

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS**  
**DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545  
e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)  
CF 80006480281  
P.IVA 00742430283

Legnaro, 10 ottobre 2016

## **Verifica del processo di abbattimento di cariche microbiche dopo trattamento con ozono prodotto dallo strumento Sany Water Plus fornito dalla ditta Sanity System Italia S.r.l.**

### **Introduzione**

L'ozono è una molecola gassosa dall'alto potere ossidativo, superiore a quello del cloro, che produce a livello cellulare effetti tossici legati alla sua capacità di ossidare e perossidare le biomolecole. La produzione di molecole reattive dell'ossigeno a livello cellulare induce danni a livello lipidico, proteico e del DNA.

Grazie la sua azione ossidante l'ozono può essere usato come disinfettante in diversi ambiti, che possono andare dal trattamento dell'acqua, a quello dell'aria e dell'ambiente, per indurre una drastica riduzione delle cariche microbiche.

### **Scopo del lavoro**

Lo scopo del lavoro è stato di valutare l'efficacia del processo di ozonizzazione di un ambiente, nell'abbattimento della carica microbica di batteri *multidrug-resistant*, precedentemente isolati da animali da compagnia affetti da processi patologici.

### **Materiali e metodi**

#### **Ambiente**

Le prove sono state eseguite in due stanze parallele di uguale forma e dimensione, non sottoposte a ricircolo di aria e in cui non si è svolta alcuna attività durante il periodo di esposizione delle piastre seminate.

La metratura delle stanze era di 18 m<sup>2</sup> e 54 m<sup>3</sup>.

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS**  
**DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545  
e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)  
CF 80006480281  
P.IVA 00742430283

### **Misurazione ozono prodotto**

La concentrazione dell'ozono prodotto nella stanza in cui si è effettuato il trattamento ozonizzante, è stata misurata con apposito strumento "Eco Sensors Model A-21ZX" (Eco Sensor, USA).

### **Prova sperimentale**

L'efficacia del trattamento con ozono è stata valutata seminando delle piastre contenenti terreno di coltura con i microrganismi selezionati. Una parte delle piastre inoculate è stata sottoposta al trattamento di ozonizzazione, un'altra è stata tenuta come controllo negativo. In tal modo si è potuto effettuare un confronto tra la carica batterica ottenuta nelle piastre non sottoposte al trattamento e la carica batterica nelle piastre sottoposte a trattamento.

### **Microrganismi**

Per eseguire la prova sono state preparate aliquote di *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*), *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*), ed *Escherichia coli* (*E. coli*), disciolti in PBS addizionato di glicerolo al 20%. Tali aliquote sono state conservate in congelatore a -20°C fino al momento dell'utilizzo. Dopo lo scongelamento si sono eseguiti 2 cicli di lavaggio in PBS e i microrganismi sono stati risospesi in soluzione fisiologica.

### **Valutazione della carica microbica iniziale (conta a tempo 0)**

Dopo lo scongelamento si è proceduto alla conta dell'inoculo iniziale utilizzando il metodo delle diluizioni scalari. A tal fine si sono effettuate delle diluizioni scalari in base 10 delle varie sospensioni di microrganismi e si è effettuata la semina di 100µl di sospensione delle diverse diluizioni usando il terreno Nutrient Agar (Oxoid). Tutte le determinazioni sono state effettuate in doppio.

Le piastre inoculate sono state poste ad incubare per 24 ore a 37°C.

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS**  
**DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545  
e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)  
CF 80006480281  
P.IVA 00742430283

## **Controllo negativo**

La diluizione scalare preparata è stata usata per seminare in doppio, con la tecnica di spatolamento, delle piastre di Nutrient Agar. Le piastre sono state lasciate esposte all'aria per 90 minuti nella prima stanza di 18 m<sup>2</sup>.

Dopo tale periodo di esposizione le piastre sono state poste ad incubare per 24 ore a 37°C.

## **Trattamento con ozono**

Una serie di piastre allestite con la stessa modalità del controllo negativo sono state poste in un ambiente analogo al precedente (seconda stanza) ed è stato effettuato il trattamento con l'ozono usando lo strumento Sany Water Plus impostato con il programma per ambienti numero 2, corrispondente alla taratura per i 20 m<sup>2</sup>.

Le piastre sono state esposte per il tempo necessario alla conclusione del ciclo corrispondente al programma n° 2 e per un tempo supplementare, per un totale di esposizione di 90 minuti.

Dopo il trattamento le piastre sono state poste ad incubare in termostato a 37°C per 24 ore.

Il trattamento è stato eseguito in concomitanza dell'esposizione ambientale delle piastre del controllo negativo, in modo da avere gli stessi parametri di temperatura ed umidità.

## **Espressione dei risultati**

La semina e l'esposizione alle diverse condizioni delle diluizioni scalari ha permesso di individuare cariche microbiche, espresse in CFU/piastra, contabili.

Nell'esprimere i risultati si è considerato il fattore di diluizione, in modo da poter rapportare le tre conte (relative al tempo 0, al controllo negativo e alle piastre sottoposte a trattamento con ozono) effettuate. Infine, la carica microbica è stata espressa in UFC/ml. La valutazione dell'abbattimento della carica è stata effettuata considerando la differenza in % esistente tra la carica batterica del controllo negativo (100%) e la carica batterica dopo il trattamento ozonizzante.

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS  
DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

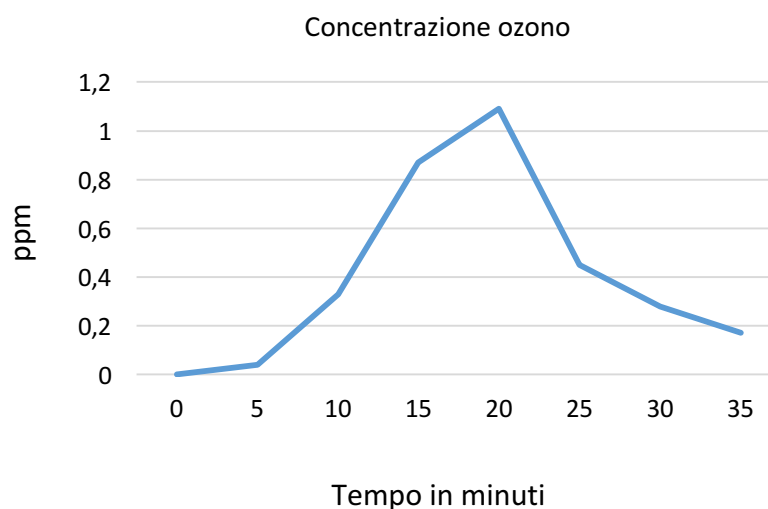
Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545  
e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)  
CF 80006480281  
P.IVA 00742430283

L'efficacia di abbattimento della carica microbica è stata valutata effettuando, per ogni specie microbica presa in considerazione, tre repliche della stessa prova. In tal modo si è potuto valutare la ripetibilità dell'effetto del trattamento.

## Risultati

### Sviluppo di ozono

La stanza adibita alla sperimentazione aveva una metratura pari a 18 m<sup>2</sup> e 54 m<sup>3</sup>. La temperatura della stanza era di 24,7°C. Dopo l'avvio del programma n°2 dello strumento Sany Water Plus la concentrazione di ozono è stata misurata ogni 5 minuti. Il ciclo di trattamento è durato 35 minuti. La misurazione dell'ozono ha permesso di rilevare una concentrazione massima di 1,09 ppm. Il picco di concentrazione di ozono è stato raggiunto dopo 20 minuti e si è mantenuto per circa 2 minuti.



**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS  
DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545

e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)

CF 80006480281

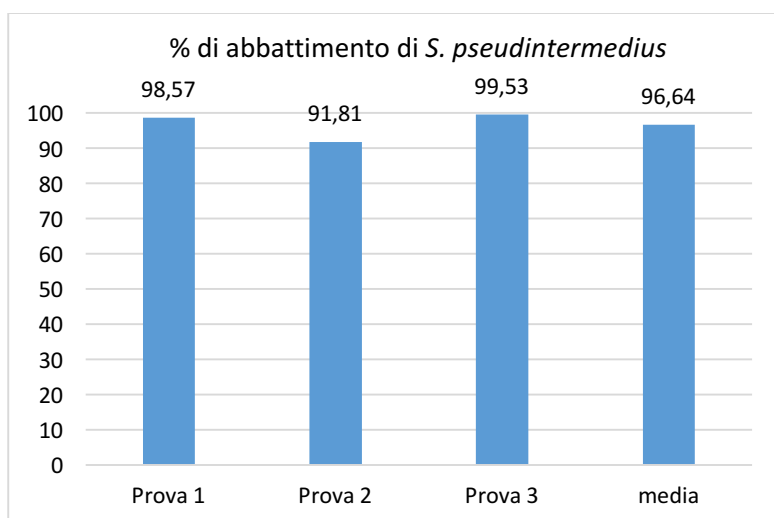
P.IVA 00742430283

## Esiti della prova sperimentale

### *Multidrug resistant Staphylococcus pseudintermedius*

		Conta a tempo 0	Conta controllo negativo	Conta dopo trattamento con ozono	% di abbattimento
	Unità di misura				
Prova n° 1	UFC/ml	1245	930	13,3	98,57
Prova n° 2	UFC/ml	820	765	62,6	91,82
Prova n° 3	UFC/ml	11900	11850	55,8	99,53

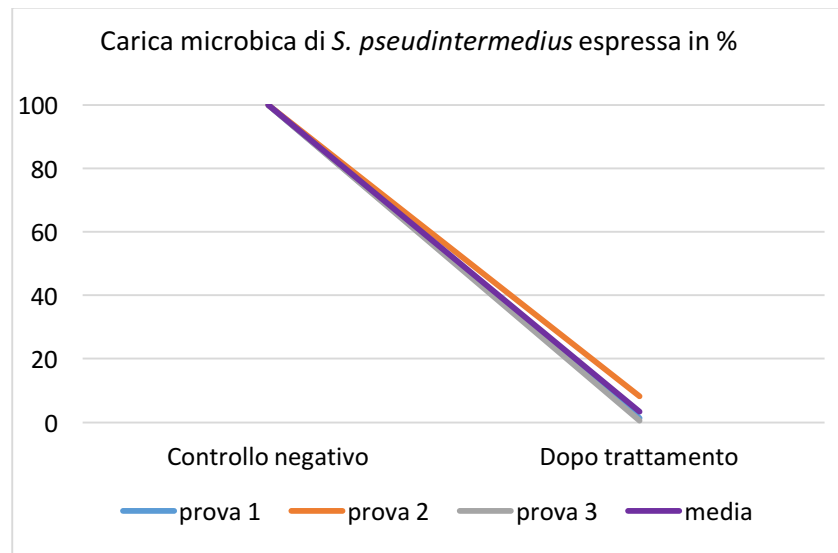
La % di abbattimento è stata calcolata considerando la differenza di carica tra il controllo negativo (100%), non sottoposto a trattamento, e la carica dopo trattamento con ozono.



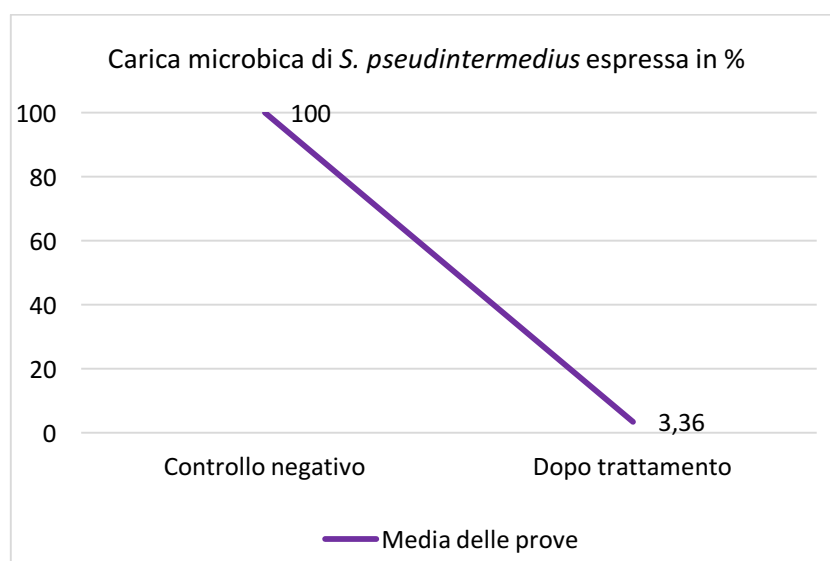
**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS**  
**DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545

e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)  
CF 80006480281  
P.IVA 00742430283



La carica batterica residua di *Staphylococcus pseudintermedius* dopo il trattamento con ozono era dell'1,43% nella prova 1, dell'8,19% nella prova 2 e dello 0,47% nella prova 3, con una media di carica residua del 3,36%.



**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS**  
**DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545

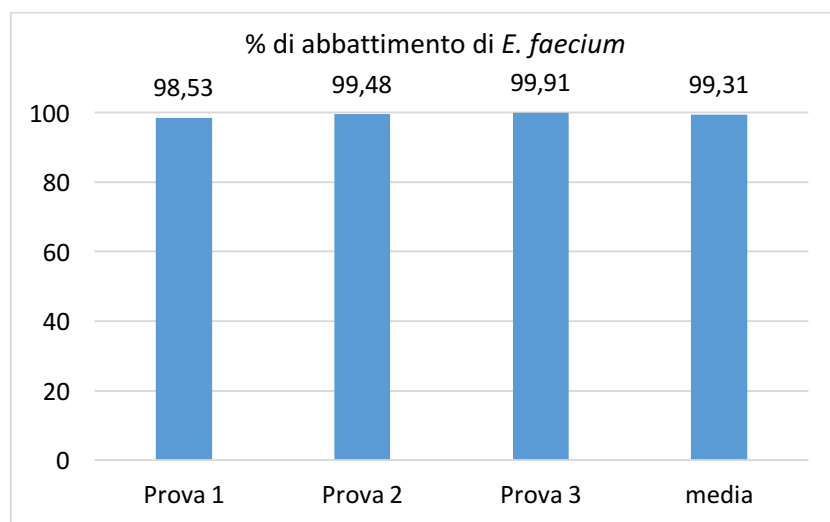
e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)

CF 80006480281

P.IVA 00742430283

### *Multidrug resistant Enterococcus faecium*

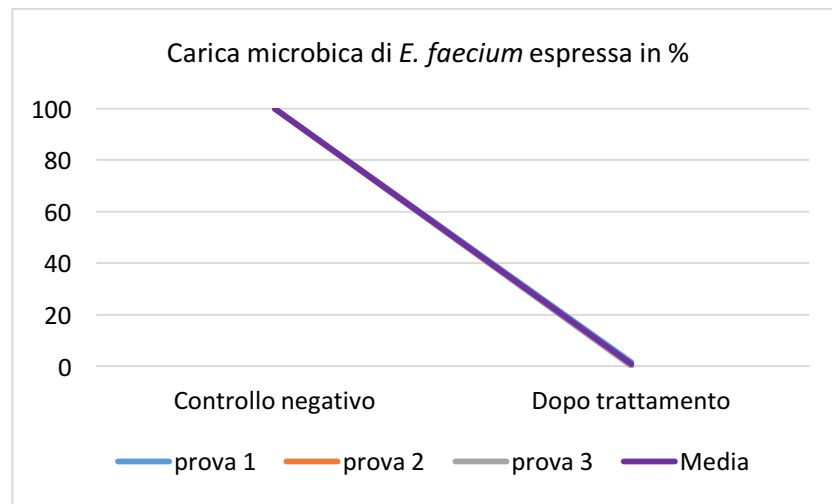
		Conta a tempo 0	Conta controllo negativo	Conta dopo trattamento con ozono	% di abbattimento
	Unità di misura				
Prova n° 1	UFC/ml	4500	2730	40	98,53
Prova n° 2	UFC/ml	15000	12220	63	99,48
Prova n° 3	UFC/ml	13500	11050	10	99,91



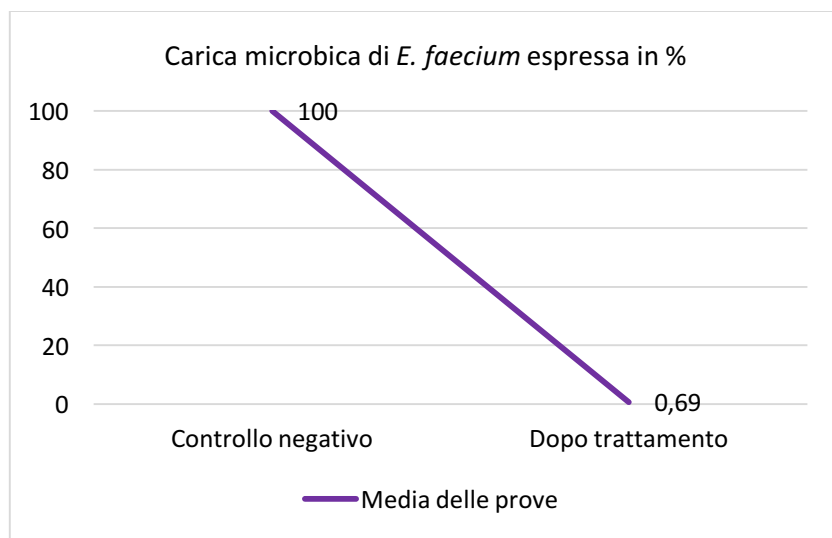
**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS**  
**DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545

e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)  
CF 80006480281  
P.IVA 00742430283



La carica batterica residua di *Enterococcus faecium* dopo il trattamento con ozono era dell'1,47% nella prova 1, dello 0,52% nella prova 2 e dello 0,09% nella prova 3, con una media di carica residua dello 0,69%.





**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS**  
**DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545

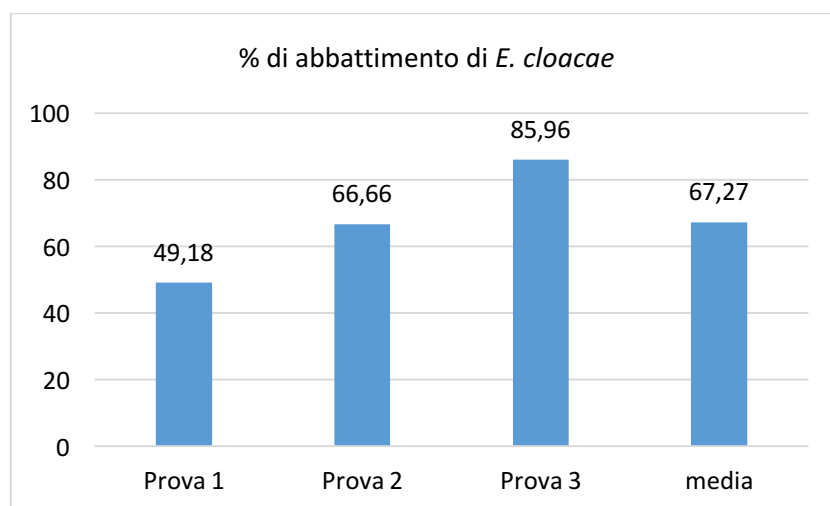
e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)

CF 80006480281

P.IVA 00742430283

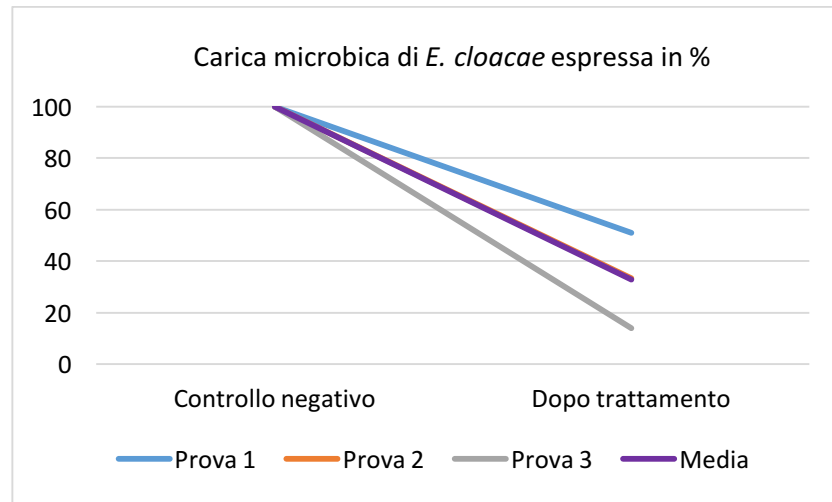
### *Multidrug resistant Enterobacter cloacae*

		Conta a tempo 0	Conta controllo negativo	Conta dopo trattamento con ozono	% di abbattimento
	Unità di misura				
Prova n° 1	UFC/ml	6150	6100	3100	49,18
Prova n° 2	UFC/ml	6650	3375	1125	66,66
Prova n° 3	UFC/ml	84800	68400	9600	85,96

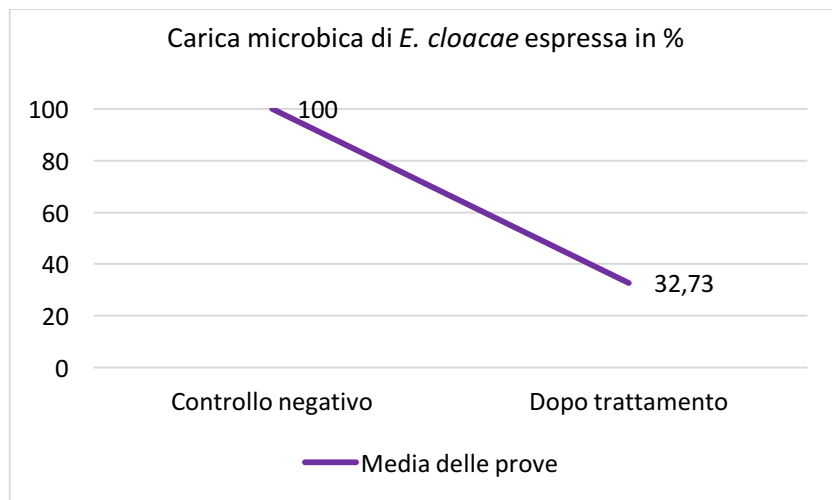


**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS**  
**DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545  
e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)  
CF 80006480281  
P.IVA 00742430283



La carica batterica residua di *Enterobacter cloacae* dopo il trattamento con ozono era del 50,82% nella prova 1, del 33,34% nella prova 2 e del 14,04% nella prova 3, con una media di carica residua del 32,73%.



**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS  
DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545

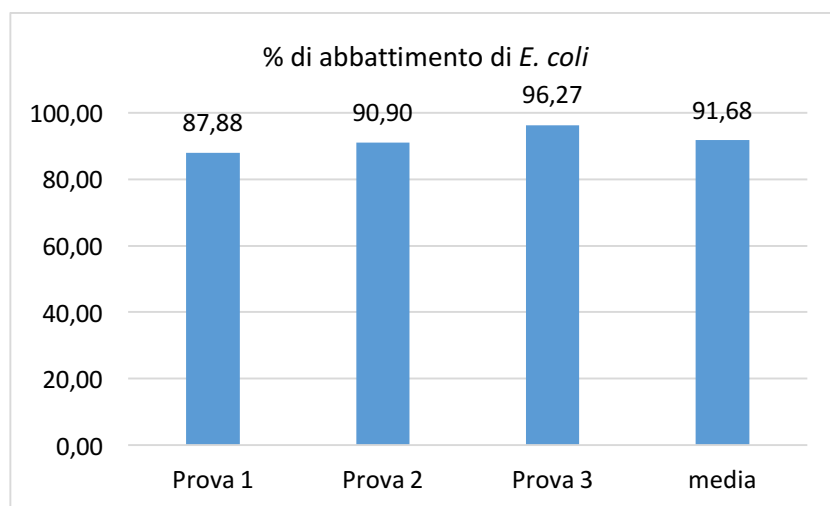
e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)

CF 80006480281

P.IVA 00742430283

## *Escherichia coli*

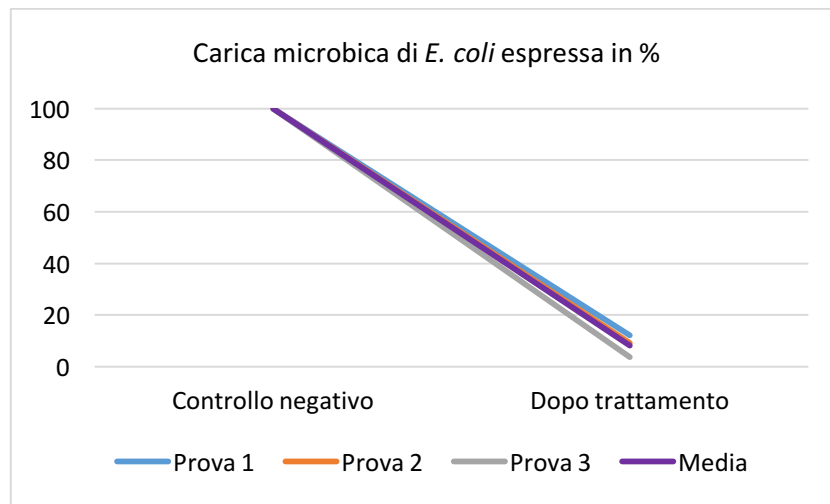
		Conta a tempo 0	Conta controllo negativo	Conta dopo trattamento con ozono	% di abbattimento
	Unità di misura				
Prova n° 1	UFC/ml	6260	6150	745	87,88
Prova n° 2	UFC/ml	7750	7750	705	90,90
Prova n° 3	UFC/ml	3508	3463	129	96,27



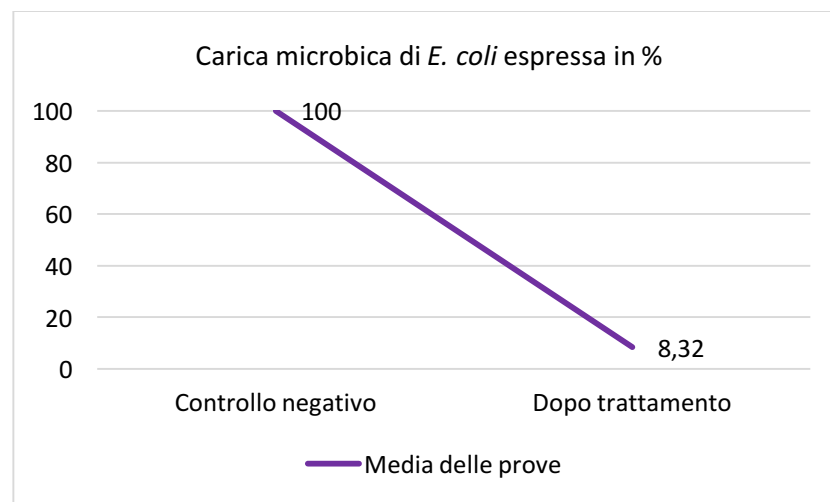
**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS**  
**DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545

e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)  
CF 80006480281  
P.IVA 00742430283



La carica batterica residua di *Escherichia coli* dopo il trattamento con ozono era del 12,12% nella prova 1, dell'9,1% nella prova 2 e del 3,73% nella prova 3, con una media di carica residua dell'8,32%.



## Conclusioni e discussione

L'elevato potere ossidante dell'ozono determina effetti tossici cellulari ascrivibili a danni irreversibili a carico delle componenti lipidiche e proteiche cellulari, che indirettamente portano ad una drastica riduzione della carica microbica in seguito al contatto con l'ozono stesso.

Con questa sperimentazione si è voluto accertare l'efficacia del trattamento con ozono prodotto dallo strumento Sany Water Plus, contro microrganismi dotati di particolare caratteristiche di resistenza e patogenicità. I microrganismi in questione rappresentano una selezione di batteri isolati da animali che avevano contratto l'infezione dopo pratiche cliniche veterinarie. Sono quindi una rappresentanza di quei microrganismi multiresistenti che si possono venire a trovare e selezionare in ambito ambulatoriale od ospedaliero e che rappresentano una delle principali problematiche legate alle infezioni secondarie, sia in ambito veterinario, sia in sanità pubblica.

L'effetto del trattamento ozonizzante si è valutato su 2 microrganismi gram positivi multiresistenti (*Staphylococcus pseudintermedius* ed *Enterococcus faecium*), su un gram negativo multiresistente (*Enterobacter cloacae*) e su un gram negativo che non presentava particolari caratteristiche di resistenza (*Escherichia coli*).

I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare un forte abbattimento delle cariche microbiche con una riduzione della carica media rispettivamente del 96,64% e del 99,31% per *Staphylococcus pseudintermedius* e *Enterococcus faecium* (Gram +), e un abbattimento medio del 67,27% e del 91,68% rispettivamente per *Enterobacter cloacae* ed *Escherichia coli*.

La diversa efficacia del trattamento sulle diverse specie batteriche è in parte imputabile alle differenti caratteristiche costitutive esistenti tra batteri Gram + e Gram -, (Gram – meno sensibili dei Gram+), in parte alle particolari caratteristiche di resistenza di *Enterobacter cloacae*.

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE – MAPS**  
**DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE, PRODUCTION AND HEALTH**

Viale dell'Università, 16  
35020 - Legnaro (PD)  
Direzione: tel. e fax 049-8272592  
Amministrazione: tel. 049-8272560  
fax 049-8272545  
e-mail: [direzione.maps@unipd.it](mailto:direzione.maps@unipd.it)  
CF 80006480281  
P.IVA 00742430283

La produzione di ozono diffuso nell'aria da parte dello strumento Sany Water Plus ha permesso di ottenere una forte azione di abbattimento su microrganismi multiresistenti, che si trovavano in condizioni ideali per la loro crescita (terreno di coltura). Si ritiene pertanto che l'utilizzo dello strumento per la disinfezione ambientale possa rappresentare un valido ausilio per potenziare l'effetto della normale sanificazione e disinfezione degli ambienti, in quanto l'ozono riesce a distribuirsi nell'aria, andando ad agire su eventuali aerosol, sul pulviscolo e su superfici difficilmente raggiungibili durante le normali pratiche di pulizia e disinfezione, permettendo in tal modo l'abbattimento delle cariche microbiche nell'intero ambiente.

Responsabile scientifico  
Dott.ssa Maria Luisa Menandro

