

REGIONE CALABRIA
UNIVERSITA' DEGLI STUDI "MAGNA GRAECIA"
AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA
"MATER DOMINI"



Unità Operativa di Microbiologia Clinica

Direttore: Prof. Alfredo Focà

Laboratorio con Certificazione di Qualità UNI EN 9001:2008 N° 22382 del 7/7/2015
"Erogazione del Servizio di Microbiologia Clinica con Metodologie convenzionali e Molecolari"

Relazione programma di ricerca Biocidi

Copia

I preparati oggetto della ricerca sono sostanze ad effetto sterilizzante basate sull'azione di radicali liberi, atomi o molecole che dispongono di un numero dispari di elettroni nell'orbita esterna. Ciò comporta uno stato di instabilità che li conduce ad appropriarsi di elettroni di altre molecole con le quali stanno a contatto per ottenere un equilibrio di stabilità. Le seconde molecole che hanno ceduto elettroni divengono instabili in cerca di altri elettroni per la loro stabilità e innescando così una reazione a catena di cessione-acquisizione di elettroni (stabilità-instabilità). Le varie componenti attive in questa reazione di trasferimento di elettroni possono comportarsi da ossidanti quindi come accettori di elettroni ovvero riducenti quindi donatori di elettroni.

Il meccanismo d'azione dei radicali liberi si esplica irreversibilmente in prevalenza sulla componente lipidica (lipidi e fosfolipidi) delle membrane cellulari e sulle proteine del nucleo (pori della membrana nucleare).

Saranno sottoposte a prove microbiologiche

- radicali liberi donatori di elettroni che presentano attività riducente in veicolo con valori del pH alcalino, da utilizzare per la loro azione sterilizzante su strumenti e dispositivi medici
- radicali liberi accettori di elettroni, ad azione ossidante da utilizzare per la decontaminazioni di superfici.

[Handwritten signature]
1

Scopo dello studio


Lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'attività sterilizzante delle polveri solubili DIAL e EC-STER verso le spore di *B.subtilis* ATCC 19695.

La validità del prodotto DIAL è stata valutata con i seguenti test:

- 1) Capacità sporicida su *B.subtilis* a concentrazione $8\log_{10}$ (0,8 McF) alla dose di impiego dello 0,3% con tempi di contatto di 2''-5''-60'';
- 2) Capacità sporicida su *B.subtilis* a concentrazione $8\log_{10}$ (0,8 McF) alla dose di impiego dello 0,25% con tempi di contatto di 5''-10''-30'';
- 3) Capacità sporicida su *B.subtilis* a concentrazione $8\log_{10}$ (0,8 McF) alla dose di impiego dello 0,2% con tempi di contatto di 60''-2'-3';
- 4) Capacità sporicida su *B.subtilis* a concentrazione $8\log_{10}$ (0,8 McF) alla dose di impiego dello 0,18% con tempi di contatto di 60''-2'-3';
- 5) Capacità sporicida su *B.subtilis* a concentrazione $8\log_{10}$ (0,8 McF) alla dose di impiego dello 0,15% con tempi di contatto di 60''-2'-3';
- 6) Capacità sporicida su *B.subtilis* a concentrazione $8\log_{10}$ (0,8 McF) alla dose di impiego dello 0,3% dopo 6 ore dalla preparazione, con tempi di contatto di 2''-5''-60'';
- 7) Capacità sporicida su *B.subtilis* a concentrazione $8\log_{10}$ (0,8 McF) alla dose di impiego dello 0,3% dopo 48 ore dalla preparazione, con tempi di contatto di 2''-5''-60'';
- 8) Capacità sporicida su *B.subtilis* a concentrazione $8\log_{10}$ (0,8 McF) alla dose di impiego dello 0,25% dopo 7 giorni dalla preparazione, con tempi di contatto di 60''-5'.

La validità del prodotto EC-STER è stata valutata con i seguenti test:

- 1) Capacità sporicida su *B.subtilis* a concentrazione $8\log_{10}$ (0,8 McF) alla dose di impiego dello 0,35% con tempi di contatto di 2''-10''-30''.

 2

Materiali

Polvere solubile in acqua DIAL;

Polvere solubile in acqua Ec-Ster;

Spore di *B.subtilis* ATCC 19695;

Piastre di agar sangue di montone;

Nutrient Broth.

Metodi

Preparazione delle soluzioni sterilizzanti.

Le polveri solubili a diversa concentrazione dei prodotti DIAL e Ec-Ster sono state disciolte in acqua (acqua di rete a temperatura ambiente) fino alla loro completa dissoluzione.

Preparazione delle spore di *B.subtilis* ATCC 19695.

Le spore di *B.subtilis* ATCC 19695 sono state preparate seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice. L'inoculo utilizzato negli esperimenti è stato preparato fino ad ottenere una sospensione con una torbidità pari a 0.8 Mc Farland (circa 10^8 unità formanti colonie/mL).

Metodo manuale.

In un volume totale di 10 mL di ogni soluzione sterilizzante (DIAL e EC-STER) sono stati aggiunti 100 μ L di *B.subtilis* ATCC 19695 0,8 McF. Dopo ogni tempo di contatto testato, un'aliquota di 100 μ L delle sospensioni è stata insemata in piastre di agar sangue di montone incubate a 37°C per 24 ore. Al termine dell'incubazione è stata valutata la crescita microbica.

Una seconda aliquota di 100 μ L è stata trasferita in provette contenenti Nutrient Broth, dopo un'incubazione di 24 ore a 37°C, 100 μ L sono stati insemati in piastre di agar sangue di montone. Al termine dell'incubazione è stata valutata la crescita microbica.

In tutti gli esperimenti eseguiti sono stati inclusi un controllo negativo per individuare eventuali contaminazioni delle soluzioni in esame e un controllo positivo di crescita microbica.

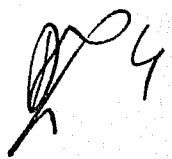
Metodo automatizzato Alfred 60, Alifax.

Alfred 60, Alifax, è un sistema totalmente automatizzato che, grazie alla tecnologia basata sul Light Scattering, è in grado di determinare la presenza di microrganismi e rileva la loro attività di replicazione visualizzando in real time le curve di crescita e fornendo risultati

quantitativi della conta in unità formanti colonie/mL.

In un volume totale di 10 mL di ogni soluzione sterilizzante (DIAL e EC-STER) sono stati aggiunti 100 μ L di *B.subtilis* ATCC 19695 0,8 McF. Dopo ogni tempo di contatto testato, un'aliquota di 100 μ L è stata trasferita nelle cuvette di lettura dedicate (vials) contenente un brodo eugonico che nel sistema è costantemente agitato e termostato (37°C). Per valutare l'efficacia dei prodotti in esame è stato impostato un periodo di incubazione di 24 ore.

In tutti gli esperimenti eseguiti sono stati inclusi un controllo negativo per individuare eventuali contaminazioni delle soluzioni in esame e un controllo positivo di crescita microbica.



Risultati

Metodo manuale

Ceppo *B.subtilis* ATCC 19695 - 0.8 McF ($\sim 10^8$ CFU/mL)

Prodotto	Tempi di contatto							5'
	2''	5''	10''	30''	60''	2'	3'	
T2; Campione n° 3 lotto:74/s/15 dose di impiego 0.3%	-	-			-			
DESAN; Campione n° 5 lotto:82/s/15 dose di impiego 0.3%	-	-			-			
DIAL; Campione n° 2 lotto:6/15 dose di impiego 0.25%		-	-	-	-			-
T2; Campione n° 1 lotto: 74/s/15 dose di impiego 0.2%					-	-	-	
DESAN; Campione n° 8 lotto: 83/s/15 dose di impiego 0.2%					-	-	-	
DIAL; lotto:6/14 dose di impiego 0.18%					-	-	-	
DESAN; Campione n° 6 lotto: 82/s/15 dose di impiego 0.15%					-	-	-	
EC-STER; lotto 07/14 dose di impiego 0.35%	-		-	-				
Legenda: - assenza di crescita								

5

Metodo automatizzato Alfred 60, Alifax

Ceppo *B.subtilis* ATCC 19695 - 0.8 McF (~10⁸ CFU/mL)

Prodotto	Tempi di contatto							5'
	2''	5''	10''	30''	60''	2'	3'	
T2; Campione n° 3 lotto:74/s/15 dose di impiego 0.3%	-	-			-			
DESAN; Campione n° 5 lotto:82/s/15 dose di impiego 0.3%	-	-			-			
DIAL; Campione n° 2 lotto:6/15 dose di impiego 0.25%		-	-	-	-			-
T2; Campione n° 1 lotto: 74/s/15 dose di impiego 0.2%					-	-	-	
DESAN; Campione n° 8 lotto: 83/s/15 dose di impiego 0.2%					-	-	-	
DIAL; lotto:6/14 dose di impiego 0.18%					-	-	-	
DESAN; Campione n° 6 lotto: 82/s/15 dose di impiego 0.15%					-	-	-	
EC-STER; lotto 07/14 dose di impiego 0.35%	-		-	-				
Legenda: - assenza di crescita								

Discussioni

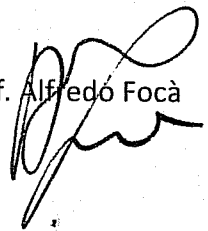
Gli esperimenti, eseguiti secondo la normativa EN 13704, hanno evidenziato l'attività sporicida dei prodotti DIAL e EC-STER verso le spore di *B.subtilis* ATCC 19695.

Le soluzioni hanno dimostrato la loro efficacia sia nel metodo manuale che in quello automatico nelle condizioni sperimentali che prevedevano tempi di contatto variabili e diverse concentrazioni dei prodotti testati.

In seguito ai risultati ottenuti, le stesse soluzioni sono state utilizzate per osservazioni morfologiche al microscopio confocale. Le spore di *B.subtilis* dopo contatto con le soluzioni DIAL e Ec-Ster a diverse concentrazioni, il controllo positivo e il controllo negativo sono stati colorati con arancio di acridina, colorante vitale che lega gli acidi nucleici. Dalle osservazioni microscopiche effettuate, nei campioni che sono stati a contatto con le soluzioni sterilizzanti e nel controllo negativo, non si è osservata la presenza né di forme sporali né di cellule vegetative come mostrato nelle figure 1-8. Al contrario, nel controllo positivo l'emissione della fluorescenza rossa e verde ha rivelato rispettivamente la presenza di spore e di cellule vegetative di *Bacillus subtilis* (Fig.9-11).

18/12/2015

Prof. Alfredo Focà



7