



Dott.ssa Barbara Azzimonti
Laboratorio di Microbiologia applicata
Centro per la ricerca traslazionale sulle malattie autoimmuni ed allergiche (CAAD)
Dipartimento di Scienze della Salute (DSS), Università del Piemonte orientale (UPO)
Corso Trieste 15A, 28100 Novara (NO)

Novara, 11 Maggio 2020

Report

“Valutazione dell’attività biocida del tessuto non tessuto COMVIR”

A cura di Dott.ssa Barbara Azzimonti

“Le analisi sono state eseguite dalle Dott.sse Diletta Francesca Squarzanti e Paola Zanetta”.

INTRODUZIONE

COMVIR è un film coesionato nelle cui fibre di viscosa è fissata Benzalconio cloruro (vedi scheda tecnica allegata); è prodotto da FastMedItalia Srl.

SCOPO

Lo scopo di questa sperimentazione è quello di valutare, attraverso dei saggi *in vitro* in grado di simulare ciò che può avvenire naturalmente *in vivo*, l’attività biocida del tessuto non tessuto COMVIR caricato con Benzalconio cloruro, nei confronti di ceppi batterici selezionati Gram positivi e negativi.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

Per raggiungere questo obiettivo sono stati utilizzati i ceppi batterici indicati in *Tabella 1*. L'azione antibatterica di COMVIR è stata valutata su un patogeno alla volta.

Patogeno	Rif. ceppo	Gram	Terreno liquido	Terreno solido	Resistenze note	Link
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300	Positivo	LB	LB Agar	Meticillina e oxacillina	https://www.atcc.org/Products/All/43300.aspx
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117	Negativo	LB	LB Agar		https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/dsm-1117

Tabella 1. Ceppi patogeni utilizzati per i test sperimentali e loro principali caratteristiche.

Condizioni sperimentali

È stato svolto il **Saggio di diffusione in agar** utilizzando le condizioni sperimentali riportate in *Tabella 2*. L'ipoclorito di sodio (NaClO), noto battericida, è stato utilizzato come controllo interno positivo.

Patogeno	Condizione analitica	Controllo Positivo	Controllo Negativo	Controllo di crescita
<i>S. aureus</i> / <i>P. aeruginosa</i>	COMVIR	CNT con NaClO	CNT	Solo batteri
	COMVIR-CNT			

Tabella 2. Condizioni testate nei 2 saggi proposti. COMVIR: materiale caricato con Benzalconio cloruro; **CNT: tessuto di cotone non trattato 120g/m²**; CNT con NaClO: tessuto di cotone non trattato 120g/m² con aggiunta di ipoclorito di sodio.

Tessuti

Il tessuto non tessuto COMVIR e il tessuto 100% cotone non trattato 120g/m² (CNT), entrambi forniti sterili da FastMed Italia, sono stati tagliati con punches in dischetti del diametro di 8mm.

Protocollo Saggio di Diffusione

Questo test consente di valutare la formazione di un alone di inibizione su piastre agarizzate di terreno generato dopo il posizionamento dei dischetti di tessuto ed un'opportuna incubazione.

Esecuzione:

- Crescita overnight (ON) di ciascuna brodocultura in LB medium
- Rinnovo rapido di 1 ora (h) in terreno fresco (1:10)
- Piastratura a confluenza su LB agar di 200µL di ciascuna brodocultura ad OD nota (0.01) corrispondente a circa 10⁷ cellule/mL
- Posizionamento dei materiali da testare (area dischetti < 1cm²) sulla piastra. Dal momento che COMVIR si attiva a contatto con i liquidi, prima del suo posizionamento sulla piastra è stato precedentemente apposto il dischetto di cotone non trattato bagnato in fisiologica

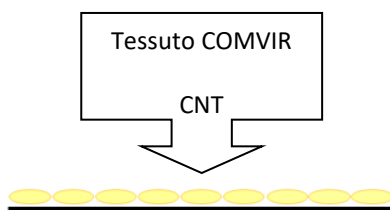
(50µL), in modo da simulare al meglio quello che avviene *in vivo* (vedi *Tabella 3* per tutte le condizioni testate e *Figura 1*)

- Incubazione a 37°C per 24h
- Valutazione dell'alone di inibizione

Per ogni ceppo sono stati eseguiti 6 replicati di ogni condizione (3 replicati per piastra).

Condizioni da testare per patogeno a 37°C			
Condizione analitica	Controllo positivo	Controllo negativo	Controllo di crescita
COMVIR con fisiologica	CNT con NaClO	CNT	Batteri
COMVIR-CNT con fisiologica			
COMVIR a secco			
COMVIR-CNT a secco			

Tabella 3. Condizioni testate nel saggio di diffusione.



Batteri su piastra di LB Agar

Figura 1. Nel saggio di diffusione, i batteri sono stati piastrati a confluenza sulla superficie della piastra contenente LB agar; sopra di essi sono stati appoggiati i materiali da testare.

RISULTATI SAGGIO DI DIFFUSIONE

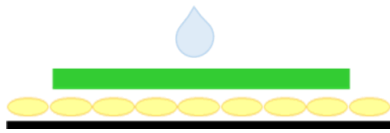
Gli aloni di inibizione sono stati osservati dopo 24h di incubazione a 37°C.

Tanto più l'alone intorno al dischetto di tessuto risulta esteso, quanto maggiore è l'efficacia nell'inibizione della crescita batterica.

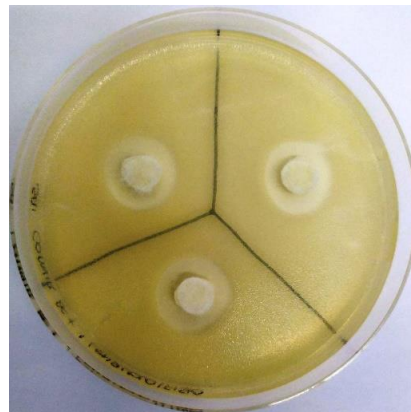
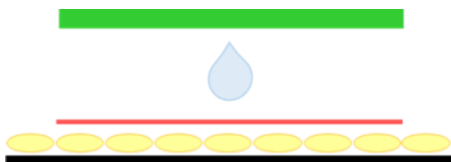
Per quanto riguarda *S. aureus*, *COMVIR*, *COMVIR-CNT con fisiologica* e *COMVIR a secco* presentano degli aloni di inibizione (le zone più chiare intorno al dischetto), indicando che la crescita batterica è stata impedita (Figura 3A, B e C). *COMVIR-CNT a secco* mostra un'inibizione solo in alcuni replicati (Figura 3D). Come atteso, il *CNT con NaClO* presenta una vasta area di inibizione, mentre l'incubazione del *CNT con fisiologica* non mostra aloni (Figura 3E e F).

Il diametro degli aloni espresso in millimetri è riportato in Tabella 5.

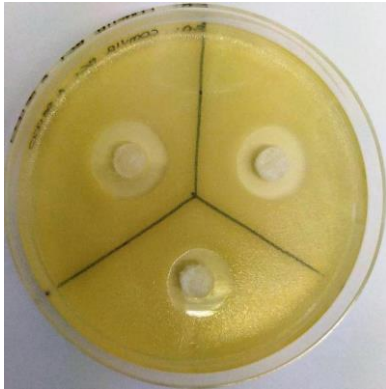
A) *COMVIR con fisiologica*



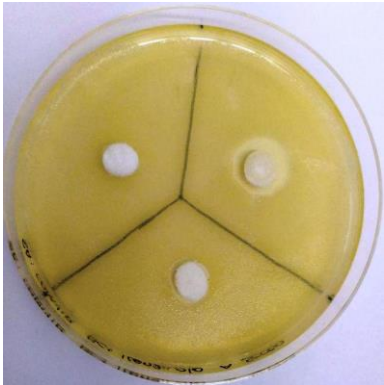
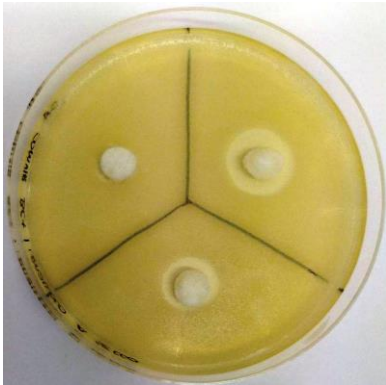
B) *COMVIR-CNT con fisiologica*



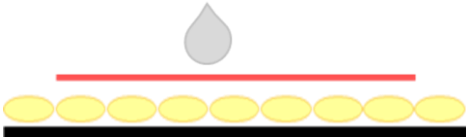
C) COMVIR a secco



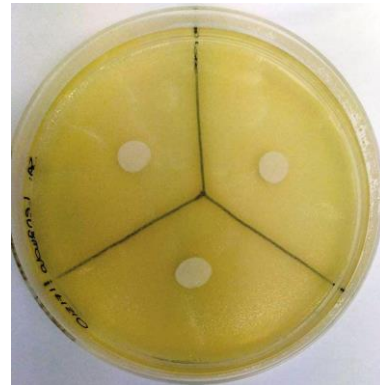
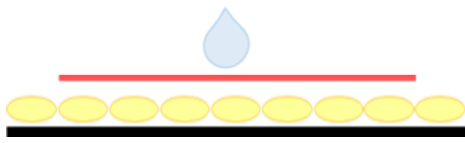
D) COMVIR-CNT a secco



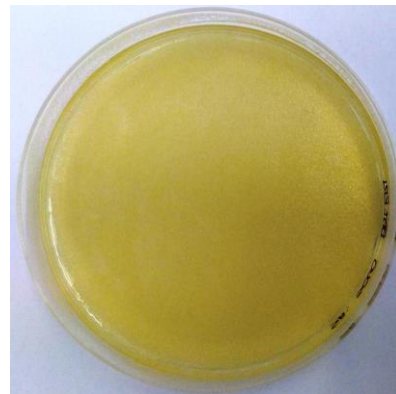
E) Controllo positivo: CNT con NaClO



F) Controllo negativo: CNT con fisiologica



G) Controllo di crescita



Legenda:



Batteri su piastra di LB Agar



COMVIR



CNT



Fisiologica



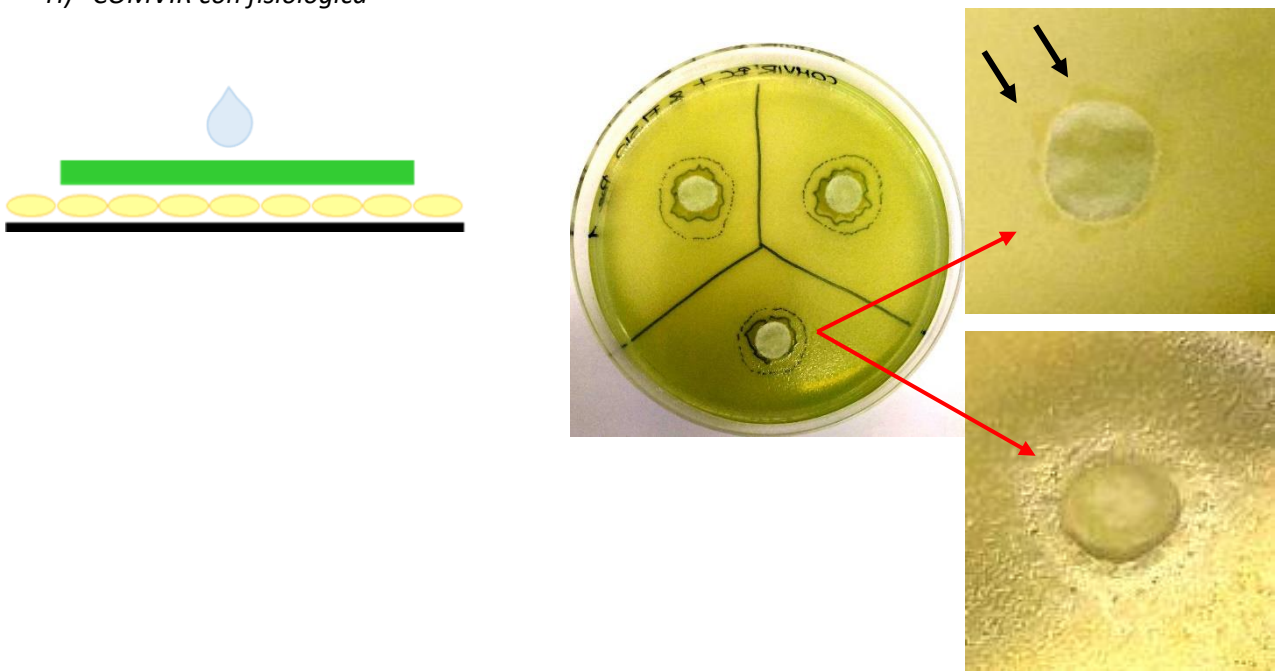
NaClO

Figura 3. Saggio di diffusione per *S. aureus*: schema di preparazione e relativa piastra. A) COMVIR con fisiologica; B) COMVIR-CNT con fisiologica; C) COMVIR a secco; D) COMVIR-CNT a secco; E) Controllo positivo: CNT con NaClO; F) Controllo negativo: CNT con fisiologica; G) Controllo di crescita.

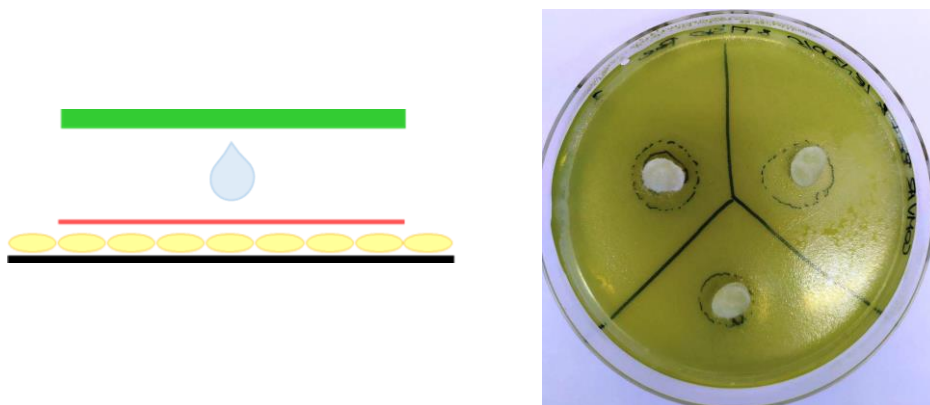
Per quanto concerne *P. aeruginosa*, COMVIR bagnato con soluzione fisiologica mostra un'area intorno al dischetto con una patina più spessa rispetto alla crescita batterica sul resto della piastra, circondata da zona con colonie più rarefatte ed uno strato batterico più sottile (Figura 4H). Le condizioni COMVIR-CNT con fisiologica, COMVIR a secco, COMVIR-CNT a secco e CNT con fisiologica presentano le colonie rarefatte di cui sopra (Figure 4I, J, K, M). Il CNT con candeggina presenta grandi aloni di inibizione (Figura 4L).

Il diametro degli aloni espresso in millimetri è riportato in Tabella 5.

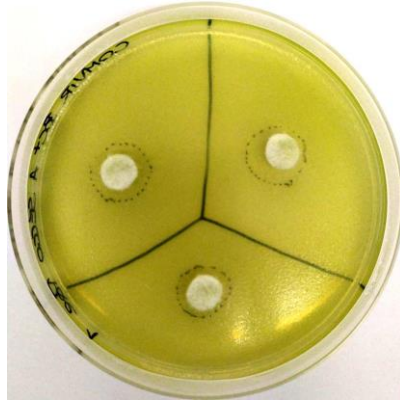
H) COMVIR con fisiologica



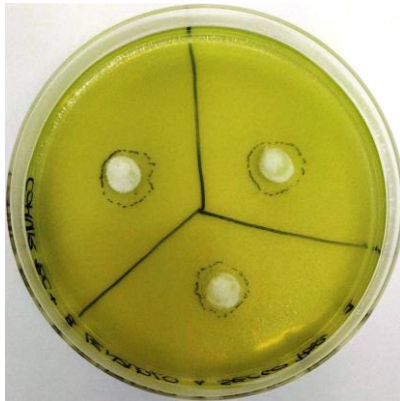
I) COMVIR-CNT con fisiologica



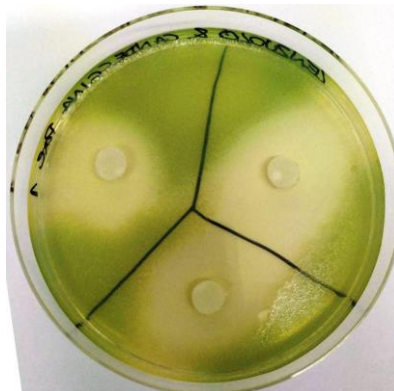
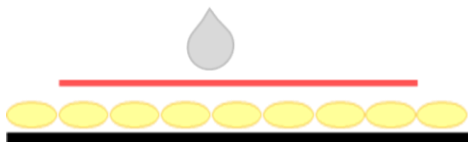
J) COMVIR a secco



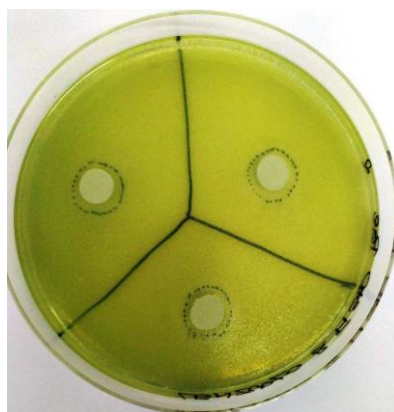
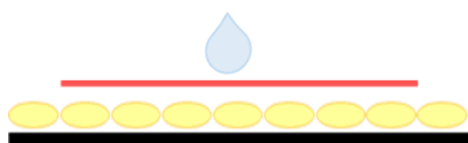
K) COMVIR-CNT a secco



L) Controllo positivo: CNT con NaClO



M) Controllo negativo: CNT con fisiologica



N) Controllo di crescita

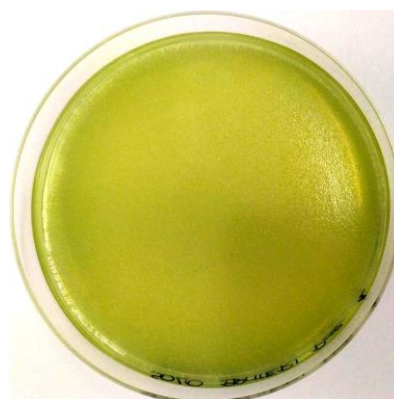


Figura 4. Saggio di diffusione per *P. aeruginosa*: schema di preparazione e relativa piastra. H) COMVIR con fisiologica; I) COMVIR-CNT con fisiologica; J) COMVIR a secco; K) COMVIR-CNT a secco; L) Controllo positivo: CNT con NaClO; M) Controllo negativo: CNT con fisiologica; N) Controllo di crescita. La legenda è la stessa della Figura 3.

Patogeno	Condizione	Media (mm) \pm Deviazione standard
<i>S. aureus</i>	COMVIR con fisiologica	19 \pm 0.63
	COMVIR-CNT con fisiologica	18 \pm 0.32
	COMVIR a secco	18 \pm 1.38
	COMVIR-CNT a secco	13 \pm 3.29
	CNT con NaClO	34.8 \pm 2.58
<i>P. aeruginosa</i>	COMVIR con fisiologica	19.4 \pm 1.50
	COMVIR-CNT con fisiologica	15 \pm 1.09
	COMVIR a secco	13.8 \pm 0.98
	COMVIR-CNT a secco	13.3 \pm 0.87
	CNT con NaClO	29 \pm 3.79

Tabella 5. Misurazione media del diametro dell'alone di inibizione \pm deviazione standard per i due ceppi in esame.

COMMENTI

Data la natura del saggio di diffusione, che prevede l'utilizzo di piastre agarizzate (contenenti acqua) e la loro incubazione a 37°C, anche i test effettuati a secco hanno una certa dose intrinseca di umidità: questa potrebbe essere la ragione per cui si è osservata una certa attività di COMVIR anche in questa condizione. Nonostante la natura semplice di questo saggio, il cui limite è rappresentato dal fatto che non sempre consente di discriminare al meglio e in modo netto i risultati relativi ai diversi trattamenti, si sono potute formulare le osservazioni di seguito riportate.

S. aureus si è mostrato sensibile all'attività del COMVIR che ha portato alla formazione di aloni di inibizione omogenei tra gli stessi replicati sperimentali. Gli aloni di inibizione sono ovviamente di diametro inferiore a quelli prodotti nel controllo positivo con ipoclorito puro.

Per quanto riguarda le piastre infettate da *P. aeruginosa*, si è osservata la crescita del ceppo batterico produttore di pigmenti colorati, sia nella parte a contatto con la piastra che, in alcuni casi, sulla superficie dei tessuti.

Nella condizione COMVIR con fisiologica però, *la presenza di aree con colonie più rarefatte intorno al tessuto ha fatto supporre che ci sia stata un'inibizione iniziale del patogeno, poi seguita da un adattamento dello stesso.*

Questa minore risposta del patogeno *P. aeruginosa* rispetto a *S. aureus* nei confronti di COMVIR era peraltro attesa data la grande patogenicità di questo ceppo batterico.