

STUDIO DELL'INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI MICRORGANISMI SPECIFICI

COMMITTENTE	ERBAGIL S.r.l. Via L. Settembrini, 13 82037 Telese Terme (BN)
PRODOTTO	OZOILE
DATA REPORT	03/08/2018
REPORT N.	IB/18/EB1P1

PREMESSA

Il report contiene i dati sperimentali ottenuti durante l'esecuzione del test per la valutazione dell'effetto inibitorio del prodotto in esame nei confronti di alcuni ceppi microbici.

I risultati del test sono presentati sotto forma di tabelle e rappresentazioni grafiche e sono stati ottenuti seguendo le norme di Buona Pratica di Laboratorio (GLP).

Il report ed i dati in esso contenuti sono da intendere per esclusivo uso interno ed esterno. Ogni forma diversa di utilizzo dovrà essere preventivamente concordata con UB-CARE S.r.l.

INDICE

1. SOMMARIO	pag. 4
1.1. COMMITTENTE	pag. 4
1.2. CAMPIONE	pag. 4
1.3. DATA DELLO STUDIO	pag. 4
1.4. LABORATORIO INCARICATO	pag. 4
1.5. TEST ESEGUITI	pag. 4
1.6. SPERIMENTATORE	pag. 4
2. SCOPO	pag. 5
3. MATERIALI E METODI	pag. 6
3.1. MICRO-ORGANISMI UTILIZZATI	pag. 6
3.2. ANALISI DELL'INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI CEPPI MICROBIOLOGICI	pag. 6
3.2.1 PREPARAZIONE DELLE COLTURE BATTERICHE	pag. 7
3.2.2 ESECUZIONE DEL TEST	pag. 7
4. RISULTATI	pag. 8
4.1. VALUTAZIONE DELL'INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI SPECIFICI MICRORGANISMI	pag. 8
5. CONCLUSIONI	pag. 14

1. SOMMARIO

1.1. COMMITTENTE

ERBAGIL S.r.l.

Via L. Settembrini, 13

82037 Telese Terme (BN)

1.2. CAMPIONE

Nome prodotto: OZOILE

Codice interno: EB1P1

1.3. TEMPISTICHE DELLO STUDIO

Data di arrivo del prodotto: 28/05/2018

Data di emissione del report: 03/08/2018

1.4. LABORATORIO INCARICATO

UB-CARE S.r.l.

Spin-off accademico dell'Università di Pavia, laboratori dell'Unità di Immunologia e Patologia generale, Dipartimento di Medicina Molecolare, Via Ferrata 9, 27100-Pavia.

1.5. TEST ESEGUITI

È stata analizzata la capacità del prodotto di ridurre la crescita del ceppo di diversi ceppi microbiologici, tramite conta in piastra effettuata a diversi tempi dal contatto.

1.6. SPERIMENTATORE

Dr.ssa Sabrina Sommatìs, PhD

2. SCOPO

Lo scopo del test è valutare l'eventuale capacità del prodotto testato di ridurre la crescita di specifici ceppi microbici, in seguito a contatto diretto per diverse tempistiche.

Il test prevede il contatto del prodotto in esame con la coltura microbica specificata e la successiva valutazione della variazione della carica microbica mediante il conteggio in piastra ad intervalli di tempo regolari.

3. MATERIALI E METODI

3.1. MICRO-ORGANISMI UTILIZZATI

I ceppi microbici analizzati per lo studio sono elencati in **Tabella 3.1.**:

Ceppo	ATCC	Terreno di coltura
<i>Escherichia Coli</i>	8739	Tryptone Soya Broth/Agar
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	9027	Tryptone Soya Broth/Agar
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Tryptone Soya Broth/Agar
<i>Candida albicans</i>	10231	Sabourad dextrose Broth /Agar
<i>Gardnerella vaginalis</i>	14018	Brain heart infusion Broth / Gardnerella selective agar
<i>Proteus mirabilis</i>	7002	Nutrient Broth/Agar
<i>Propionibacterium acnes</i>	11827	Brain heart infusion Broth/Blood agar sheep
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433	Brain heart infusion Broth/Agar
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	Nutrient Broth/Agar
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Brain heart infusion Broth/ Blood agar sheep

Tabella 3.1. Elenco dei ceppi microbici analizzati, con i rispettivi terreni di coltura.

La concentrazione dell'inoculo iniziale è pari a $10^5/10^6$ Unità Formanti Colonia/ml (CFU/ml).

3.2. ANALISI DELL'INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI CEPPI MICROBIOLOGICI

È stata valutata la capacità del prodotto **Ozoile** di ridurre la crescita dei ceppi analizzati in seguito a contatto per diversi intervalli di tempo (2-6-12-24h).

3.2.1 PREPARAZIONE DELLE COLTURE BATTERICHE

È stata preparata una Petri contenente terreno specifico per il ceppo da analizzare, su cui è stata strisciata la coltura, in modo da ottenere la separazione delle singole colonie ed analizzarne l'uniformità morfologica. La piastra è stata inserita in un sistema di anaerobiosi (Oxoid) per i ceppi *P. acnes* e *G. vaginalis*.

Le piastre sono state incubate a 35°C per 48-72-120 h, in base alle specifiche condizioni di crescita dei ceppi.

Partendo dalla prima coltura è stata effettuata una seconda e una terza subcoltura con le stesse condizioni di incubazione. La terza rappresenta il campione che è stato utilizzato per l'esecuzione del test.

Al termine del tempo di incubazione, le cellule batteriche sono state raccolte tramite ansa sterile e diluite in terreno specifico; successivamente è stata effettuata una lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 600 nm per determinare il numero di CFU/ml presenti.

Sono state effettuate diluizioni scalari per ottenere una sospensione calibrata di $10^5/10^6$ CFU/ml.

3.2.2 ESECUZIONE DEL TEST

Il saggio è stato eseguito in piastre 24 pozzetti, dove la coltura batterica ($10^5/10^6$ CFU/ml concentrazione finale) è stata aggiunta ai seguenti campioni:

- Controllo inoculo: terreno di coltura specifico per i diversi ceppi.
- Campione: prodotto **Ozoile** diluito 80% in terreno di coltura.

I campioni sono stati incubati a 35°C per 2-6-12 e 24 h. Da ogni pozzetto sono state prelevate aliquote (100 µl) che sono state piastrate in duplicato su Petri specifiche per i diversi ceppi ed incubate a 35°C per 48-72-120 h in condizioni di aerobiosi o anaerobiosi, secondo le diverse condizioni di crescita.

4. RISULTATI

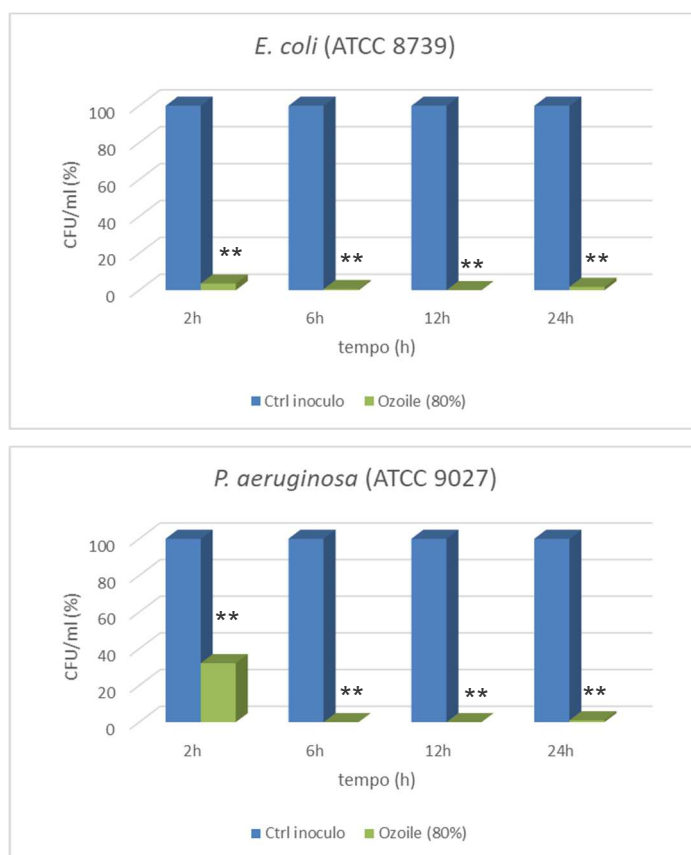
Le CFU/ml sono espresse in percentuale rispetto al controllo inoculo (cellule inoculate in terreno di coltura).

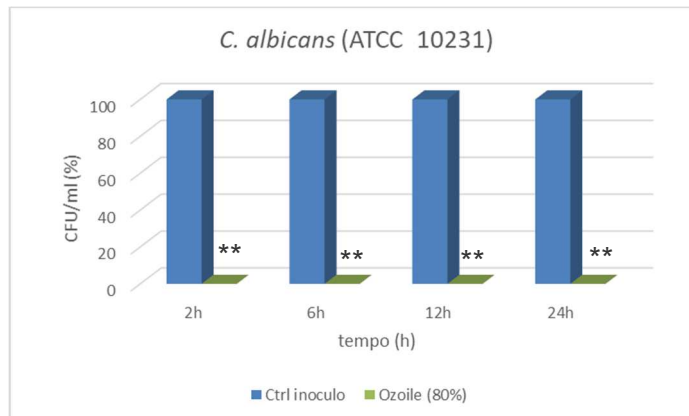
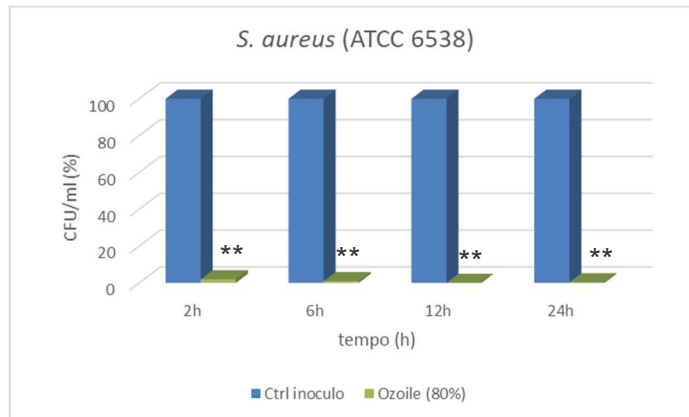
I valori riportati rappresentano la media di tre esperimenti condotti in doppio. L'analisi statistica è stata realizzata con il *t-test* di Student. Sono stati considerati statisticamente significativi e altamente significativi i valori di *p-value* inferiori o uguali a 0,05 e inferiori o uguali a 0,01.

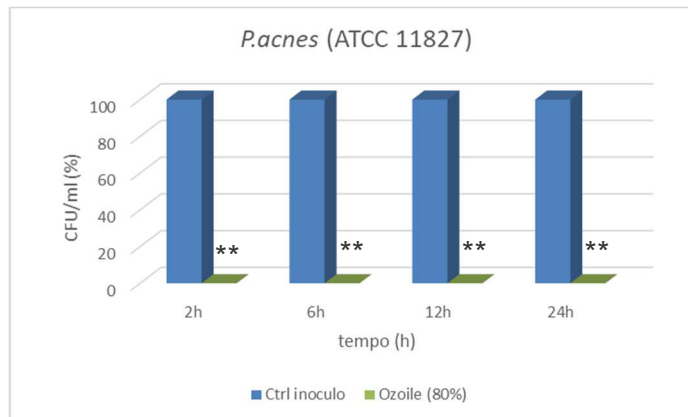
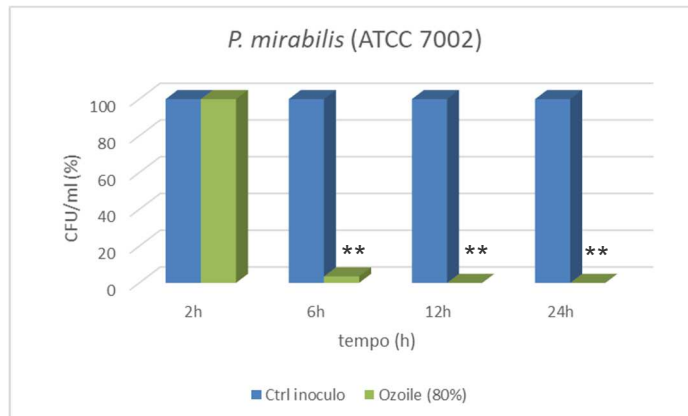
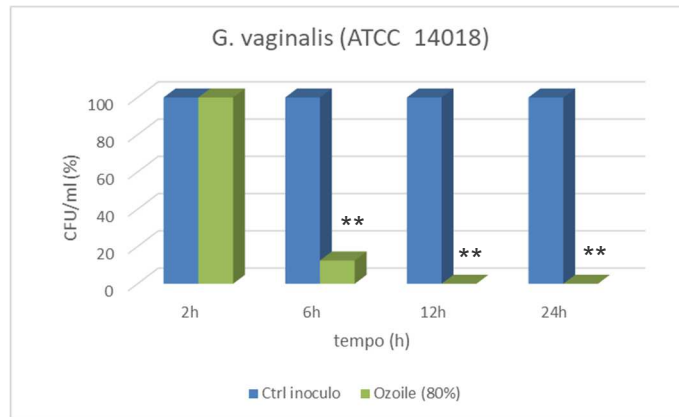
4.1 VALUTAZIONE DELL'INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI SPECIFICI MICRORGANISMI

L'attività inibitoria del prodotto **Ozoile** è stata valutata mettendo a contatto i diversi ceppi con il prodotto testato.

A specifici intervalli di tempo, 100 µl della miscela (Ctrl inoculo e Ozoile 80%) sono stati piastrati su piastre agar selettive al fine di verificare l'eventuale inibizione della crescita batterica, rappresentata nella **Figura 4.1**.







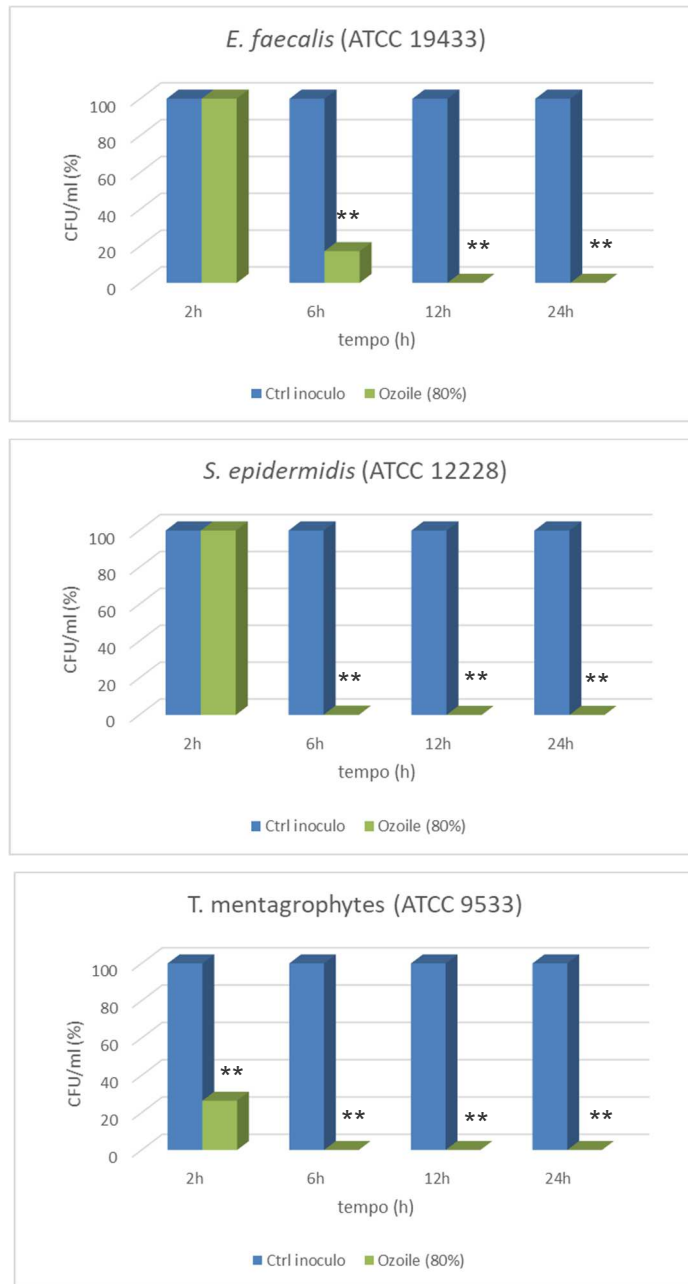


Figura 4.1: Inibizione della crescita dei ceppi microbiologici analizzati in assenza (Ctrl inoculo) e presenza (80%) del prodotto Ozoile dopo diversi tempi dal contatto (n=3; replicati=2).

* $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$: significatività rispetto al controllo inoculo (Ctrl inoculo) valutata mediante il test statistico t-test di Student.

Tempistica (h)	Crescita batterica (%)							
	2h		6h		12h		24h	
Campione	Ctrl inoculo	Ozoile (80%)	Ctrl inoculo	Ozoile (80%)	Ctrl inoculo	Ozoile (80%)	Ctrl inoculo	Ozoile (80%)
<i>E. Coli</i>	100	3,60±3,80	100	0,6±0,91	100	0,01±0,00	100	1,8±2,78
<i>P. Aeruginosa</i>	100	32,16±14,79	100	0,01±0,00	100	0,01±0,0	100	1,01±1,54
<i>S. aureus</i>	100	1,96±2,63	100	0,93±1,32	100	0,01±0,00	100	0,3±0,6
<i>C. albicans</i>	100	0,01±0,00	100	0,01±0,00	100	0,01±0,00	100	0,01±0,00
<i>G. vaginalis</i>	100	100±0,00	100	12,5±0,00	100	0,01±0,00	100	0,01±0,00
<i>P. mirabilis</i>	100	100±0,00	100	3,53±5,77	100	0,01±0,00	100	0,01±0,00
<i>P. acnes</i>	100	0,01±0,00	100	0,01±0,00	100	0,01±0,00	100	0,01±0,00
<i>E. faecalis</i>	100	100±0,00	100	17,23±10,18	100	0,01±0,00	100	0,01±0,00
<i>S. epidermidis</i>	100	100±0,00	100	0,10±0,12	100	0,01±0,00	100	0,01±0,00
<i>T. mentagrophytes</i>	100	26,44±2,08	100	0,01±0,00	100	0,01±0,00	100	0,01±0,00

Tabella 4.1: Crescita dei ceppi analizzati in assenza (Ctrl inoculo) e presenza del prodotto Ozoile, espressa in percentuale rispetto al controllo inoculo dopo diversi tempi dal contatto (n=3; replicati=2).

I risultati ottenuti evidenziano che il prodotto **Ozoile** determina una diminuzione della crescita alle diverse tempistiche di contatto, meglio specificata in **Tabella 4.2**.

Tempistica (h)	Riduzione della crescita batterica (%)			
	2h	6h	12h	24h
Campione	Ozoile (80%)	Ozoile (80%)	Ozoile (80%)	Ozoile (80%)
<i>E. Coli</i>	96,40	99,40	99,99	98,20
<i>P. Aeruginosa</i>	67,84	99,99	99,99	98,99
<i>S. aureus</i>	98,04	99,07	99,99	99,70
<i>C. albicans</i>	99,99	99,99	99,99	99,99
<i>G. vaginalis</i>	-	87,50	99,99	99,99
<i>P. mirabilis</i>	-	96,47	99,99	99,99
<i>P. acnes</i>	99,99	99,99	99,99	99,99
<i>E. faecalis</i>	-	82,77	99,99	99,99
<i>S. epidermidis</i>	-	99,99	99,99	99,99
<i>T. mentagrophytes</i>	73,56	99,99	99,99	99,99

Tabella 4.2: Riduzione della crescita dei ceppi analizzati, espressa in percentuale rispetto al controllo inoculo dopo diversi tempi dal contatto (n=3; replicati=2).

5. CONCLUSIONI

Dai risultati qui riportati ottenuti tramite test *in vitro* si può concludere che, nelle condizioni sperimentali testate:

**IL PRODOTTO OZOILE (ERBAGIL S.r.l.) ALLA CONCENTRAZIONE DI 80%
PORTA AD UNA RIDUZIONE ALTAMENTE SIGNIFICATIVA DELLA CRESCITA DEI
CEPPI ANALIZZATI IN SEGUITO A DIVERSE TEMPISTICHE DI CONTATTO**

Nello specifico, in **Tabella 4.2.** viene riportata la diminuzione della crescita di ogni singolo ceppo analizzato, espressa in percentuale rispetto al controllo di crescita (Ctrl inoculo).

Pavia, 03 agosto 2018


UB-CARE S.r.l.
Spin-off - University of Pavia
Via Riviera n.39 - 27100 - Pavia
C.F./P.IVA 02528550185
info@ub-careitaly.it – www.ub-careitaly.it