



icf Bulletin

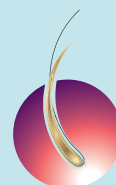
RICERCA SCIENTIFICA E INFORMAZIONE VETERINARIA

Novità dal 32° ESVD 2021

Stabilità della N-acetilcisteina (NAC) con soluzione Tris-EDTA e combinata a desametasone sodio fosfato in soluzione acquosa per 50 giorni

Attività di Tris-NAC® (Tris EDTA + N-acetilcisteina) contro la formazione di biofilm, studio *in vitro*

 **nextmune**



icf
Evoluzione della
conoscenza



icf Bulletin

RICERCA SCIENTIFICA E INFORMAZIONE VETERINARIA

Novità dal 32° ESVD 2021

Stabilità della N-acetilcisteina (NAC) con soluzione Tris-EDTA e combinata a desametasone sodio fosfato in soluzione acquosa per 50 giorni

Attività di Tris-NAC® (Tris EDTA + N-acetilcisteina) contro la formazione di biofilm, studio *in vitro*

Stabilità della N-acetilcisteina (NAC) con soluzione Tris-EDTA e in combinazione con desametasone sodio fosfato in soluzione acquosa per 50 giorni

Milanesi N. et al. Report 32° ESVD 2021

N. MILANESI*, T. DELLA MURA*, G. GHIBAUDO°

*ICF S.r.l., Palazzo Pignano, Italia

° Clinica Veterinaria Malpensa-Anicura, Samarate, Italia

Quando utilizzare miscele "clinical made" per le orecchie

1. Quando ci imbattiamo in organismi multiresistenti multipli, e non sono disponibili alternative autorizzate
2. Quando trattiamo l'otite media e non vi è un farmaco autorizzato
3. Quando vogliamo evitare la multifarmacoterapia e non sono disponibili alternative autorizzate

Fattori da considerare quando si combinano farmaci

1. Conoscenza dell'ototossicità
2. Contaminazione microbica - batteri, funghi, lieviti
3. Temperatura - l'alta temperatura accelera la degradazione del farmaco
4. pH - la maggior parte dei farmaci è stabile a pH 4-8
5. Luce - aumenta l'ossidazione
6. Incompatibilità dei farmaci nelle miscele

Stabilità della N-acetilcisteina (NAC) con soluzione Tris-EDTA e in combinazione con desametasone sodio fosfato in soluzione acquosa per 50 giorni

L'obiettivo di questo studio era valutare:

1. la stabilità della formulazione a base di N-acetilcisteina (NAC) + Tris-EDTA (Tris-NAC®, ICF S.r.l., Palazzo Pignano, Italia)
2. la compatibilità tra Tris-NAC® e desametasone sodio fosfato in soluzione acquosa, formulazione iniettabile da 2 mg/ml (Dexadreson®, MSD Italia S.r.l.) per un periodo di 50 giorni

Materiali e Metodo

Per valutare la compatibilità tra desametasone e Tris-NAC, sono state eseguite titolazioni redox per valutare il contenuto di NAC nelle formulazioni.

Sono stati eseguiti due test:

- 1) valutazione della stabilità del Tris-NAC mescolando 100 ml della formulazione con 5 ml di una soluzione di desametasone sodio fosfato (2 mg/ml); e
 - 2) valutazione della stabilità della formulazione Tris-NAC senza alcuna aggiunta
- Le due formulazioni sono state conservate per **50 giorni a 25 °C e 5 °C** e le titolazioni sono state effettuate ogni 10 giorni per valutare **il contenuto di NAC** nella formulazione e le variazioni di pH
 - In flaconi originali di Tris-NAC (soluzioni protette dalla luce)

Risultati

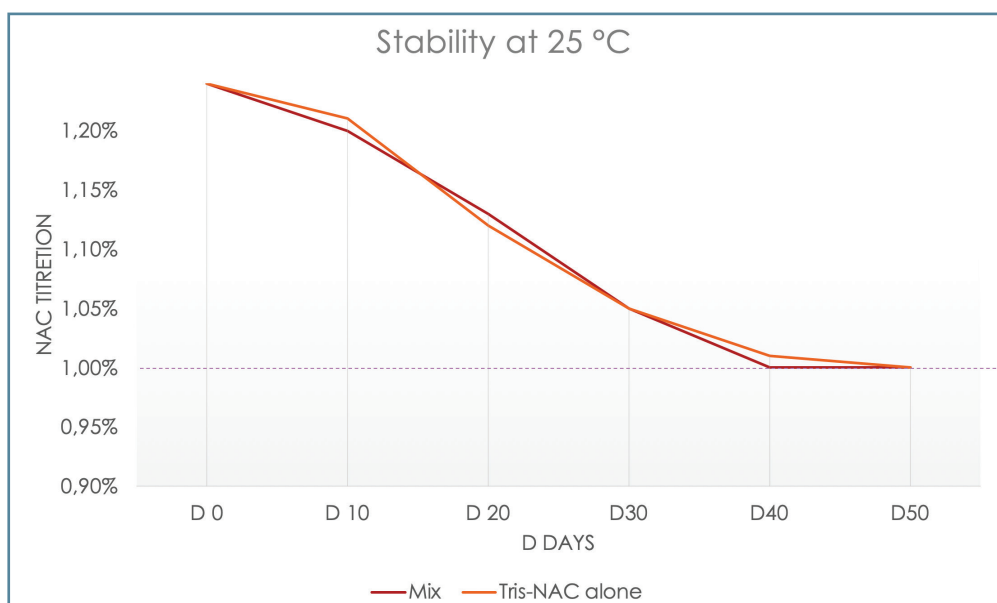
Dati ottenuti - Stabilità - a 25°C

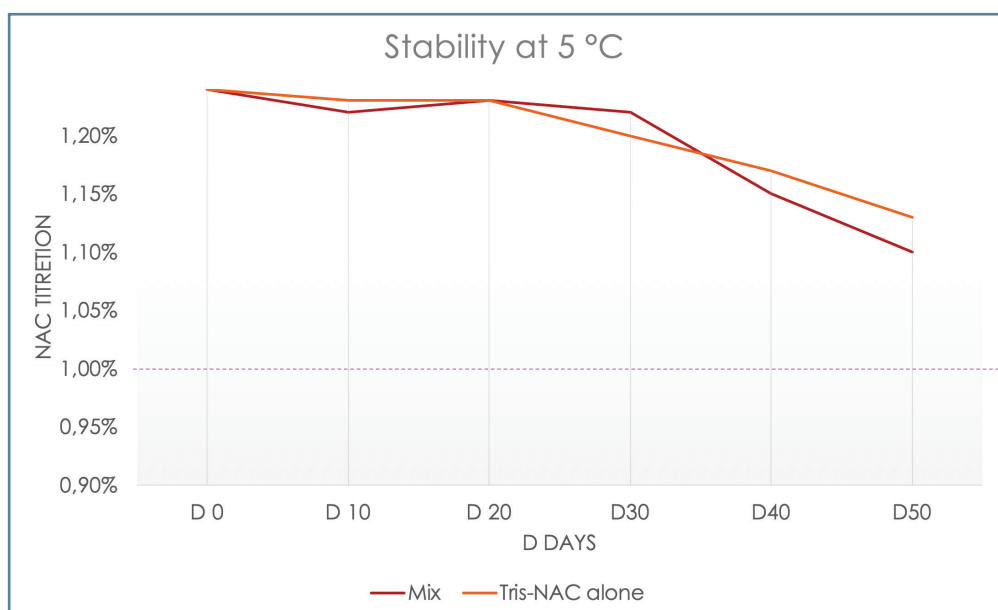
	Time zero 05/05/20	Day 10 15/05/20	Day 20 25/05/20	Day 30 05/06/20	Day 40 15/06/20	Day 50 26/06/20
Appearance	Opaque liquid	Opaque liquid	Opaque liquid	Slightly opaque liquid	Slightly opaque liquid	Slightly opaque liquid
pH	8.06	1: 8.46	1: 8.14	1: 7.99	1: 7.91	1: 7.94
		2: 8.40	2: 8.15	2: 7.98	2: 7.97	2: 7.95
NAC titration	1.24%	1: 1.205%	1: 1.13%	1: 1.05%	1: 1.00%	1: 1.00%
		2: 1.21%	2: 1.12%	2: 1.05%	2: 1.01%	2: 1.00%
Loss of NAC	Tris-NAC+DEX	1: 2.82%	1: 8.87%	1: 15.32%	1: 19.35%	1: 20.97%
	Tris-NAC	2: 2.42%	2: 9.68%	2: 15.32%	2: 18.55%	2: 19.35%

Dati ottenuti - Stabilità - a 5°C

	Time zero 05/05/20	Day 10 15/05/20	Day 20 25/05/20	Day 30 05/06/20	Day 40 15/06/20	Day 50 26/06/20
Appearance	Opaque liquid	Opaque liquid	Opaque liquid	Slightly opaque liquid	Slightly opaque liquid	Slightly opaque liquid
pH	8.06	1: 8.42	1: 8.41	1: 8.19	1: 8.03	1: 8.00
		2: 8.46	2: 8.37	2: 8.10	2: 8.10	2: 8.07
NAC titration	1.24%	1: 1.22%	1: 1.23%	1: 1.22%	1: 1.15%	1: 1.10%
		2: 1.23%	2: 1.23%	2: 1.20%	2: 1.17%	2: 1.13%
Loss of NAC	Tris-NAC+DEX	1: 1.61%	1: 0.81%	1: 1.61%	1: 7.26%	1: 11.29%
	Tris-NAC	2: 0.81%	2: 0.81%	2: 3.23%	2: 5.65%	2: 8.87%

Dati ottenuti - Stabilità - a 25°C





1. I dati ottenuti sperimentalmente sulla titolazione di NAC nelle due formulazioni sono risultati comparabili
 2. Il titolo di NAC rimane superiore all'1,00%* in tutti i gruppi anche dopo 50 giorni
 3. Nessuna variazione significativa del pH è stata osservata, in nessun gruppo
- * $\geq 1,00\%$ è considerato il titolo di NAC con attività antibiofilm

Conclusioni

In conclusione, entrambe le formulazioni, dopo 50 giorni a 25 °C e 5 °C, mantengono il titolo di NAC quasi invariato rispetto al tempo zero

Discussione

Alcuni studi hanno esaminato la stabilità degli antibiotici e dei glucocorticoidi mescolati con detergenti per le orecchie:

- Metry C.A. et al. Determination of enrofloxacin stability and *in vitro* efficacy against *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* in four ear cleaner solutions over a 28-day period. Vet Dermatol. 2011
- Emery C.B. et al. Preliminary study of the stability of dexamethasone when added to commercial veterinary ear cleaners over a 90 day period. Vet Dermatol. 2021

Due concentrazioni (0,1 e 0,25 mg/ml) di desametasone sono state formulate per ogni soluzione detergente da una soluzione di 2 mg/ml e conservate nei flaconi originali dei produttori a due temperature: ambiente (22 °C) e refrigerata (4 °C). I campioni sono stati valutati in triplicato, utilizzando la cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem in 10 punti nel corso di 90 giorni. La soluzione è stata considerata stabile se il valore di desametasone è rimasto $>90\%$ della concentrazione target.

Tutti i valori delle soluzioni di desametasone sono risultati stabili fino a 90 giorni, ad eccezione di due soluzioni per ecA (ketoconazolo 0,15%, Tris-EDTA); la concentrazione di desametasone 0,25 mg/ml è risultata stabile solo a 14 (4 °C) e 21 giorni (22 °C).

¹ Emery C.B. et al. Preliminary study of the stability of dexamethasone when added to commercial veterinary ear cleaners over a 90 day period. Vet Dermatol. 2021

Attività di Tris-NAC[®] (Tris EDTA + N-acetilcisteina) contro la formazione di biofilm, studio *in vitro*

N. MILANESI

1 G. GHIBAUDO 2 **, T. DELLA MURA 1,
1ICFS.r.l., Palazzo Pignano (CR), Italia 2 Clinica Veterinaria Malpensa Anicura,
Samarate (VA), Italia

Un biofilm è un'aggregazione complessa di batteri inclusi in una matrice polimerica autoprodotta composta da polisaccaridi, proteine e DNA batterico e lieviti. I biofilm causano infezioni croniche perché mostrano una maggiore tolleranza ad antibiotici, antimicotici e ai disinfettanti chimici, e una maggiore resistenza alla fagocitosi e ad altri processi del sistema immunitario dell'organismo.

Lo scopo dello studio era valutare l'efficacia di un prodotto a base di N-acetilcisteina + Tris-EDTA (**Tris-NAC[®]** ICF S.r.l., Palazzo Pignano, Italia) nel prevenire la formazione di biofilm e favorirne la disaggregazione.

MATERIALI E METODI

Lo studio dell'inibizione della crescita del biofilm, condotto dal laboratorio Clever Bioscience S.r.l. di Pavia (Italia), è stato valutato utilizzando il test di formazione del biofilm su micropiastre con tre ceppi di microrganismi:

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)

Staphylococcus aureus (ATCC 25923)

Malassezia pachydermatis (DSM 6172).

Gli stessi tre microrganismi sono stati utilizzati per studiare l'azione della formulazione sulla disaggregazione del biofilm. Per questo studio i microrganismi sono stati coltivati in piastre di microtitolazione, e la crescita del biofilm è stata valutata secondo il metodo Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. La crescita e la formazione di biofilm sono state valutate in due momenti diversi

(dopo 8 e 24 ore) per i batteri e in tre tempi diversi per i lieviti (dopo 8, 24 e 48 ore). Inoltre, la formulazione può inibire la formazione di biofilm di tutti e tre i microrganismi. Il test è stato effettuato in triplicato per ottenere risultati affidabili.

• *Pseudomonas aeruginosa*:

Dilutions of ICF product											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
											

Tabella 3. Attività inibitoria del prodotto ICF sulla formazione di biofilm per *Pseudomonas aeruginosa*. Viola/Blu: presenza di biofilm; Trasparente: assenza di biofilm

• *Staphylococcus aureus*:

Dilutions of ICF product											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
											

Tabella 6. Attività inibitoria del prodotto ICF sulla formazione di biofilm per *Staphylococcus aureus*. Viola/Blu: presenza di biofilm; Trasparente: assenza di biofilm

• *Malassezia pachydermatis*:

Dilutions of ICF product											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
											

Tabella 3. Attività inibitoria del prodotto ICF sulla formazione di biofilm per *Pseudomonas aeruginosa*. Viola/Blu: presenza di biofilm; Trasparente: assenza di biofilm

RISULTATI

I dati evidenziano che Tris-NAC[®] può disgregare il biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* sia a 8 ore che a 24 ore; il biofilm di *Staphylococcus aureus* a 24 ore (in questo caso, a 8 ore il biofilm era ancora assente); e non è stato in grado di disgregare completamente il biofilm di *Malassezia pachydermatis* a 48 ore (a 8 e 24 ore il biofilm era assente). Tuttavia, la formulazione può *inibire la formazione di biofilm* di tutti e tre i microrganismi.



• *Pseudomonas aeruginosa*:

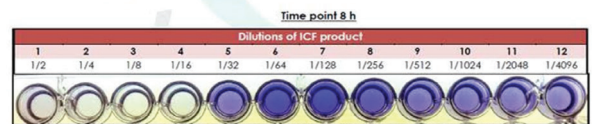


Table 3. Curative activity of ICF product after 8 h of *Pseudomonas aeruginosa* growth. Violet/blue well: presence of biofilm; Clear well: absence of biofilm.

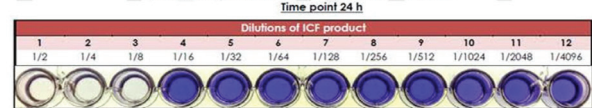


Table 5. Curative activity of ICF product after 24 h of *Pseudomonas aeruginosa* growth. Violet/blue well: presence of biofilm; Clear well: absence of biofilm.

• *Staphylococcus aureus*:



Table 8. Curative activity of ICF product after 24 h of *Staphylococcus aureus* growth. Violet/blue well: presence of biofilm; Clear well: absence of biofilm.

• *Malassezia pachydermatis*:

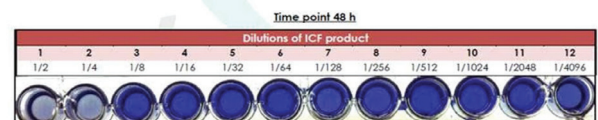


Table 11. Curative activity of ICF product after 48 h of *Malassezia pachydermatis* growth. Violet/blue well: presence of biofilm; Clear/blue well: partial disaggregation of biofilm.

CONCLUSIONI

L'uso di prodotti topici come Tris-NAC[®] per prevenire la formazione del biofilm microbico rappresenta la prevenzione primaria nella gestione delle infezioni della cute e dell'orecchio in cani e gatti. La sua elevata capacità nella disgregazione del biofilm rende il prodotto utile anche come terapia combinata con altri antimicrobici topici per trattare le patologie ed evitarne la cronicità ed eventuali recidive.

