

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 | 07/11/2018 |
| REPORT N. | IB/18/EB2P1 |

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. 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. 6 |
| 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. 10 |

1. SOMMARIO

1.1. COMMITTENTE

ERBAGIL S.r.l.

Via L. Settembrini, 13

82037 Telesse Terme (BN)

1.2. CAMPIONE

Nome prodotto: OZOILE

Codice interno: EB2P1

1.3. TEMPISTICHE DELLO STUDIO

Data di arrivo del prodotto: 11/09/2018

Data di emissione del report: 07/11/2018

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>Candida glabrata</i> | 15545 | Tryptone Soya Broth/Sabourad Dextrose Agar |

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 (4-12-24-48-72 h).

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.

Le piastre sono state incubate a 35°C per 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 4-12-24-48-72 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 72-120 h in condizioni di aerobiosi.

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 *Candida glabrata* 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**.

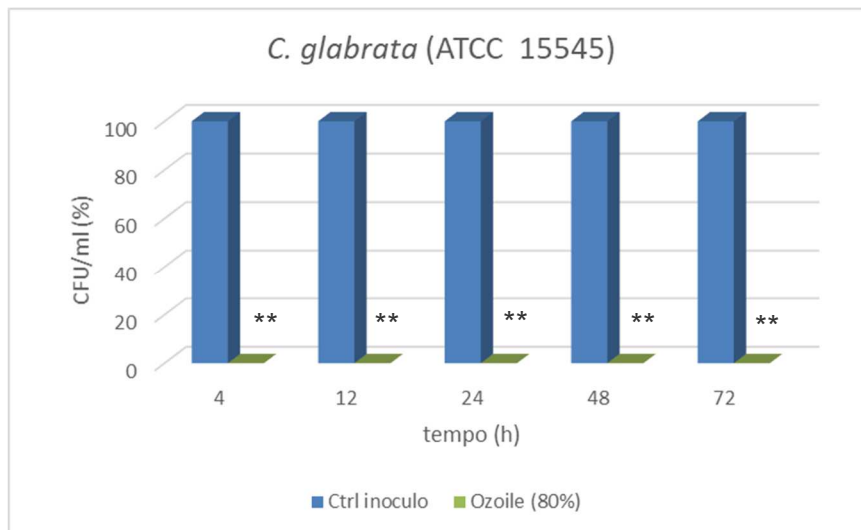


Figura 4.1: Inibizione della crescita di *Candida glabrata* analizzati in assenza (Ctrl inoculo) e presenza (80%) del prodotto Ozoile dopo diversi tempi dal contatto (n=3; replicati=2).

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

| Tempistica (h) | Crescita batterica (%) | | | | | | | | | |
|--------------------|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 4h | | 12h | | 24h | | 48h | | 72h | |
| Campione | Ctrl inoculo | Ozoile (80%) | Ctrl inoculo | Ozoile (80%) | Ctrl inoculo | Ozoile (80%) | Ctrl inoculo | Ozoile (80%) | Ctrl inoculo | Ozoile (80%) |
| C. glabrata | 100 | 0,01±0,00 | 100 | 0,01±0,00 | 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 (%) | | | | |
|--------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 4h | 12h | 24h | 48h | 72h |
| Campione | Ozoile (80%) | Ozoile (80%) | Ozoile (80%) | Ozoile (80%) | Ozoile (80%) |
| C. glabrata | 99,99 | 99,99 | 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
DI *CANDIDA GLABRATA* IN SEGUITO A DIVERSE TEMPISTICHE DI CONTATTO**

Nello specifico, dopo 4h di incubazione con il prodotto, si osserva una riduzione del 99,9% risultata altamente significativa, che viene confermata a tutte le tempistiche analizzate.

Pavia, 07 novembre 2018



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