



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

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 fissato il 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* che simulino al meglio ciò che può avvenire naturalmente *in vivo*, l’attività biocida promossa dal 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	<a href="https://www.atcc.org/Products/All/43300.aspx">https://www.atcc.org/Products/All/43300.aspx</a>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117	Negativo	LB	LB Agar		<a href="https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/dsm-1117">https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/dsm-1117</a>

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

### Condizioni sperimentali

È stato svolto il **Saggio in transwell** 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>	COMVIR	CNT con NaClO	CNT	Solo batteri
<i>P. aeruginosa</i>	COMVIR - CNT			

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

### Tessuti

Il tessuto non tessuto COMVIR e il tessuto 100% cotone non trattato 120g/m<sup>2</sup> (CNT), entrambi forniti sterili da FastMed Italia, sono stati tagliati con punches in dischetti del diametro di 8mm.

### Protocollo Saggio in Transwell

Questo test permette di simulare in modo più realistico ciò che avviene *in vivo*; la vitalità batterica è stata valutata attraverso il saggio metabolico enzimatico AlamarBlue (AB).

Esecuzione:

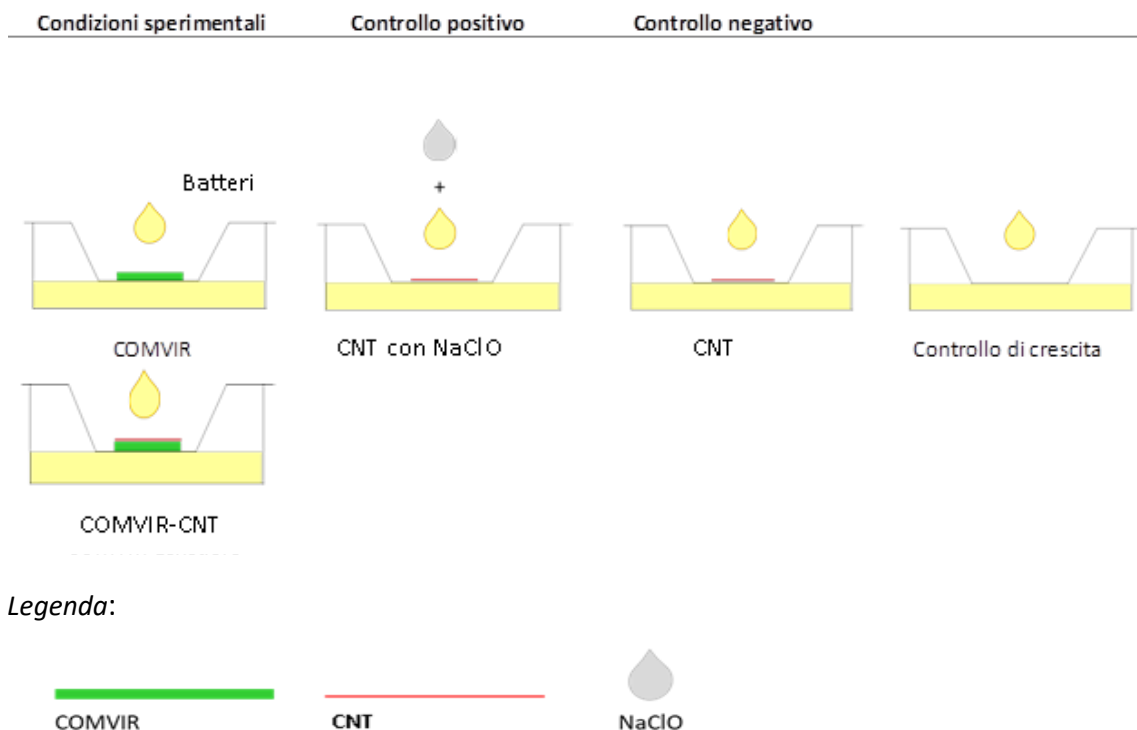
- Crescita ON di ciascuna brodocultura in LB medium
- Rinnovo rapido di 1h in terreno fresco (1:10)
- Montaggio dei materiali nei rispettivi transwell (vedi *Tabella 4* per le condizioni testate), dotati di una membrana con pori del diametro di 8µm
- Inoculo di ciascuna brodocultura ad OD nota (0.01) corrispondente a circa 10<sup>7</sup> cellule/mL (vedi *Figura 2*)
- Incubazione a 37°C per 24h
- Aggiunta di AB alla concentrazione finale di 0,015%

- Incubazione a 37°C per 2h
- Lettura in fluorescenza allo spettrofotometro (Ex 535nm/Em 590nm)

I test sono stati eseguiti in quadruplicato.

Condizioni da testare per patogeno a 37°C			
Condizione analitica	Controllo positivo	Controllo Negativo	Controllo Crescita
COMVIR	CNT con NaClO	CNT	Batteri
COMVIR - CNT			

**Tabella 4.** Condizioni testate nel saggio in transwell



**Figura 2.** Schema grafico delle condizioni testate nel saggio in transwell: una piccola quantità di sospensione batterica è stata posta sulla superficie del tessuto, schermato o meno dal tessuto di cotone non trattato (CNT), a mimare quanto potrebbe avvenire in una situazione reale.

### Analisi statistica

I risultati sono forniti in percentuale, considerando il controllo di crescita come 100%, sotto forma di grafici a barre. È stata condotta l'analisi statistica utilizzando il test one-way ANOVA, con la correzione *post-hoc* di Tukey, considerando significative le differenze con  $p\text{-value} < 0.05$ . È stata inoltre effettuata l'analisi di comparazione tra i valori ottenuti tra il terreno sottostante ed il filtro del transwell utilizzando il test two-way ANOVA seguito dalla correzione *post-hoc* di Sidak.

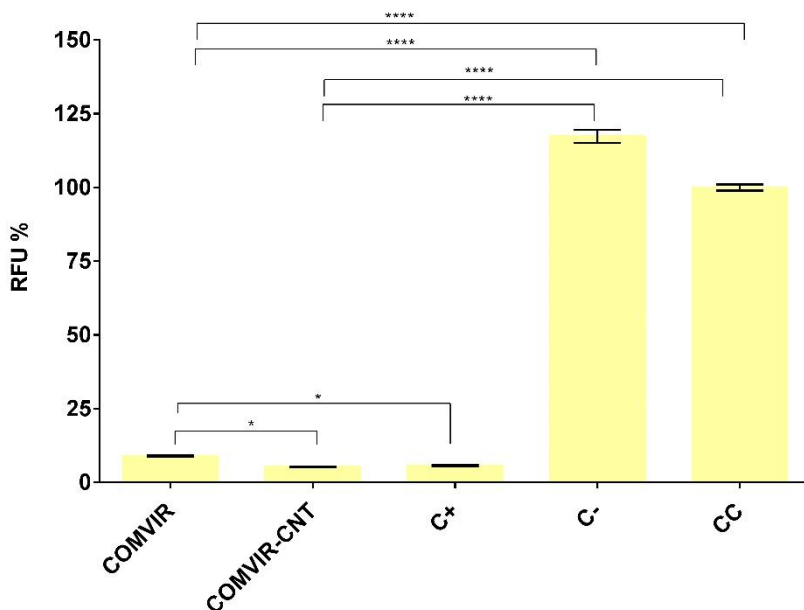
## RISULTATI SAGGIO IN TRANSWELL

Sono state eseguite le letture *i)* del volume esterno al transwell e *ii)* del filtro del transwell (in quest'ultimo caso aggiungendo 2mL di soluzione fisiologica/pozzetto) dopo 2h di incubazione con AB alla concentrazione finale di 0,015%.

I risultati sono mostrati nei grafici di seguito riportati.

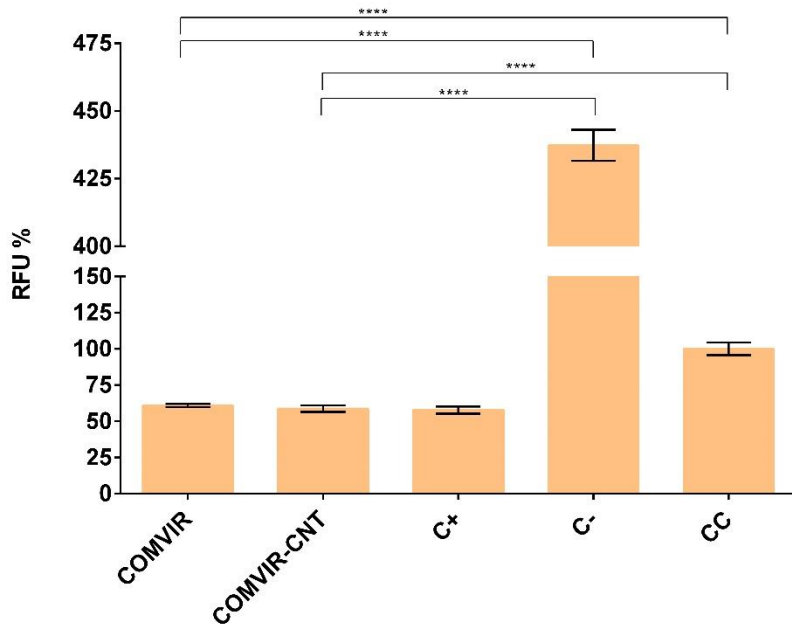
COMVIR e COMVIR - CNT mostrano una spiccata attività nel ridurre la vitalità batterica di *S. aureus*, sia nel terreno sottostante sia sul filtro del transwell ( $p < 0.0001$  vs C- e CC; *Figure 5 e 6*). Essi risultano avere un effetto statisticamente significativo anche rispetto al C+ e fra di loro nel solo terreno sottostante ( $p < 0.05$ ; *Figura 5*).

### *S. aureus*: terreno sottostante



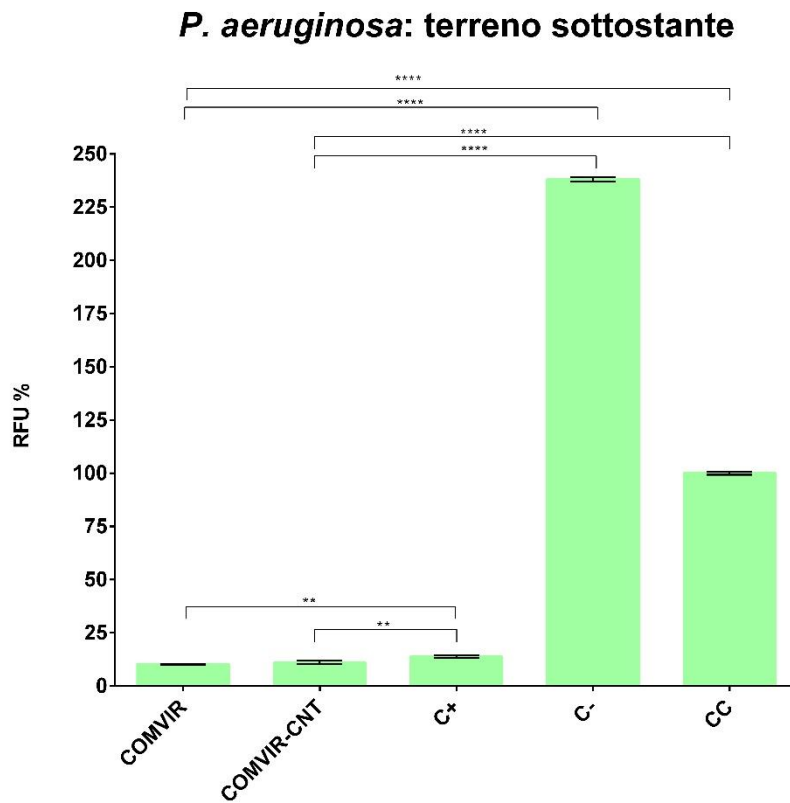
**Figura 5.** Vitalità batterica di *S. aureus* espressa come Relative Fluorescence Unit percentuale (RFU%) nel terreno sottostante. C+: CNT con NaClO; C-: CNT; CC: controllo di crescita batterica.

## ***S. aureus*: filtro transwell**



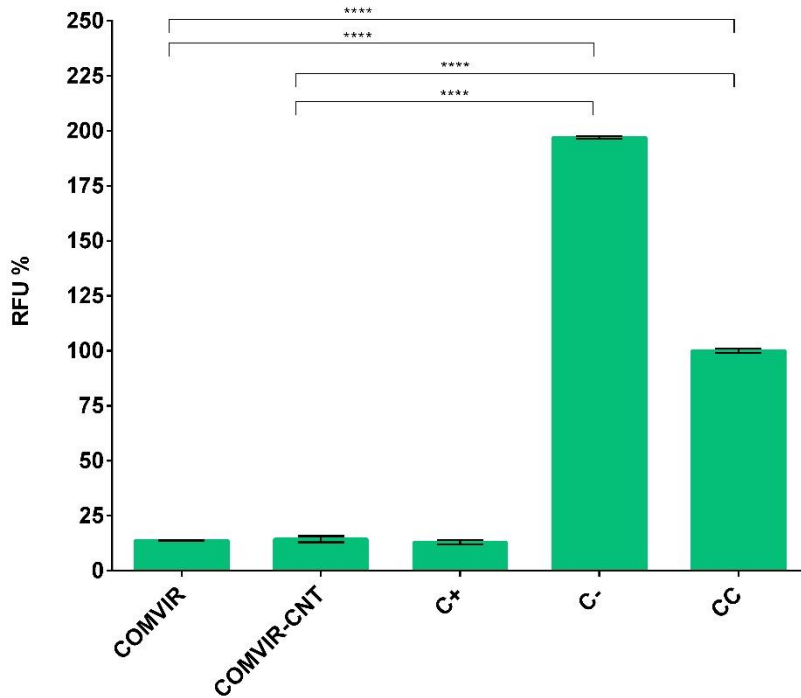
**Figura 6.** Vitalità batterica di *S. aureus* espressa come Relative Fluorescence Unit percentuale (RFU%) nel filtro del transwell. C+: CNT con NaClO; C-: CNT; CC: controllo di crescita batterica.

Per quanto concerne *P. aeruginosa*, esso mostra un andamento simile a quello del precedente ceppo batterico sia nel terreno sottostante sia nel filtro del transwell (COMVIR e COMVIR-CNT  $p < 0.0001$  vs C-; *Figura 7 e 8*). Limitatamente al terreno sottostante, essi risultano avere un effetto statisticamente significativo anche rispetto al C+ e fra di loro ( $p < 0.001$ ; *Figura 7*).



**Figura 7.** Vitalità batterica di *P. aeruginosa* espressa come Relative Fluorescence Unit percentuale (RFU%) nel terreno sottostante. C+: CNT con NaClO; C-: CNT; CC: controllo di crescita batterica.

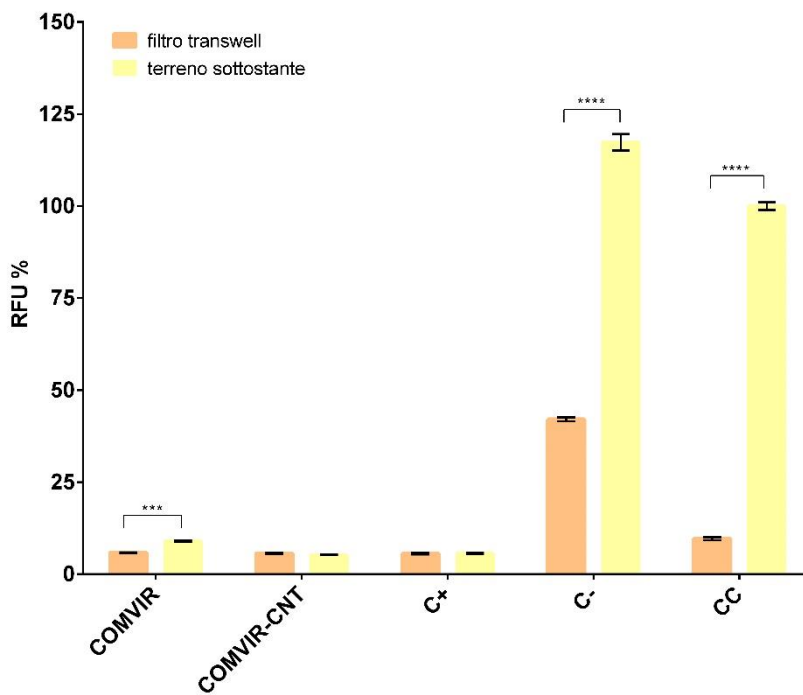
## *P. aeruginosa*: filtro transwell



**Figura 8.** Vitalità batterica di *P. aeruginosa* espressa come Relative Fluorescence Unit percentuale (RFU%) nel filtro del transwell. C+: CNT con NaClO; C-: CNT; CC: controllo di crescita batterica.

Di seguito sono riportati i grafici di comparazione tra il terreno sottostante e il filtro transwell per i due ceppi batterici (*Figura 9 e 10*). In questo caso, le percentuali sono state calcolate considerando come riferimento del 100% il valore maggiore di RFU del controllo di crescita. In questo modo, è possibile visualizzare le differenze tra i due compartimenti per quanto riguarda la presenza di batteri metabolicamente attivi.

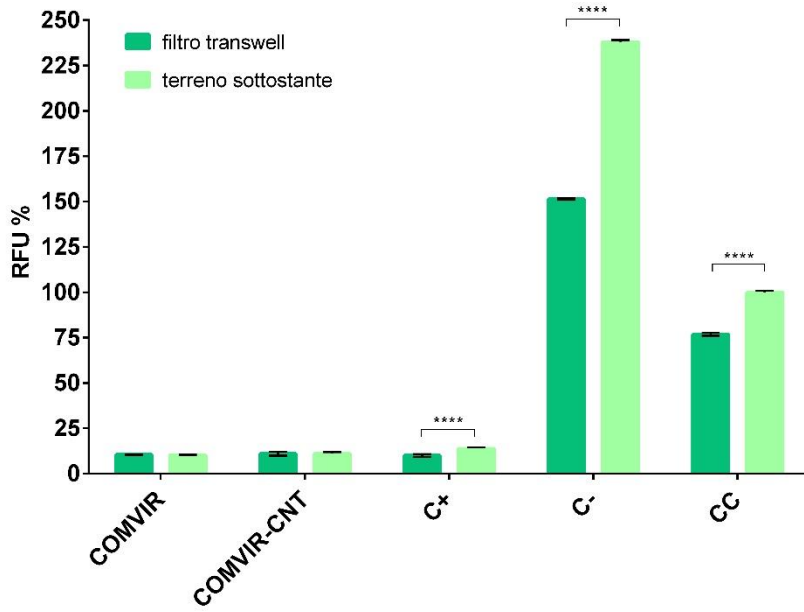
### ***S. aureus***



**Figura 9.** Vitalità batterica di *S. aureus* espressa come Relative Fluorescence Unit percentuale (RFU%) nel terreno sottostante e nel filtro del transwell. C+: CNT con NaClO; C-: CNT; CC: controllo di crescita batterica.



## *P. aeruginosa*



**Figura 10.** Vitalità batterica di *P. aeruginosa* espressa come Relative Fluorescence Unit percentuale (RFU%) nel terreno sottostante e nel filtro del transwell. C+: CNT con NaClO; C-: CNT; CC: controllo di crescita batterica.

## COMMENTI

*Il saggio in transwell è una tecnica analitica dotata di una ottima capacità di valutare l'attività antibatterica di COMVIR, in quanto è in grado di simulare al meglio in vitro ciò che potrebbe avvenire in una situazione reale in vivo.*

In particolare, i patogeni *S. aureus* e *P. aeruginosa*, in presenza di COMVIR e COMVIR-CNT hanno prodotto una drastica riduzione del numero di batteri metabolicamente attivi, sia nel terreno sottostante che nel filtro del transwell, in modo paragonabile al C+ (CNT con NaClO) rispetto al controllo C-.

Infatti, nel C- (CNT) si è osservata in generale un'augmentata crescita batterica, probabilmente dovuta al fatto che i patogeni *S. aureus* e *P. aeruginosa* utilizzati sono in grado di colonizzare i tessuti utilizzandoli come substrato di crescita. Nei C- e CC si è riscontrata una maggior quantità di *S. aureus* metabolicamente attivi nel terreno sottostante; questo è accaduto in misura meno evidente per *P. aeruginosa*, che invero, allo scadere delle 24 ore, ha creato uno spesso strato di biofilm a livello del filtro e delle pareti stesse del transwell.