di sodio può essere irritante e corrosivo, limitandone l'applicazione in diversi contesti. Gli agenti ossidanti sono composti potenti. Tuttavia, durante le procedure di decontaminazione, presentano corrosività per diversi metalli e questo dovrebbe essere preso in considerazione quando si pianifica la decontaminazione degli allevamenti. La glutaraldeide è ampiamente utilizzata nel settore veterinario, ma può essere irritante per cute e occhi. Sono disponibili pochi studi sulla sua efficacia contro la PSA e ulteriori indagini in diversi contesti sperimentali potrebbero chiarirne l'efficacia e l'uso durante focolai di PSA. I composti fenolici possono avere una buona gamma di applicazioni. Sembrano essere efficaci contro la PSA e rimangono efficaci anche in presenza di materiale organico. Per quanto riguarda la decontaminazione degli indumenti, in base ai dati disponibili in letteratura, possono essere utilizzati acidi e QAC in quanto sicuri ed efficaci contro la PSA.

DISCUSSIONE

La biosicurezza è definita in diversi modi da organismi internazionali come il WOAHA (41) e FAO (43) e presenta una definizione precisa secondo l'Animal Health Law (44). Tutte le definizioni disponibili descrivono la biosicurezza come un insieme di misure, procedure e atteggiamenti che hanno l'obiettivo comune di ridurre il rischio di introduzione e diffusione di una malattia. Una valutazione dei fattori di rischio per l'introduzione e la diffusione secondaria della PSA è quindi imprescindibile per individuare efficaci misure di biosicurezza che si basino su contenimento, pulizia e disinfezione. La decontaminazione diventa quindi una delle principali procedure di mitigazione necessarie, da attuare e pianificare correttamente. La decontaminazione è un processo complesso che dipende principalmente dalla disponibilità di informazioni di riferimento sulla resistenza fisica e chimica del virus e, in secondo luogo, dalle caratteristiche del locale/ambiente da decontaminare, dalle condizioni climatiche al momento della decontaminazione, dal costo della stessa, dalla disponibilità di adeguate quantità di prodotti efficaci e sicuri per l'ambiente e il personale. In questa prospettiva, la standardizzazione del processo di decontaminazione rappresenta un processo impegnativo.

Il presente lavoro riassume i dati attualmente disponibili sull'efficacia di composti chimici e disinfettanti contro la PSA, evidenziando alcuni aspetti che meritano attenzione per studi futuri. La maggior parte degli studi disponibili ha adottato standard e linee guida internazionali al fine di valutare l'attività virucida delle sostanze oggetto di studio [15,18,22,45-50], rendendo i dati confrontabili e riproducibili. E' da notare che la maggior parte degli studi disponibili sull'efficacia virucida dei prodotti contro la PSA ha adottato il metodo della sospensione secondo la UNI EN 14675:2015. Questo metodo è ben lungi dal riprodurre una condizione di campo in cui il virus non è in sospensione ma, piuttosto, associato a fluidi corporei, tessuti ed escrezioni e superfici. Infatti, secondo la norma UNI EN 14675:2015, la presenza del materiale organico è approssimata dall'uso di BSA e YE come sostanze interferenti che possono diminuire l'attività disinfettante. Al contrario,

gli standard basati sul metodo di test carrier imitano meglio una condizione sul campo, poiché il protocollo prevede di testare l'efficacia di prodotti chimici su superfici (carrier). Per quanto riguarda i dati disponibili sull'attività virucida dei composti chimici contro la PSA che adottano i metodi di test carrier su superfici non porose (ad esempio, ASTM 1053:20), sono disponibili solo quattro studi (27,33). In particolare, è disponibile un solo lavoro sulle superfici porose, a sostegno della necessità di aumentare il numero di studi su diversi tipi di superfici (33). Questi studi hanno testato tre tipi di superfici: plastica, acciaio e cemento, messe a contatto con sostanze chimiche appartenenti a composti di cloro, agenti ossidanti, QAC e acidi, suggerendo che potrebbero essere condotti ulteriori studi testando composti aggiuntivi e differenti tipologie di materiale (24,27,33).

Per quanto riguarda la varietà di ceppi di PSA utilizzati per testare l'attività virucida dei composti chimici, è emerso che questi sono limitati all'uso di virus appartenenti al genotipo I e in particolare adattati in laboratorio, come i ceppi BA71V e Lisbon 60. Pochi studi hanno utilizzato ceppi di campo (19,27,47-51) appartenenti al genotipo I e II e solo uno studio ha utilizzato un ceppo di PSA appartenente al genotipo VIII (25). Ciò evidenzia che non sono attualmente disponibili studi sull'efficacia virucida di composti chimici contro virus della PSA appartenenti al genotipo II circolanti in Europa.

La scarsità di dati sull'efficacia virucida di disinfettanti contro ceppi di campo di PSA potrebbe derivare dalla difficoltà a coltivare il virus su colture cellulari in laboratorio. Il virus della PSA è infatti coltivabile su linee cellulari primarie ovvero macrofagi di suino ottenuti a partire da sangue in toto raccolto da animali vivi. Questa procedura è laboriosa e non consente di ottenere elevati titoli virali necessari per poter dimostrare l'avvenuto abbattimento del titolo virale di 4 logaritmi, come richiesto dagli standard internazionali di riferimento. Questo rappresenta uno dei principali limiti tecnici nell'applicazione degli standard internazionali disponibili per testare l'attività virucida di sostanze chimiche contro la PSA.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro evidenzia che esistono ancora lacune nelle conoscenze sull'efficacia dei composti chimici contro la PSA. Sono necessari ulteriori studi per convalidare i dati sull'efficacia dei composti chimici testati in diverse condizioni sperimentali. Le metodologie finora applicate per studiare l'attività virucida delle sostanze chimiche sono limitate a protocolli di laboratorio che non riflettono adeguatamente la situazione sul campo. Dovrebbero essere sviluppati protocolli di laboratorio aggiuntivi, con l'obiettivo di simulare la varietà degli scenari epidemiologici in cui la PSA può essere identificata.

La PSA è un virus complesso che causa una malattia complessa, in grado di infettare sia la popolazione domestica che quella selvatica. Tale complessità si riflette nella gestione della malattia, con approcci diversi in base al contesto e anche nella fase di decontaminazione che, pertanto, può essere pianificata e sviluppata in modi diversi a seconda dello scenario di campo. Ciò implica che potrebbero essere necessari protocolli e procedure di decontaminazione ad hoc. La disponibilità di dati sull'attività virucida delle sostanze chimiche e il loro uso contro la PSA pertanto diventa cruciale e studi in tale settore dovrebbero essere incoraggiati.

A ciò si affianca la necessità di disporre di un elenco aggiornato e di facile consultazione dei principi attivi autorizzati come virucidi sul territorio nazionale per il settore veterinario permettendo la selezione e l'utilizzo di prodotti efficaci e sicuri per l'ambiente e per il personale, ricordando che gli stessi sono autorizzati in base a standard che prevedono l'uso del *Bovine enterovirus 1*.

BIBLIOGRAFIA

1. Dixon, L.K.; Abrams, C.C.; Bowick, G.; Goatley, L.C.; Kay-Jackson, P.C.; Chapman, D.; Liverani, E.; Nix, R.; Silk, R.; Zhang, F. African Swine Fever Virus Proteins Involved in Evading Host Defence Systems. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004, *100*, 117–134. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2004.04.002>.
2. Alonso, C.; Borca, M.; Dixon, L.; Revilla, Y.; Rodriguez, F.; Escribano, J.M. ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. *J. Gen. Virol.* 2018, *99*, 613–614. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001049>.
3. Andrés, G.; García-Escudero, R.; Simón-Mateo, C.; Viñuela, E. African Swine Fever Virus Is Enveloped by a Two-Membraned Collapsed Cisterna Derived from the Endoplasmic Reticulum. *J. Virol.* 1998, *72*, 8988–9001. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.8988-9001.1998>.
4. Breese, S.S.; Stone, S.S.; Deboer, C.J.; Hess, W.R. Electron Microscopy of the Interaction of African Swine Fever Virus with Ferritin-Conjugated Antibody. *Virology* 1967, *31*, 508–513. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(67\)90232-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90232-2).
5. Carrascosa, J.L.; Carazo, J.M.; Carrascosa, A.L.; García, N.; Santisteban, A.; Viñuela, E. General Morphology and Capsid Fine Structure of African Swine Fever Virus Particles. *Virology* 1984, *132*, 160–172. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90100-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90100-4).
6. Qu, H.; Ge, S.; Zhang, Y.; Wu, X.; Wang, Z. A Systematic Review of Genotypes and Serogroups of African Swine Fever Virus. *Virus Genes* 2022, *58*, 77–87. <https://doi.org/10.1007/S11262-021-01879-0>.
7. Bastos, A.D.S.; Penrith, M.L.; Crucièrè, C.; Edrich, J.L.; Hutchings, G.; Roger, F.; Couacy-Hymann, E.; Thomson, G.R. Genotyping Field Strains of African Swine Fever Virus by Partial P72 Gene Characterisation. *Arch. Virol.* 2003, *148*, 693–706. <https://doi.org/10.1007/S00705-002-0946-8>.
8. Lubisi, B.A.; Bastos, A.D.S.; Dwarka, R.M.; Vosloo, W. Molecular Epidemiology of African Swine Fever in East Africa. *Arch. Virol.* 2005, *150*, 2439–2452. <https://doi.org/10.1007/S00705-005-0602-1>.
9. Boshoff, C.I.; Bastos, A.D.S.; Gerber, L.J.; Vosloo, W. Genetic Characterisation of African Swine Fever Viruses from Outbreaks in Southern Africa (1973–1999). *Vet. Microbiol.* 2007, *121*, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.11.007>.
10. Achenbach, J.E.; Gallardo, C.; Nieto-Peigrín, E.; Rivera-Arroyo, B.; Degefa-Negi, T.; Arias, M.; Jenberie, S.; Mulisa, D.D.; Gizaw, D.; Gelaye, E.; et al. Identification of a New Genotype of African Swine Fever Virus in Domestic Pigs from Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017, *64*, 1393–1404. <https://doi.org/10.1111/TBED.12511>.
11. Quembo, C.J.; Jori, F.; Vosloo, W.; Heath, L. Genetic Characterization of African Swine Fever Virus Isolates from Soft Ticks at the Wildlife/Domestic Interface in Mozambique and Identification of a Novel Genotype. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018, *65*, 420–431. <https://doi.org/10.1111/TBED.12700>.
12. Chenais, E.; Depner, K.; Guberti, V.; Dietze, K.; Viltrop, A.; Ståhl, K. Epidemiological Considerations on African Swine Fever in Europe 2014–2018. *Porc. Health Manag.* 2019, *5*, 6. <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0109-2>.
13. Cwynar, P.; Stojkov, J.; Wlazlak, K. African Swine Fever Status in Europe. *Viruses* 2019, *11*, 310. <https://doi.org/10.3390/v11040310>.
14. Dixon, L.K.; Sun, H.; Roberts, H. African Swine Fever. *Antiviral Res.* 2019, *165*, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.018>.
15. Blome, S.; Franzke, K.; Beer, M. African Swine Fever—A Review of Current Knowledge. *Virus Res.* 2020, *287*, 198099. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198099>.
16. Iscaro C, Dondo A, Ruocco L, Masoero L, Giammarioli M, Zoppi S, Guberti V, Feliziani

- F. January 2022: Index case of new African Swine Fever incursion in mainland Italy. *Transbound Emerg Dis.* 2022 Jul;69(4):1707-1711. doi: 10.1111/tbed.14584. Epub 2022 May 31. PMID: 35511712; PMCID: PMC9540274
17. Iscaro, C., Dondo, A., Ruocco, L., Masoero, L., Giammarioli, M., Zoppi, S., Guberti, V., & Feliziani, F. January 2022: Index case of new African Swine Fever incursion in mainland Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69, 1707– 1711. <https://doi.org/10.1111/tbed.14584>
 18. Holl, H.; Youngner, J.S. Virus-Lipid Interactions. II. The Mechanism of Adsorption of Lipophilic Viruses to Water-Insoluble Polar Lipids. *Virology* 1959, 8, 319–343. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(59\)90033-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(59)90033-9).
 19. Gebel, J.; Exner, M.; French, G.; Chartier, Y.; Christiansen, B.; Gemein, S.; Goroncy-Bermes, P.; Hartemann, P.; Heudorf, U.; Kramer, A.; et al. The Role of Surface Disinfection in Infection Prevention. *GMS Hyg. Infect. Control* 2013, 8, Doc10. <https://doi.org/10.3205/DGKH000210>.
 20. EN 14885:2018; Chemical disinfectants and antiseptics - Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics. CEN/TC 216 - Chemical disinfectants and antiseptics. Available online: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/25a6be49-689b-4ac0-b0fc-0f06f0dadf60/en-14885-2018> (accessed on 20 June 2022).
 21. Tarka, P.; Nitsch-Osuch, A. Evaluating the Virucidal Activity of Disinfectants According to European Union Standards. *Viruses* 2021, 13, 534. <https://doi.org/10.3390/V13040534>.
 22. EN 14675:2015; Chemical Disinfectants and Antiseptics—Quantitative Suspension Test for the veterinary area. CEN/TC 216 - Chemical disinfectants and antiseptics. Available online: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/a4bf27b1-bb63-4574-9c27-89b4fa6eb4f9/en-14675-2015> (accessed on 16 March 2022).
 23. UNI EN 17122:2020; Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative non-porous surface test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area. CEN/TC 216 - Chemical disinfectants and antiseptics. Available online: https://store.uni.com/p/UNI1607369/uni-en-171222020-294125/UNI1607369_EEN (accessed on 20 June 2022).
 24. Krug, P.W.; Lee, L.J.; Eslami, A.C.; Larson, C.R.; Rodriguez, L. Chemical Disinfection of High-Consequence Transboundary Animal Disease Viruses on Nonporous Surfaces. *Biologicals* 2011, 39, 231–235. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.06.016>.
 25. Turner, C.; Williams, S.M. Laboratory-Scale Inactivation of African Swine Fever Virus and Swine Vesicular Disease Virus in Pig Slurry. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 87, 148–157. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00802.x>.
 26. Juskiewicz, M.; Walczak, M.; Mazur-Panasiuk, N.; Woźniakowski, G. Effectiveness of Chemical Compounds Used against African Swine Fever Virus in Commercial Available Disinfectants. *Pathogens* 2020, 9, 878. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110878>.
 27. Krug, P.W.; Larson, C.R.; Eslami, A.C.; Rodriguez, L.L. Disinfection of Foot-and-Mouth Disease and African Swine Fever Viruses with Citric Acid and Sodium Hypochlorite on Birch Wood Carriers. *Vet. Microbiol.* 2012, 156, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.032>.
 28. Shirai, J.; Kanno, T.; Tsuchiya, Y.; Mitsubayashi, S.; Seki, R. Effects of Chlorine, Iodine, and Quaternary Ammonium Compound Disinfectants on Several Exotic Disease Viruses. *J. Vet. Med. Sci.* 1999, 62, 85–92. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.85>.
 29. Rhee, C.H.; Kim, S.; Kang, Y.E.; Han, B.; Seo, S.J.; Kim, Y.W.; Her, M.; Jeong, W. Virucidal Efficacy of Acidic Electrolyzed Water (Aew) against African Swine Fever Virus and Avian Influenza Virus. *J. Vet. Med. Sci.* 2021, 83, 201–207. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0534>.

30. Zhang, L.; Luo, Y.; Wang, W.; Sun, Y.; Zhang, J.; Fatima, M.; Jia, X.; Qiu, H.J. Efficient Inactivation of African Swine Fever Virus by Ozonized Water. *Vet. Microbiol.* 2020, *247*, 108796. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108796>.
31. Krug, P.W.; Davis, T.; O'Brien, C.; LaRocco, M.; Rodriguez, L.L. Disinfection of Transboundary Animal Disease Viruses on Surfaces Used in Pork Packing Plants. *Vet. Microbiol.* 2018, *219*, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.029>.
32. Sovijit, W.; Taesuji, M.; Rattanamas, K.; Punyadarsaniya, D.; Mamom, T.; Nguyen, H.T.; Ruenphet, S. In Vitro Cytotoxicity and Virucidal Efficacy of Potassium Hydrogen Peroxymonosulfate Compared to Quaternary Ammonium Compound under Various Concentrations, Exposure Times and Temperatures against African Swine Fever Virus. *Vet. World* 2021, *14*, 2936–2940. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2936-2940>.
33. Gabbert, L.R.; Neilan, J.G.; Rasmussen, M. Recovery and Chemical Disinfection of Foot-and-Mouth Disease and African Swine Fever Viruses from Porous Concrete Surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 2020, *129*, 1092–1101. <https://doi.org/10.1111/jam.14694>.
34. Heckert, R.A.; Best, M.; Jordan, L.T.; Dulac, G.C.; Eddington, D.L.; Sterritt, W.G. Efficacy of Vaporized Hydrogen Peroxide against Exotic Animal Viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, *63*, 3916–3918. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3916-3918.1997>.
35. Kalmar, I.D.; Cay, A.B.; Tignon, M. Sensitivity of African Swine Fever Virus (ASFV) to Heat, Alkalinity and Peroxide Treatment in Presence or Absence of Porcine Plasma. *Vet. Microbiol.* 2018, *219*, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.025>.
36. Juszkiewicz, M.; Walczak, M.; Mazur-Panasiuk, N.; Woźniakowski, G. Virucidal Effect of Chosen Disinfectants against African Swine Fever Virus (ASFV) – Preliminary Studies. *Pol. J. Vet. Sci.* 2019, *22*, 777–780. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2019.131407>.
37. Stone, S.S.; Hess, W.R. Effects of Some Disinfectants on African Swine Fever Virus. *Appl. Microbiol.* 1973, *25*, 115–122. <https://doi.org/10.1128/aem.25.1.115-122.1973>.
38. Shirai, J.; Kanno, T.; Tsuchiya, Y.; Mitsubayashi, S.; Seki, R. Effects of Chlorine, Iodine, and Quaternary Ammonium Compound Disinfectants on Several Exotic Disease Viruses. *J. Vet. Med. Sci.* 2000, *62*, 85–92. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.85>.
39. Pan, L.; Luo, R.; Wang, T.; Qi, M.; Wang, B.; Sun, M.; Luo, Y.; Ji, C.; Sun, Y.; Qiu, H.J. Efficient Inactivation of African Swine Fever Virus by a Highly Complexed Iodine. *Vet. Microbiol.* 2021, *263*, 109245. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109245>.
40. Juszkiewicz, M.; Walczak, M.; Woźniakowski, G.; Szczotka-Bochniarz, A. Virucidal Activity of Plant Extracts against African Swine Fever Virus. *Pathogens* 2021, *10*, 1357. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111357>.
41. OIE. *Terrestrial Animal Health Code: General Provisions*; OIE: Paris, France, 2019; Volume 1, ISBN 9789295108851.
42. De Benedictis, P.; Beato, M.S.; Capua, I. Inactivation of Avian Influenza Viruses by Chemical Agents and Physical Conditions: A Review. *Zoonoses Public Health* 2007, *54*, 51–68. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01029>.
43. FAO. FAO Biosecurity Toolkit. In *Portal*; FAO: Roma, Italy, 2007; 128p.
44. Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council of 9 March 2016 on transmissible animal diseases and amending and repealing certain acts in the area of animal health ('Animal Health Law') Official Journal of the European Union.
45. Chenais, E.; Depner, K.; Guberti, V.; Dietze, K.; Viltrop, A.; Ståhl, K. Epidemiological Considerations on African Swine Fever in Europe 2014–2018. *Porc. Health Manag.* 2019, *5*, 6.
46. Animal Disease Information System (ADIS) https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/animal-disease-information-system-adis_en. (accessed on 16 March 2022).
47. Pereira De Oliveira, R.; Hutet, E.; Lancelot, R.; Paboeuf, F.; Duhayon, M.; Boinas, F.; Pérez de León, A.A.; Filatov, S.; Le Potier, M.F.; Vial, L. Differential Vector Competence

- of *Ornithodoros* Soft Ticks for African Swine Fever Virus: What If It Involves More than Just Crossing Organic Barriers in Ticks? *Parasites Vectors* 2020, 13, 618. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04497-1>.
48. Jori, F.; Bastos, A.D.S. Role of Wild Suids in the Epidemiology of African Swine Fever. *Ecohealth* 2009, 6, 296–310. <https://doi.org/10.1007/s10393-009-0248-7>.
49. Jori, F.; Vial, L.; Penrith, M.L.; Pérez-Sánchez, R.; Etter, E.; Albina, E.; Michaud, V.; Roger, F. Review of the Sylvatic Cycle of African Swine Fever in Sub-Saharan Africa and the Indian Ocean. *Virus Res.* 2013, 173, 212–227. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.005>.
50. De Lorenzi, G.; Borella, L.; Alborali, G.L.; Prodanov-Radulović, J.; Štukelj, M.; Bellini, S. African Swine Fever: A Review of Cleaning and Disinfection Procedures in Commercial Pig Holdings. *Res. Vet. Sci.* 2020, 132, 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.06.009>.
51. *ASTM E1053-20*; Standard Practice to Assess Virucidal Activity of Chemicals Intended for Disinfection of Inanimate, Nonporous Environmental Surfaces. Book of Standards, (2020), 11.08, 7 Developed by Subcommittee: E35.15, DOI: 10.1520/E1053-20.