

DENTAL CADMOS

E S T R A T T O

Dental Cadmos 2004; vol 72, 8: 85-89

Formulazione disinfettante per dispositivi medici

CARATTERISTICHE DELL'ATTIVITÀ VIRUCIDA

M.Andreasi Bassi, L. Monti, M. Clementi

La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni. La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni. La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni.

La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni. La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni. La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni.

La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni. La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni. La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni.

La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni. La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni. La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni.

La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni. La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni. La disinfezione dei dispositivi medici è un processo che deve essere eseguito in modo corretto e sicuro, per evitare la trasmissione delle infezioni.

M MASSON

Formulazione disinfettante per dispositivi medici

CARATTERISTICHE DELL'ATTIVITÀ VIRUCIDA

1. Introduzione

La corretta disinfezione degli ambienti di lavoro odontoiatrici e dei dispositivi medici non invasivi rappresenta un presidio importante per la prevenzione della trasmissione di alcune infezioni virali, in particolare di quelle a trasmissione per via respiratoria ed ematica. È tuttavia necessario che siano valutate con attenzione sia le caratteristiche e la dinamica delle formulazioni utilizzate, sia l'influenza sull'efficacia della disinfezione della presenza di un carico elevato di sostanza organica, sia, infine, la compatibilità dei disinfettanti utilizzati con i materiali con cui vengono a contatto.

Tra la seconda metà del 2002 e il 2003, un'epidemia di polmonite con caratteristiche cliniche di notevole severità (SARS; *severe acute respiratory syndrome*), si è diffusa dalla provincia del Guandong (Repubblica Popolare Cinese) a diverse aree dell'Asia e del Canada (1). Casi sporadici, anche di origine ospedaliera e laboratoristica, sono stati segnalati anche nella seconda metà del

2003 e nel 2004 (2). L'epidemia si è caratterizzata per un numero elevato di casi gravi e alta mortalità. Da casi di SARS è stato isolato un nuovo coronavirus (denominato SARS-coronavirus; SARS-CoV) (3); l'infezione sperimentale del macaco ha confermato che questo nuovo patogeno dell'uomo è l'agente eziologico della sindrome clinica (4). I coronavirus sono virus a RNA a polarità positiva, provvisti di involucro pericapsidico, associati a malattie respiratorie ed enteriche degli animali e dell'uomo. Fino a oggi i coronavirus sono stati classificati in tre gruppi antigenici: i gruppi 1 e 2 includono i coronavirus di mammiferi, il gruppo 3 i coronavirus aviari. I coronavirus umani CoV-229E e CoV-OC43, agenti eziologici di riniti acute, sono classificati nel gruppo 1 e 2, rispettivamente (5); più recentemente è stato isolato un nuovo coronavirus umano (denominato NL-63) isolato da infezioni respiratorie pediatriche. È altresì noto che modeste variazioni del genoma dei coronavirus possono portare a importanti modificazioni del tropismo e an-

Abstract *Disinfectant formulation specifically planned for medical devices.*

Characteristics of the virucidal activity

The accurate disinfection of medical environments and no invasive medical devices represents a major measure for preventing medically important viral infections. In the present report, the virucidal activity of a hydro-alcoholic disinfectant formulation (Sactimed Spray N) including chlorhexidine digluconate and benzalconium chlorine is assayed against a recently discovered viral pathogen of humans, the causative agent of the severe acute respiratory syndrome (SARS). The formulation is able to reduce rapidly the virus infectivity either in the presence, or in the absence of high concentrations of organic materials.

Key words

*Disinfectant formulation
Virucidal activity
Medical devices
Medical environments*

che dello spettro d'ospite (6). L'analisi del genoma di SARS-CoV ha mostrato che esso è costituito da circa 29.750 basi e che mostra un'organizzazione simile a quella di altri coronavirus (7). Tuttavia SARS-CoV presenta una serie di caratteristiche peculiari (8). Ciò rende molto probabile, in linea teorica, che questo virus possa essere passato alla specie umana da una specie animale che rappresenta l'ospite naturale a seguito di una mutazione genetica; a tal riguardo, sono state evidenziate forti omologie con il genoma di virus recentemente isolati in alcune specie di animali selvatici cinesi (9).

Nel presente studio abbiamo valutato l'attività di una formulazione disinfettante sull'infettività di SARS-CoV. L'attività germicida e virucida della formulazione in esame è già nota nelle sue linee generali ed è nota sia la sua rapidità d'azione sia quella di mantenere un buon effetto residuo. Per quanto riguarda l'infezione da SARS-CoV, uno degli aspetti di maggior interesse è quello della valutazione delle caratteristiche di sopravvivenza del virus nell'ambiente (10); questo aspetto ha delle ovvie implicazioni, infatti, sulle possibilità di controllo della diffusione epidemica del virus e sulla programmazione di strategie atte a prevenire i casi d'infezione in ambiente sanitario. Gli studi pongono l'accento su una possibile conservazione dell'infettività di SARS-CoV per tempi non brevissimi, se riferiti ad altri virus provvisti d'involucro pericapsidico, specie in presenza di elevate concentrazioni di materiale organico. Ciò rende importante l'analisi di tutti gli aspetti relativi alla protezione del personale attraverso: dispositivi fisici di protezione, disinfezione degli

ambienti e di diversi materiali con formulazioni efficaci nell'annullare rapidamente l'infettività del virus (11). Ciò sembra essere di specifico interesse in ambiente sanitario, giacché, successivamente alla conclusione della diffusione epidemica dell'infezione, si sono registrati principalmente casi a diffusione ospedaliera, laboratoristica o comunque avvenuta in ambiente medico.

2. Materiali e metodi

Formulazione disinfettante in esame

La formulazione in esame (Sactimed Spray N) sulla base di quanto dichiarato dal produttore, ha la seguente composizione in 100 g di prodotto: clorexidina digluconato 0,10 g, benzalconio cloruro 0,10 g, alcool etilico 18,7 g, eccipienti (antiossidanti, essenze aromatiche, coformulanti e acqua depurata qb a 100,0 g). La formulazione è pervenuta direttamente dal produttore (lotto N. 0040069) ed è stata conservata a temperatura ambiente e al buio. Si configura come una soluzione disinfettante idroalcolica che aggiunge all'alcool etilico altri due principi attivi: clorexidina digluconato e benzalconio cloruro. È pronta all'uso ed è stata valutata individuata nella presente analisi.

La clorexidina, antisettico di sintesi, è un composto formato da due anelli 4-fenolici e due gruppi biguanidici connessi a una catena centrale esametilenica; il composto è idrosolubile, basico e viene stabilizzato come sale digluconato (12). La clorexidina ha dimostrato un ampio spettro d'azione disinfettante; esplica la sua azione antisettica in due momenti, attraverso un'azione battericida immediata (denaturazione dei componenti citoplasmatici batterici) e attraverso un'azione protratta, di tipo bat-

teriostatico (attività residua).

Il benzalconio cloruro è un composto dell'ammonio quaternario, tensioattivo con buona azione disinfettante unita alle azioni detergente ed emulsionante.

Infine, l'alcool etilico potenzia l'azione della formulazione, specie nelle fasi precoci del processo di disinfezione.

Preparazione virale

Lo stipe virale SARS-CoV HSR1 è stato coltivato in cellule VERO (linea continua di derivazione epiteliale da rene di *african green monkey kidney*) in terreno MEM (*Minimum Essential Medium*) supplementato di 2% siero bovino fetale e penicillina-streptomicina in fiasche monouso (Falcon) da 25 cm². Per la preparazione dello stock virale, le cellule sono state incubate per 72 ore dopo l'infezione a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Successivamente le cellule infette sono state sottoposte a tre cicli di congelamento-scongelo. Lo stock virale è stato infine aliquotato e conservato a -80°C per la quantificazione e l'esecuzione degli esperimenti.

Metodologie utilizzate

Per la quantificazione del virus è stata utilizzata in questo studio una procedura di *real-time polymerase chain reaction* (RT-PCR) che, specificamente, consente la valutazione del numero di molecole di RNA genomico di SARS-CoV⁸ rilasciate nel soprannatante delle cellule infettate.

Citotossicità della formulazione in esame

È stato valutato se il prodotto in esame possedesse tossicità cellulare nelle condizioni speri-

mentali richieste. Per tale valutazione due parti di acqua bidistillata sono state mescolate a 8 parti della formulazione indiluita e sono state successivamente allestite diluizioni in ragione 10 in MEM (da 10^{-1} a 10^{-5}). Le diluizioni seriali sono state inoculate in pozzetti di cellule confluenti al 90%. Le colture cellulari sono state osservate giornalmente (analisi microscopica al microscopio rovesciato) per 4 giorni per osservare la eventuale comparsa di alterazioni strutturali cellulari. La più bassa diluizione di ciascuna formulazione, che non conferiva alterazioni citopatiche, è stata utilizzata nel test vero e proprio. Inoltre, per valutare se il trattamento con la più bassa diluizione della formulazione che non aveva mostrato effetto citotossico potesse alterare la sensibilità cellulare ai virus, i monostrati di cellule sono stati incubati per 30 minuti a 37°C con 0,1 ml di tale diluizione in terreno di coltura. Il terreno veniva quindi scartato, le cellule lavate gentilmente per tre volte e venivano aggiunte le diluizioni della sospensione virale. In queste condizioni è stata considerata accettabile una riduzione del titolo virale, rispetto al controllo, non superiore a $1 \log_{10}$.

Saggio per la valutazione dell'attività virucida su SARS-CoV

Lo studio descritto è stato realizzato sia in condizioni di pulito (incubazione virus-formulazione disinfettante in presenza di 0,3 g/l sieralbumina bovina) sia in condizioni di sporco (incubazione virus-formulazione disinfettante in presenza di 3,0 g/l sieralbumina bovina e 3,0 ml/l di eritrociti di pecora) a 20°C . I tempi di contatto scelti in entrambe le condizioni sono stati:

30 secondi, 1 minuto e 5 minuti. Per la valutazione dell'attività virucida, al termine del periodo di contatto, un'aliquota della miscela è stata prelevata e l'attività virucida residua immediatamente neutralizzata mediante diluizione (1:100; v/v) in MEM. Sono state quindi preparate diluizioni (da indiluito a 10^{-3}) e le stesse sono state trasferite in provette da utilizzare per l'infezione di cellule VERO (in duplicato in fiasche da 25 cm^2). Dopo l'adsorbimento per 60 minuti, il residuo è stato allontanato mediante tre successivi lavaggi con terreno fresco, le cellule infettate sono state incubate a 37°C e, a 72 ore, il supernatante è stato raccolto, centrifugato e utilizzato per la quantificazione virale come descritto sopra.

Il test era considerato valido nel dimostrare l'attività virucida se venivano positivamente corrisposti i seguenti criteri:

- 1) la sospensione virale possiede una concentrazione di virus sufficiente per poter determinare una riduzione $4 \log_{10}$ del titolo virale;
- 2) la riduzione rilevabile di titolo virale dopo trattamento è di almeno $4 \log_{10}$;
- 3) la citotossicità del prodotto non influenza la morfologia cellulare e la crescita nelle diluizioni necessarie per dimostrare una riduzione di $4 \log_{10}$ del virus infettante;
- 4) la titolazione virale comparativa su cellule pretrattate con il prodotto in esame o senza PBS (*Phosphate Buffer Solution*) mostra una differenza inferiore a $1 \log_{10}$ del virus infettante.

Calcolo dell'attività virucida

L'inattivazione virale indotta dall'attività virucida della formulazione in esame è stata calcolata per ciascun tempo di

esposizione come differenza tra i campioni trattati e non trattati. Successivamente la riduzione logaritmica è stata calcolata sottraendo il titolo logaritmico della preparazione trattata dal titolo logaritmico del controllo virale.

3. Risultati

Sospensione virale

Lo stock virale (sospensione virale test) è stato titolato con una tecnica molecolare (RT-PCR). Il titolo dello stock virale è risultato $9,21 \times 10^8$ molecole di RNA genomico di SARS-CoV per ml, corrispondente a circa $3,0 \times 10^6$ unità formanti placca (pfu) per ml⁸. Si è utilizzato pertanto uno stock virale dal titolo (rilevabile sia molecularmente, sia attraverso saggi d'infettività) sufficientemente elevato per garantire una corretta valutazione dell'efficacia virucida della formulazione disinfettante in esame e della sua dinamica. Lo stock virale è stato utilizzato alla diluizione 10^{-1} .

Citotossicità della formulazione in esame

È stata valutata la tossicità cellulare delle diluizioni della formulazione in esame seguendo la procedura già descritta, dopo incubazione in terreno di coltura MEM addizionato di FCS al 2% (*Fetal Serum Calf*). Alla valutazione microscopico-morfologica non è stata osservata alcuna modificazione della morfologia del monostrato cellulare a 4 giorni alla diluizione 10^{-2} . È stata successivamente valutata la resa virale in cellule pretrattate con identiche diluizioni della formulazione in esame. A 72 ore, dal soprannatante delle cellule preincubate con la diluizione 10^{-1} è stato rilevato un titolo virale di $4,2 \times 10^7$ molecole di RNA geno-

mico di SARS-CoV per ml, mentre il controllo parallelamente condotto ha fornito una resa di $8,9 \times 10^7$ per ml nelle stesse condizioni sperimentali. La differenza registrata è quindi inferiore a $1 \log_{10}$. Dal momento che la diluizione 10^{-2} della formulazione in esame è quella che viene normalmente raggiunta dopo incubazione e neutralizzazione mediante diluizione, si è proceduto alla valutazione dell'attività virucida utilizzando la formulazione in esame indiluita.

Test eseguito in condizioni di pulito e di sporco

Il test in condizioni di pulito (incubazione con la formulazione indiluita in presenza di 0,3 g/l sieralbumina bovina) è stato eseguito a 20°C ai seguenti tempi d'incubazione: 30 secondi, 1 minuto e 5 minuti. La valutazione ha fornito i risultati riportati nella tabella I. Analogamente il test eseguito in condizioni di sporco (incubazione in presenza di 3,0 g/l sieralbumina bovina e 3,0 ml/l di eritrociti di pecora) è stato eseguito a 20°C ai tempi d'incubazione di 30 secondi, 1 minuto e 5 minuti. La valutazione in queste condizioni sperimentali ha fornito i risultati riportati nella tabella II. Al tempo d'incubazione di 5 minuti, la formulazione in esame è stata in grado di abbattere l'infettività di SARS-CoV alle condizioni sperimentali utilizzate in questo studio, sia in condizioni di pulito sia in condizioni di sporco (elevato carico di materiale organico). Al tempo di 1 minuto, sia in condizioni di pulito che di sporco, l'infettività virale è stata ridotta a un livello superiore a 4 log rispetto al controllo. Al tempo di 30 secondi, la riduzione del titolo è risultata superiore al livello di 4 log in

condizioni di pulito, ma non in condizioni di sporco.

4. Discussione

Lo studio descritto è relativo alla valutazione dell'attività virucida della formulazione disinfettante Sactimed Spray N nei confronti di SARS-CoV. Sactimed Spray N è una formulazione disinfettante che, a una base idroalcolica, aggiunge altri due principi attivi: clorexidina digluconato e benzalconio cloruro. La formulazione è pronta all'uso ed è stata valutata indiluita nella presente analisi. I test di attività virucida possono essere condotti sia in condizioni di pulito sia in condizioni di sporco. Nel primo caso s'intendono condizioni sperimentali d'incubazione (sospensione virale/formulazione disinfettante) che prevedono livelli minimi di materiali organici e inorganici; nel secondo caso, condizioni che prevedono la presenza di elevate concentrazioni di materiali organici e inorganici. In particolare, in condizioni di pulito la valutazione del-

l'attività virucida è portata avanti in presenza di 0,3 g/l di sieralbumina bovina, mentre in condizioni di sporco la valutazione avviene in presenza di 3,0 g/l di sieralbumina bovina e di 3,0 ml di eritrociti di pecora. La valutazione è stata condotta incubando la miscela virus-formulazione disinfettante (formulazione indiluita) a 20°C, in condizioni di diversa concentrazione di materiale organico (condizioni di pulito e di sporco).

L'attività germicida della formulazione in esame è sostanzialmente nota; essa beneficia di un'attività rapida, sostanzialmente conferita dalla presenza di alcool e benzalconio cloruro, e di un'attività residua in cui ha un ruolo importante la clorexidina digluconato a elevata concentrazione. In questo studio si è inteso valutare la formulazione in esame nei confronti di un virus patogeno dell'uomo, a diffusione prevalente per via respiratoria, con ancora parzialmente indefiniti limiti di mantenimento dell'infettività nell'am-

Tabella I - Test in condizioni di pulito

Tempo d'incubazione	Titolo virale rilevato
30 secondi	$8,9 \times 10^2$ per ml
1 minuto	inf. a $2,0 \times 10^2$ per ml
5 minuti	inf. a $2,0 \times 10^2$ per ml
Controllo non trattato	$3,2 \times 10^7$ per ml

*Titolo virale: n. di molecole di genoma di SARS-CoV rilevate nel soprannatante cellulare raccolto direttamente a 72 ore dall'infezione senza sottoporre le cellule a congelamento/scongelamento.

Tabella II - Test in condizioni di sporco

Tempo d'incubazione	Titolo virale rilevato
30 secondi	$2,6 \times 10^4$ per ml
1 minuto	$2,4 \times 10^2$ per ml
5 minuti	inf. a $2,0 \times 10^2$ per ml
Controllo non trattato	$3,8 \times 10^7$ per ml

*Titolo virale: n. di molecole di genoma di SARS-CoV rilevate nel soprannatante cellulare raccolto direttamente a 72 ore dall'infezione senza sottoporre le cellule a congelamento/scongelamento.

biente. Si è soprattutto discusso in passato sul ruolo di una elevata concentrazione di materia organica nel preservare l'infettività del virus. Nelle condizioni sperimentali utilizzate Sactimed Spray N ha dimostrato di poter indurre una riduzione di almeno 4 log del titolo virale al tempo d'incubazione di 1 minuto, in condizioni di sporco, e in 30 secondi, in condizioni di pulito.

In conclusione, lo studio fornisce dati sulla dinamica e sul potenziale virucida di una formulazione disinfettante specificamente progettata per la disinfezione di dispositivi medici non invasivi e di ambienti sanitari, in particolare odontoiatrici. La formulazione ha dimostrato una efficacia virucida in tempi ridotti, sia in condizioni di pulito sia in condizioni di sporco.

Riassunto

La disinfezione accurata di ambienti e di dispositivi medici rappresenta una delle misure principali per prevenire infezioni dell'uomo clinicamente rilevanti. Nel presente studio, l'attività

virucida di una formulazione disinfettante (Sactimed Spray N), costituita da una soluzione idroalcolica di clorexidina e benzalconio cloruro, è stata valutata nei confronti di un patogeno umano recentemente emerso, l'agente eziologico della sindrome respiratoria acuta severa (SARS). La formulazione si è dimostrata capace di ridurre rapidamente l'infettività virale sia in presenza che in assenza di elevate concentrazioni di sostanza organica.

Parole chiave:

Formulazione disinfettante

Attività virucida

Dispositivi medici

Ambienti medici

Bibliografia

1. Donnelly CA, Ghani AC, Leung GM et al. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet* 2003; 361: 1761-6.
2. Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* 2003; 348: 1995-2005.
3. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS et al. A novel coronavirus associated with severe acute respira-

tory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1953.

4. Fouchier RA, Kuiken T, Schutten M et al. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 2003; 423: 240.
5. Siddell S. The coronaviridae. New York: Plenum Press, 1995.
6. Holmes KV. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *J Clin Invest* 2003; 111: 1605-9.
7. Ruan YJ, Wei CL, Ee AL et al. Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *Lancet* 2003; 361: 1779-85.
8. Vicenzi E, Canducci F, Pinna D et al. Coronaviridae and SARS-associated Coronavirus Strain HSR1. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 416-23.
9. Cyranoski D, Abbott A. Virus detectives seek source of SARS in China's wild animals. *Nature* 2003; 423: 67.
10. Editorial. News feature. *Nature*, 2003; 424: 121-6.
11. Interim recommendations for cleaning and disinfection of the SARS environment. (2003) CDC. <http://cdc.gov>.
12. Fardal O, Turnbull RS. Chlorhexidine in clinical practice *J Am Dent Ass* 1989; 112: 863-9.

Pervenuto in redazione nel mese di settembre 2004

Mirko Andreasi Bassi
Via L. Elio Seiano, 15
00174 Roma
Tel. 06 7480736 - Fax 06 45426826
e-mail: m.andreasi@tiscali.it

**SOLUZIONE
PRONTA
ALL'USO**

PROGRAMMA



IGIENE

Sacti-med SPRAY-N

DISINFETTANTE SPRAY

per la rapida disinfezione
dei dispositivi medici non invasivi
Inattiva i virus compresi HIV, HBV e HCV.

spruzzo preciso e omogeneo



Inattiva
il SARS-Coronavirus
(SARS-CoV)
in 30 secondi

Sactimed Spray N è una soluzione pronta all'uso per la disinfezione di tutti i dispositivi medici e delle superfici ad alto-medio rischio.

APPLICAZIONI

Sacti-med -S- SPRAY-N è indicato per la rapida disinfezione di manopole, ripiani portainstrumenti, lampade, poltrone, lavabi dei mani, lettini, attrezzature e dispositivi medici non invasivi.

CARATTERISTICHE TECNICHE EROGATORE

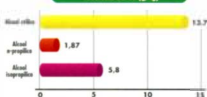
Erogazione per pompello 1,4 ml
Angolo di spruzzo da 0° a 60°
Pugnalabile da getto d'aria a nebulizzazione fine



È disponibile
dalla Istituto Obiettivo
per l'ottenimento
di garanzia sull'efficacia
del disinfezione nei confronti
della SARS-Coronavirus
(SARS-CoV)

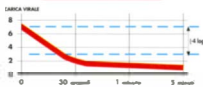
Grazie alla sinergia dei suoi principi attivi, Sactimed Spray N risulta essere efficace su SARS-Coronavirus come evidenziato da uno studio effettuato presso il laboratorio di microbiologia dell'Università Vita-San Raffaele di Milano che ne dichiara l'efficacia in 30 secondi.

Tossicità DL 50 (g/kg)



L'alcool etilico contenuto in Sactimed Spray N risulta essere il meno tossico fra gli alcool utilizzati nei prodotti spray per la disinfezione di dispositivi medici.

Efficacia di Sactimed Spray N nei confronti di SARS-CoV



Sactimed Spray N è efficace in 30 secondi nei confronti del virus SARS-CoV poiché la riduzione del titolo supera il valore di 4 log.