

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102022000000689</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>18/01/2022</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>20/10/2021</b>

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	Q	1	04
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	33	52
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	136
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	352
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	5415
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	17	02
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	31	04

Titolo

IMPIEGO DI COLORANTI NELL'IDENTIFICAZIONE SELETTIVA DI SITI INFETTI NELLE INFEZIONI BIOFILM CORRELATE

## BREVETTO PER MODELLO DI UTILITA'

**A NOME DI:** Giovanni Balato, di nazionalità italiana e domiciliato in via Arrigo Boito 8b, 81030, Lusciano (CE), a  
5 nome di Oreste Tarallo di nazionalità italiana e domiciliato in via Torrebianca 29, 81031, Aversa (CE), ed a nome di Marco Balato, di nazionalità italiana e domiciliato in via Torrebianca 29, 81031, Aversa (CE), domiciliati ad effetto di legge presso Marco Balato, via Torrebianca 29, 81031, Aversa  
10 (CE).

**TITOLO:** IMPIEGO DI COLORANTI NELL'IDENTIFICAZIONE SELETTIVA DI SITI INFETTI NELLE INFEZIONI BIOFILM CORRELATE

15 **INVENTORI:** Giovanni Balato, Oreste Tarallo, Marco Balato, Giuseppina Roviello, Valentina Roviello, Vincenzo de Matteo.

20

## DESCRIZIONE

### 1-CAMPO TECNICO

La presente invenzione riguarda l'impiego di coloranti, loro miscele e complessi metallici da essi ottenuti, in forma di  
5 soluzione, sospensione, emulsione o spray, per l'identificazione selettiva di siti infetti nel corso del trattamento chirurgico di osteomieliti, infezioni di cute e tessuti molli ed infezioni peri-protetiche e dei mezzi di sintesi.

10

### 2-STATO DELL'ARTE

La quasi totalità delle infezioni microbiche nel corpo umano sono correlate alla formazione di biofilm che contribuisce, in maniera significativa, alla morbilità e mortalità,  
15 specialmente in ambiente ospedaliero [Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov. 2003; 2:114-122]. Molte di queste, sono infezioni correlate all'uso di dispositivi medici come cateteri venosi centrali, cateteri urinari, valvole cardiache, protesi articolari, dispositivi intrauterini, lenti a contatto,  
20 protesi dentarie acriliche, sulla cui superficie possono aderire popolazioni microbiche. In particolare, le infezioni peri-protetiche come quelle dei mezzi di sintesi rappresentano una delle più grandi sfide dal punto di vista diagnostico,

chirurgico e di gestione post-operatoria nel campo dell'ortopedia, poiché esse sono molto spesso associate a morbilità elevata, necessità di prolungare il ricovero ospedaliero e, quindi, ad un aumento dei costi assistenziali.

5 Tipicamente, l'incidenza di tale complicanza varia dallo 0.5% al 2% di tutti gli interventi di sostituzione protesica [Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, Ong K, Chiu V, Vail TP, Rubash HE, Berry DJ (2010) The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States. Clin Orthop Relat Res 468:45-51; Bozic  
10 KJ, Kurtz SM, Lau E, Ong K, Vail TP, Berry DJ (2009) The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the United States. J Bone Joint Surg Am 91:128-133]. Diversa è l'incidenza delle infezioni associate ai dispositivi per osteosintesi (chiodi endomidollari, placche, viti, fili, perni di  
15 fissazione transcutanei) che varia da 1-2% per fratture chiuse a oltre il 30% per quelle esposte.

Indipendentemente dall'incidenza, la difficile gestione terapeutica dei pazienti affetti da questa grave complicanza è correlata al fatto che le infezioni biofilm correlate sono  
20 infezioni che interessano il device (impianto protesico o mezzi di sintesi), i tessuti molli peri-implantari inclusa la cute ed infine l'osso (osteomielite). I batteri che raggiungono il sito chirurgico possono legarsi a diverse molecole, tra le quali il fibrinogeno, nonché proteine della matrice  
25 extracellulare (fibronectina e laminina) e

glicosamminoglicani. Queste proteine non solo permettono una colonizzazione superficiale, ma sono anche responsabili di una riduzione dei meccanismi di difesa locali. Una volta aderiti, i batteri si moltiplicano formando delle macrocolonie e successivamente producono una matrice extracellulare (slime). Il biofilm rappresenta una struttura all'interno della quale i batteri e i miceti aumentano la propria resistenza nei confronti del sistema immunitario dell'ospite e degli agenti antimicrobici. Per tali ragioni, la terapia antibiotica, purtroppo, non riesce spesso a eradicare ed eliminare completamente il biofilm ed è per tale ragione che le infezioni da batteri produttori di biofilm si presentano in modo ricorrente e subdolo, rendendo necessari cicli di terapia antibiotica adeguati associati alla terapia chirurgica che richiede un accurato debridment e la rimozione dell'impianto protesico o dei mezzi di sintesi se trattasi di fratture.

I principali agenti patogeni responsabili delle infezioni protesiche, ad esempio ma non solo per gli interventi su anca e ginocchio, sono elencati in tabella 1, TAVOLA I.

#### **Batteri e tecniche di rivelazione**

I batteri costituiscono l'ecosistema microbico dentro e intorno al nostro corpo.

La loro classificazione è principalmente basata sulle differenze nella composizione cellulare, nel metabolismo e  
5 nella struttura cellulare.

Ad oggi, i metodi utilizzati per la loro identificazione e classificazione comportano tipicamente fasi di pre-arricchimento, arricchimento selettivo, screening biochimico e conferma sierologica. Questi metodi sono certamente  
10 selettivi e specifici, ma, poiché si basano su una serie di passaggi di arricchimento, i risultati sono spesso difficili da interpretare e non disponibili nella scala temporale desiderata per l'adozione di misure correttive rapide. Ad esempio, metodi quali approcci di analisi genetica, come PCR  
15 (reazione a catena della polimerasi), FISH (ibridazione fluorescente in situ), e NGS (Next Generation Sequencing (NGS) o sequenziamento in parallelo) sono potenti tecniche per l'identificazione dei batteri ma, a causa del grande lavoro preparatorio e dell'enorme mole di dati necessari per  
20 un'analisi approfondita, sono metodi spesso inappropriati nella diagnosi clinica, che richiede invece rapidità se non addirittura un monitoraggio in situ e in tempo reale.

I metodi per l'identificazione batterica oggi comunemente usati sono inoltre tipicamente caratterizzati da scarsa  
25 sensibilità, e il rilevamento rapido di un numero di cellule

limitato (<10 CFU/mL) è una sfida ancora aperta. Tra le metodiche diagnostiche che prevedono l'utilizzo di coloranti ricordiamo:

Colorazione di Gram: La colorazione di Gram è la tecnica standard per la classificazione batterica. Essa si basa sulle diverse proprietà fisiche della struttura della parete cellulare batterica. È una tecnica piuttosto consolidata ed affidabile ed è stata applicata alle varie forme di campioni batterici, in coltura e nei tessuti infetti.

Tuttavia, la colorazione di Gram richiede diversi passaggi, ed in particolare la fissazione della cellula batterica, due passaggi di colorazione con due coloranti diversi, una fase finale di decolorazione e lavaggio. Dalla complessità del metodo derivano alcune limitazioni intrinseche della tecnica: la fase di decolorazione, ad esempio, genera spesso una falsa determinazione del Gram mentre la fase di lavaggio può causare una significativa perdita cellulare.

Saggio mediante utilizzo del cristal violetto (CV): la colorazione utilizzando il cristal violetto (CV) è uno dei primi metodi adottati per la quantificazione della biomassa del biofilm batterico [Christensen G D, Simpson WA, Younger JJ et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 1985; 2: 996- 1006; Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B,

Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods 2000; 40: 175-9]. Questo metodo consiste nella colorazione di molecole con carica negativa mediante l'utilizzo di cloruro di esametilpararosanilina (CV). I limiti di questo metodo sono in relazione alla scarsa riproducibilità, correlata alla crescita del biofilm, alla natura specifica e alla concentrazione del solvente utilizzato e ai tempi di eluizione. Inoltre, poiché sia le cellule viventi che quelle morte, così come la matrice del biofilm sono colorate con CV, questo metodo non fornisce informazioni su il numero effettivo di batteri viventi e pertanto è scarsamente adatto per la valutazione dell'efficacia anti-biofilm di sostanze antimicrobiche.

Saggio mediante utilizzo del 1,9-dimetil blu di metilene (DMMB): questo metodo è basato sulla considerazione che il colorante cationico DMMB rileva l'adesina polisaccaridica intercellulare (PIA) che rappresenta uno dei principali costituenti della matrice extracellulare che compone il biofilm dello S. aureus. Questo metodo è facile da eseguire, economico e richiede poco tempo di esecuzione. La principale limitazione sembra essere quello che è limitato all'identificazione di quelle poche specie batteriche come lo stafilococco aureo in cui tale molecola sia presente nella matrice del biofilm.



Saggio mediante utilizzo della fluorescina-di-acetato (FDA): questa tecnica prevede l'utilizzo della fluorescina-di-acetato (FDA), che rappresenta un colorante solubile e per tali ragioni oltrepassa la membrana cellulare. Dopo assorbimento batterico, la FDA è idrolizzata dall'esterasi batterica producendo la fluorescina che emette una fluorescenza di colore giallo il cui segnale può essere quantificato mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro. Sebbene questo metodo sia facile da eseguire e poco costoso, non è ampiamente utilizzato in quanto non è particolarmente adatto per studi quantitativi su biofilm maturo, producendo solo risultati semiquantitativi [Honraet K, Goetghebeur E, Nelis HJ. Comparison of three assays for the quantification of Candida biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. J Microbiol Methods 2005; 63: 287-95].

15

Saggio mediante utilizzo di colorante Live/Dead: Questo metodo si basa sull'uso di due diversi coloranti di acidi nucleici che differiscono nella loro capacità di penetrare le cellule batteriche. Il primo colorante "SYTO 9 green fluorescent nucleic acid stain" è un prodotto commerciale in grado di attraversare tutte le membrane batteriche e legarsi al DNA sia Gram-positivi e batteri gram-negativi. Il secondo colorante è di colore rosso fluorescente (propidio-ioduro) che attraversa le membrane batteriche danneggiate. In tal modo i batteri con membrana plasmatica integra (identificati come vitali),

25

colorati con SYTO 9, emettono fluorescenza verde, mentre quelli con membrana danneggiata, colorati con PI, risultano colorati in rosso.

5 Recentemente, anche diversi antibiotici-derivati sono stati segnalati come nuove sonde batteriche, ma la loro attività biologica può interferire con la funzione batterica insieme al potenziale problema della resistenza antimicrobica.

Una sonda ideale dovrebbe essere selettiva per tutti i batteri  
10 Gram-positivi e Gram-negativi senza alcuna interferenza biologica e non dovrebbe richiedere alcuna fase di lavaggio o decolorazione per evitare complicazioni nella gestione del campione e nell'analisi dei dati.

Allo stesso modo, negli ultimi anni si è assistito ad un  
15 drammatico aumento di batteri resistenti negli ospedali e nelle strutture sanitarie in genere, dovuti all'uso eccessivo di antibiotici e ad una pulizia non scrupolosa, non efficace o non adeguata dovuta anche alla mancanza di un test rapido e poco costoso per verificare l'effettiva sanificazione delle  
20 superfici e/o delle apparecchiature e strumenti utilizzati.

Anche nel settore della trasformazione alimentare infine il rilevamento di livelli dannosi di microbi è molto importante per assicurare la qualità del prodotto al consumatore finale. Anche in questo caso, al fine di garantire la sicurezza  
25 dell'approvvigionamento alimentare, il monitoraggio veloce ed

economico dei livelli di microbi nell'industria della trasformazione alimentare è fondamentale.

### **Coloranti e le nanoparticelle metalliche**

5 I coloranti sono molecole organiche caratterizzate dalla presenza di un gruppo, detto cromoforo, che conferisce al colorante le caratteristiche proprietà di assorbimento della luce. I cromofori sono in genere rappresentati da anelli aromatici e/o catene di atomi di carbonio legati da doppi  
10 legami, tra di loro coniugati, in modo da garantire una delocalizzazione di elettroni. La posizione e la composizione degli atomi o dei gruppi di atomi influenzano la colorazione del cromoforo e caratterizzano ciascuna classe di coloranti. Esempi di classi di coloranti comprendono

15 i) I carotenoidi che hanno una colorazione variabile tra il giallo e il rosso, quali il carotene, il retinolo, la vitamina A, la zeaxantina;

ii) i chinoni, il cui colore va dal giallo al rosso-violetto, quali l'acido carminico, estratto dalle cocciniglie, che trova  
20 applicazione come colorante tessile;

iii) i coloranti tetrapirrolici, caratterizzati da variabili dal rosso al blu-verde e che comprendono, fra l'altro, la clorofilla, l'emoglobina, i pigmenti della catena respiratoria e la vitamina B12;

iv) i coloranti piranici, dalla colorazione variabile; tra essi sono compresi gli antociani, blu-rosso violacei, responsabili del colore di molti fiori e frutti; i flavoni, variabili dall'arancio al giallo, che nelle piante assorbono selettivamente alcune lunghezze d'onda importanti per la fotosintesi, mentre riflettono la luce ultravioletta dannosa per le cellule.

Molti coloranti, quali fucsina, eosina, blu di metilene, blu di anilina, esplicano importanti attività biochimiche. Tra queste, risulta di particolare interesse l'impiego di tali molecole come agenti antimicrobici o per il rilevamento di batteri.

Caratteristica importante di molti coloranti è quella di coordinarsi facilmente a metalli di transizione, mediante un tipo di legame, particolarmente stabile, denominato legame di coordinazione. L'instaurarsi di tale legame conferisce spesso proprietà ottiche nuove ed interessanti da un punto di vista tecnologico ai relativi complessi metallici, che pertanto possono essere utilmente adoperati anche nella diagnostica chimica, in luogo o in aggiunta ai coloranti da cui essi derivano.

Le nanoparticelle di metalli o di composti inorganici sono note oramai da molti anni. Una nanoparticella è una particella di dimensioni comprese nel range 1-100 nm. Essa presenta

peculiari proprietà, non riscontrabili nel corrispondente materiale bulk, né in particelle aventi la stessa composizione ma caratterizzate da dimensioni maggiori.

La struttura superficiale atipica, il rapporto molto elevato  
5 tra area superficiale e volume e la conseguente maggiore reattività, rendono tali particelle utili in molte applicazioni commerciali. In particolare, le nanoparticelle caratterizzate da un diametro inferiore a  $\sim 30$  nm sono caratterizzate da un'elevata energia superficiale e sono  
10 termodinamicamente instabili. In tali casi sono stati infatti osservati cambiamenti cristallografici come l'espansione o la contrazione del reticolo, un cambiamento nella morfologia, la comparsa di difetti o il riarrangiamento degli atomi sulla superficie nel tentativo di ridurre l'energia superficiale  
15 delle particelle instabili.

Anche alcune proprietà fisiche delle nanoparticelle, come le loro proprietà elettriche, la temperatura di Curie, o la temperatura di fusione, possono dipendere dalle loro dimensioni e forma.

20 Di particolare interesse è la capacità delle nanoparticelle di agire come sonde fluorescenti per la biologia ed il fatto che nanoparticelle di oro, argento e rame mostrano una risonanza plasmonica di superficie nella regione visibile dello spettro elettromagnetico, che dà origine a materiali intensamente  
25 colorati e che alterano il loro colore con la direzione di

osservazione. Questo è un fenomeno noto fin dall'antichità, quando i romani producevano oggetti in vetro come la tazza di Licurgo, che conteneva nanoparticelle di Ag/Au, e che rendevano l'oggetto rosso o verde a seconda che questo fosse osservato  
5 in luce trasmessa o riflessa.

La risonanza plasmonica di superficie (SPR) è un fenomeno alla base di molti strumenti per la misurazione dell'adsorbimento di materiale su superfici metalliche planari (in genere oro e argento) o su superfici di nanoparticelle di metallo, ed è il  
10 principio di funzionamento di molti biosensori basati sul colore.

La SPR delle nanoparticelle dipende fortemente dalle loro dimensioni e forma. Pertanto, ad esempio, il colore di un colloide d'oro può dare un'idea precisa della dimensione delle  
15 nanoparticelle che contiene.

La SPR di una nanoparticella è anche molto sensibile alla natura delle molecole eventualmente coordinate al metallo. Pertanto, cromofori covalentemente legati alla superficie delle nanoparticelle possono agire come semplici sensori  
20 chimici.

### **Sintesi di nanoparticelle di metalli nobili**

Le vie di sintesi per ottenere nanoparticelle di oro e argento sono molteplici, e la letteratura scientifica a riguardo è  
25 molto ricca. Tra le molteplici strategie sintetiche possono

essere individuate due categorie generali: approcci top-down o bottom-up.

I metodi top-down includono litografia e fotolitografia a fascio di elettroni. Tali metodi risentono dell'obbligo di  
5 rimuovere grandi quantità di materiale che viene quindi sprecato. Inoltre, impongono limiti rigidi sulla dimensione delle nanostrutture che possono essere generate, poiché la fotolitografia è vincolata dal limite di diffrazione dei laser disponibili. La tecnologia attuale consente di generare  
10 funzionalità nell'intervallo 20-100 nm, ma è comunque in costante miglioramento. Le tecniche bottom-up hanno suscitato maggiore interesse poiché sono più versatili e richiedono apparecchiature meno specialistiche. L'approccio generale consiste nell'utilizzare un agente riducente per ridurre gli  
15 ioni metallici in soluzione, determinando dunque l'organizzazione degli atomi in nanostrutture. Le tecniche in quest'area sono molte e varie, tra cui il "templating", riduzioni chimiche, elettro- fotochimiche e termiche. I metodi bottom-up consentono di fabbricare nanostrutture molto piccole  
20 (da 1 nm) ma necessitano di un agente di arresto per fermare la crescita delle particelle nel punto desiderato. I metodi bottom-up consentono un ottimo controllo della forma e delle dimensioni delle nanoparticelle prodotte, attraverso un controllo stringente dei parametri di reazione come tempo,  
25 temperatura, natura dell'agente riducente e molecole di

arresto. Sebbene la maggior parte delle nanoparticelle ottenute mediante tali tecniche siano sferiche, diverse condizioni e metodi di reazione hanno prodotto nanoparticelle in forma di fili, tubi, prismi, o tetraedri. Un aspetto  
5 negativo delle tecniche bottom-up è l'estrema variabilità delle nanoparticelle sintetizzate, a causa dell'estrema sensibilità alle fluttuazioni di temperatura, pH, tempo ecc.

### *Interazione dei coloranti cationici e anionici con 10 nanoparticelle in oro e argento*

Le nanoparticelle di metalli nobili non solo mostrano una serie di proprietà chimico-fisiche piuttosto uniche, ma hanno anche la capacità di influenzare le proprietà delle molecole a cui possono essere coordinate. Ad esempio, l'aggiunta di un  
15 colorante a nanoparticelle di argento comporta una rilevante modifica dello spettro UV-VIS rispetto a quello del colorante puro.

La letteratura scientifica ha ampiamente dimostrato che la coordinazione di coloranti con nanomateriali può creare  
20 potenti agenti antimicrobici che possono essere utilizzati per scopi medici, sia in terapia fotodinamica che come superfici antimicrobiche.

Gli agenti antimicrobici attivati dalla luce, come il blu di toluidina O (TBO), sono efficaci su una vasta gamma di batteri  
25 tra cui *Staphylococcus Aureus* resistente alla meticillina



(MRSA). Questi reagenti funzionano producendo radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno quando attivati mediante luce bianca o laser. I radicali sono responsabili della distruzione dei batteri attraverso un meccanismo multi-obiettivo (a  
5 differenza degli antibiotici che, al contrario, sono molto specifici) e questo dovrebbe ridurre al minimo lo sviluppo della resistenza acquisita. Questi nuovi sistemi sono particolarmente utili per le infezioni topiche, come le ferite e nella cavità orale, e per questo, negli ultimi anni, sono  
10 stati al centro di un intenso interesse scientifico.

Di grande interesse risultano essere le nanoparticelle d'oro solubili in acqua, funzionalizzate con tiolato. Uno dei metodi di sintesi, il metodo Brust, risulta particolarmente  
interessante dal momento che consente un controllo sulla  
15 dimensione delle particelle, la loro dispersione e l'efficacia della funzionalizzazione di superficie ed inoltre consente di ottenere nanoparticelle funzionalizzate con proprietà ottiche e catalitiche dipendenti dalla dimensione. Inoltre, tali nanoparticelle risultano essere stabili all'aria, e si  
20 conservano a lungo termine in solventi, miscibili con l'acqua, anche a temperature elevate e concentrazioni estreme.

Le nanoparticelle d'oro funzionalizzate hanno trovato molteplici applicazioni nel settore della biochimica, poiché è possibile modificarle con metodi semplici per adattarle  
25 meglio ai sistemi biologici attraverso la modifica del loro

strato superficiale per una maggiore solubilità acquosa e biocompatibilità.

## **Tecniche spettroscopiche per l'identificazione dei coloranti e loro complessi**

La Spettroscopia Raman amplificata da superfici (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS), è una tecnica che consente di incrementare la sensibilità della spettroscopia Raman di un fattore che può arrivare fino a  $10^{14}$ -  $10^{15}$ . Tale sensibilità è quindi sufficiente per consentire anche il rilevamento di singole molecole. La spettroscopia SERS è quindi interessante per l'analisi di materiali in tracce, la citometria a flusso e altre applicazioni in cui sono necessarie velocità di analisi ed elevata sensibilità.

Il fenomeno SERS ha luogo su una superficie metallica che presenta rugosità su scala nanometrica ed è quindi utile per il rilevamento e analisi delle molecole adsorbite su quella superficie. I metalli tipici utilizzati per creare le superfici attive al SERS sono l'oro o l'argento: la preparazione della superficie può avvenire mediante irruvidimento elettrochimico, rivestimento metallico di un substrato nanostrutturato o deposizione di nanoparticelle metalliche (spesso in forma colloidale).

I substrati SERS possono essere utilizzati per rilevare la presenza di biomolecole a bassa concentrazione: di particolare

interesse è lo sviluppo di tag SERS per l'individuazione del cancro, nonché di anticorpi marcati SERS negli immunodosaggi SERS per la localizzazione delle proteine nel plasma/siero o nei tessuti del sangue. La capacità di analizzare la  
5 composizione di una miscela su nanoscala rende l'utilizzo dei substrati SERS vantaggioso anche per analisi ambientale, per i prodotti farmaceutici, per la scienza dei materiali e quella forense e la rilevazione di singole cellule. L'applicazione di tecniche SERS alla diagnostica biochimica e alla futura  
10 implementazione in una pratica clinica è quindi una tecnica piuttosto consolidata ma che al contempo riserva ampi margini di sviluppo [S. Uskoković-Marković et al. in Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition), 2017]

15

### **Trattamento chirurgico delle infezioni correlate al biofilm**

Una volta instauratosi il processo settico, le possibilità di trattamento sono molteplici. Nei casi d'infezione cronica il  
20 trattamento chirurgico prevede la rimozione dell'impianto associato ad accurato debridement. Per quanto concerne le infezioni peri-protetiche articolari il trattamento chirurgico più efficace è rappresentato dall'impianto di uno spaziatore in cemento antibiotato che ha lo scopo di bonificare il sito  
25 infetto in previsione di un successivo intervento di (tecnica

two-stage) [Gomez MM, Tan TL, Manrique J, Deirmengian GK, Parvizi J. The Fate of Spacers in the Treatment of Periprosthetic Joint Infection.]. Nonostante il ruolo del debridement accurato di tutto il tessuto infetto e necrotico rivesta un ruolo chiave nel trattamento di un'infezione [Insall JN, Thompson FM, Brause BD. Two-stage reimplantation for the salvage of infected total knee arthroplasty. J Bone Joint Surg Am. 2002 Mar;84(3):490. Shaw JD, Miller S, Plourde A, Shaw DL, Wustrack R, Hansen EN. Methylene Blue Guided Debridement as an Intraoperative Adjunct for the Surgical Treatment of Periprosthetic Joint Infection J Arthroplasty. 2017 Dec;32(12):3718-3723.], la valutazione dei margini di resezione tra tessuto sano e patologico risulta alquanto complessa e spesso affidata all'esperienza del chirurgo con l'aumentato rischio sia di rimozione inavvertita del tessuto sano che di mancata rimozione di tutto il tessuto patologico.

### **3-DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE**

La finalità del presente modello di utilità è quella di estendere l'impiego di coloranti, miscele e loro complessi nanometrici, già ampiamente descritti nella letteratura scientifica e brevettuale, all'identificazione selettiva dei siti infetti nel corso del trattamento chirurgico di osteomieliti ed infezioni peri-protesi in sede operatoria,

con accurata identificazione del margine di resezione tra tessuto sano e patologico, così da poter guidare un selettivo ed accurato debridement.

Attualmente, nella pratica clinica, le tecniche di colorazione  
5 sono tipicamente impiegate per marcare batteri essiccati su vetrini, ma non in fluidi o in vivo. Lo stesso vale per la colorazione del biofilm batterico che generalmente avviene in setting laboratoristico a scopo puramente sperimentale e non clinico.

10 Mediante la presente invenzione, batteri gram-negativi e gram-positivi così come i miceti possono essere marcati per un'analisi semplice e rapida. In questo modo la presenza di batteri può quindi essere rapidamente facilmente rilevata senza ricorrere a esami al microscopio.

15 La presente invenzione è diretta allo sviluppo di un kit pronto all'uso nella rilevazione rapida di batteri e del biofilm batterico e fungino. Tale dispositivo consente al medico di determinare (qualitativamente) il tipo di infezione e (quantitativamente) la sua estensione e risponde all'attuale  
20 necessità di disporre di uno screening rapido, obiettivo, di facile utilizzo

Il sistema in oggetto si basa sull'utilizzo di un sistema colorante sensibile ai microbi che subisce un cambiamento di colore rapido, ben visibile e misurabile in presenza degli  
25 stessi. In presenza di microbi il cambiamento deve essere

visibilmente rilevabile all'occhio nudo, senza aiuto di ulteriori strumenti, o mediante spettrometria UV-VIS.

Tale sistema è basato su una miscela da noi messa a punto di coloranti organici, coordinati e non a nanoparticelle metalliche, ad esempio ma non solo di Au, Ag, Cu, Pt, Pd. La scelta dello studio delle nanoparticelle metalliche deriva dalla loro elevata capacità di interazione con la radiazione visibile che le rende particolarmente utili come sensori chimici e biologici addirittura in grado di rilevare una singola molecola target. Tali sostanze possono essere considerate chimicamente e biologicamente inerti e, opportunamente funzionalizzate per riconoscere recettori presenti solo nei tessuti patologici, possono accumularsi nei tessuti malati e svolgere un'azione diagnostica ed indirettamente terapeutica.

Tale sistema colorante può essere applicato ai tessuti e a superfici in genere per rivelare oltre alla presenza dei microbi, anche la loro concentrazione. Infatti, l'intensità della colorazione, che può essere facilmente misurata attraverso misura colorimetrica con spettroscopia in riflettanza a fibre ottiche (FORS), è proporzionale alla concentrazione degli stessi.

Il sistema colorante può essere sotto forma di liquido, solido o gel, e preferenzialmente di un liquido che può essere

nebulizzato, spruzzato su tessuti o superfici per indicare la presenza di microbi.

Un'ulteriore applicazione prevede che il liquido contenente il sistema colorante possa essere applicato alle superfici e lasciato essiccare, formando un film attivo che, in caso di  
5 successiva contaminazione da parte di microbi, è in grado di rivelarla, cambiando colore. Tale metodo può essere utile per l'uso su superfici come, per esempio, imballaggi, adesivi, carta, tessuti, piani di lavoro, accessori medici come guanti  
10 chirurgici, camici chirurgici e tende, per rendere rapidamente e facilmente rilevabile una eventuale contaminazione.

Secondo la presente invenzione il cambiamento di colore deve verificarsi rapidamente: in alcune forme di realizzazione il sistema colorante può iniziare a cambiare colore in meno di 10  
15 secondi, in altre in circa 30 minuti. In alcune forme di realizzazione, il colorante cambia colore ad una velocità proporzionale alla concentrazione di microbi. In altre forme di realizzazione, la quantità di batteri presenti è proporzionale a una quantità di colorante che subisce un  
20 cambiamento.

### **3.1-DETTAGLI INVENZIONE**

Negli esempi di seguito descritti sono riportate le modalità con cui due miscele coloranti sono state efficacemente

utilizzate nel rilevamento dei batteri su tessuti e device infetti e non, prelevati in sede operatoria.

### **Esempio 1**

- 5 • Preparazione della miscela di coloranti

Viene preparata una soluzione da 60 ml di colorante miscelando:

- Da 0 a 15 ml di soluzione acquosa di blu di Metilene allo 0.0025% in peso; da 0 a 15 ml di soluzione acquosa di blu di Toluidina allo 0.0025% in peso; da 0 a 15 ml di soluzione  
10 acquosa di Fucsina allo 0.02% in peso; da 0 a 15 ml di soluzione  
acquosa di Eosina allo 0.01% in peso

### **Esempio 2**

- Preparazione di nanoparticelle funzionalizzate

15 Nanoparticelle di argento o di oro sono state preparate secondo diverse metodologie in accordo con quanto riportato in letteratura.

Le nanoparticelle di argento sono preparabili secondo le seguenti procedure, e non solo:

- 20 1) un campione di AgNO<sub>3</sub> (circa 90 mg) è stato sospeso in 500 mL di acqua distillata, e riscaldato a 100°C in flusso di azoto; alla sospensione sono stati aggiunti, goccia a goccia, sotto continua agitazione e in flusso di azoto, 10 mL di una soluzione acquosa all'1% di citrato di sodio. La soluzione è  
25 stata mantenuta in ebollizione per 60-90 minuti. La sospensione



giallo-brunastra così ottenuta, che mostra un massimo di assorbimento a circa 415 nm, è costituita da particelle approssimabili a sfere con un diametro di medio di circa 20-40 nm.

5 2) Una soluzione di  $5 \times 10^{-3}$  M di  $\text{AgNO}_3$ , (100 mL) è stata aggiunta lentamente e sotto vigorosa agitazione a 300 mL di una soluzione  $2 \times 10^{-3}$  M di  $\text{NaBH}_4$  a circa  $0^\circ\text{C}$ . Durante la riduzione è stata aggiunta una soluzione di PVA all'1% (50 mL). La miscela è stata quindi bollita per ca. 1h per  
10 decomporre l'eventuale eccesso di  $\text{NaBH}_4$ . La soluzione ottenuta ha mostrato un massimo di assorbimento a 400 nm ed è costituita da particelle approssimabili a sfere con un diametro di medio di circa 20-40 nm.

3) Un campione di  $\text{AgSO}_4$  (80 mg) è stato sciolto in 200 mL di  
15 acqua a  $100^\circ\text{C}$  e quindi miscelati con 5 g di PVA disciolti in ca. 200 mL di acqua a  $80^\circ\text{C}$ . La miscela è stata quindi fatta gorgogliare con  $\text{H}_2$  a temperatura quasi di ebollizione per 3 ore. La soluzione ottenuta ha mostrato un massimo di assorbimento a 400 nm ed è costituita da particelle  
20 approssimabili a sfere con un diametro di medio di circa 20-40 nm.

Le nanoparticelle di oro sono state preparate secondo le seguenti procedure:

1) 250 mg di  $\text{HAuCl}_4$  sono stati dissolti in 500 mL di acqua  
25 ultrapura e la soluzione è stata portata all'ebollizione. Sotto

agitazione e in flusso di azoto, è stata quindi lentamente aggiunta una soluzione di citrato di sodio all'1% (50 mL). L'ebollizione è stata continuata per ca. 1 ora. La soluzione ottenuta, di colore rosso, ha mostrato un massimo di  
5 assorbimento a 530 nm ed è costituita da particelle approssimabili a sfere con un diametro di medio di circa 20-50 nm.

2) Una soluzione di  $5 \times 10^{-3} \text{M}$  di  $\text{HAuCl}_4$  (100 mL) è stata aggiunta goccia a goccia e sotto forte agitazione a 300 mL di  
10 una soluzione  $2 \times 10^{-3} \text{M}$  di  $\text{NaBH}_4$ , mantenuta a  $0^\circ\text{C}$ . Durante la riduzione è stata aggiunta una soluzione di PVA all'1% (50 mL). Dopo il completamento della reazione, la miscela è stata fatta bollire per 1 ora per decomporre l'eccesso di  $\text{NaBH}_4$ . La soluzione ottenuta, di colore viola, ha mostrato un massimo di  
15 assorbimento a 530 nm ed è costituita da particelle approssimabili a sfere con un diametro di medio di circa 20-50 nm.

La sintesi di nanoparticelle funzionalizzate è stata effettuata secondo metodologie riportate in letteratura (si  
20 veda ad esempio A. C. Templeton et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 7081; Gil-Tomas et al. *J. Mater. Chem.*, 2007, 17, 3739; K.P. Bankura et al. *Carbohydrate Polymers* 2012, 89, 1159, Lon A. Porter, Jr., et al. *Langmuir*, Vol. 14, No. 26, 1998).

La complessazione con i coloranti è stata poi effettuata  
25 facendo adsorbire sulle nanoparticelle prodotte come prima

descritto i coloranti utilizzati (blu di Metilene, blu di Toluidina, Fucsina, Eosina) ponendo ciascuna sospensione a contatto con una soluzione a diversa concentrazione ( $10^{-3}$  -  $10^{-7}$  M) del colorante scelto. La sospensione è stata poi tenuta  
5 sotto vigorosa agitazione per 90 minuti a 25°C.

### **Esempio 3**

Pazienti target

Pazienti sottoposti ad intervento chirurgico per sospetta o accertata infezione biofilm correlata (infezioni mezzi di  
10 sintesi, protesi articolari, osteomieliti ed infezione croniche di cute e tessuti molli).

Fase di prelievo del tessuto:

Luogo del prelievo

15 Il prelievo è stato effettuato secondo le norme dell'asepsi, in campo sterile, mediante l'utilizzo di materiale sterile e con un operatore assistito nell'apertura delle confezioni.

Modalità del prelievo

20 Dopo aver preparato la cute con soluzione a base di clorexidina digluconato o Iodopovidone lasciati agire per almeno 2-3 minuti, si procede con l'accesso cutaneo al, con arto esangue grazie all'utilizzo fascia ischemica. Si pratica a questo punto l'accesso al sito infetto o sospetto tale, effettuando  
25 successivamente un ampio debridement, evitando anche in questo

caso l'utilizzo del bisturi elettrico. Il prelievo dei tessuti deve comprendere, ove possibile anche un'ampia ed evidente porzione di grasso sottocutaneo. Il prelievo ottenuto, di circa cm 3 x 3, è introdotto immediatamente in un contenitore sterile. Stesso discorso riguarda la gestione del device espantato che viene inserito in un contenitore sterile per ridurre la possibilità di contaminazione batterica.

Gestione del campione tissutale.

10 Il campione viene trasportato nel minor tempo possibile (< 2 h) ad opportuno laboratorio di Analisi. Ove questo non fosse possibile, il prelievo andrà conservato ad una temperatura di +4°C per un tempo massimo di 12 ore.

15 Gestione del device

Il campione viene trasportato nel minor tempo possibile (< 2 h) ad opportuno laboratorio di Analisi. Ove questo non fosse possibile, il prelievo andrà conservato ad una temperatura di +4°C per un tempo massimo di 12 ore.

Fase di analisi:

Fasi dell'esperimento - campione tissutale

Una volta giunto nel laboratorio di destinazione, i campioni tissutale vengono liberati dai coaguli ematici adesi mediante

tre lavaggi con soluzione PBS (phosphate buffered saline, soluzione isotonica cellule e tamponata a pH 7.4 costituita da acqua e NaCl KCl Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) sterile.

Successivamente il campione è posto in un contenitore sterile  
5 al quale vengono aggiunti 60 ml di soluzione di colorante mediante utilizzo di filtro antibatterico. Il campione tissutale deve restare in immersione per la durata massima di 3 minuti e successivamente sottoposto a 3 cicli di lavaggio con PBS per eliminare il colorante in eccesso. Tutte le  
10 suddette fasi devono essere eseguite in condizioni di assoluta sterilità.

Prelievo delle porzioni colorate.

Si selezionano tramite ispezione le zone che nel contesto del campione virano più marcatamente verso un colore viola scuro;  
15 da queste si effettuano sterilmente n°3 prelievi di circa 1 cm x 1 cm (tessuto probando). Vengono inoltre selezionate ulteriori 3 zone che risultano non colorate, da cui verranno effettuati ulteriori 3 prelievi di cm 1 x 1 (tessuto di controllo). Tutti i campioni ottenuti verranno sottoposti ad  
20 esami microbiologici.

Fasi dell'esperimento - Device

Una volta giunto nel laboratorio di destinazione, il device viene liberato dai coaguli ematici adesi mediante tre lavaggi  
25 con soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) sterile e aggiunto alla

soluzione colorante per un tempo massimo di 3 minuti. Il colorante in eccesso viene poi eliminato sottoponendo il campione a 3 cicli di lavaggio con soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) sterile. Tutte le suddette fasi devono essere eseguite  
5 in condizioni di assoluta sterilità. Il campione viene successivamente sottoposto ad esami microbiologici.

#### **Esempio 4.**

I campioni tissutali coloranti e non colorati vengono  
10 omogeneizzati ed addizionati a 5 ml di terreno di arricchimento (Brain-Heart) per 1 minuto. Per la ricerca dei germi mediante la microbiologia tradizionale, circa 0,5 ml di omogenato in brodo vengono inoculati in flaconi da emocoltura per microrganismi aerobi e anaerobi e incubati per 14 giorni a 36  
15  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Tali campioni vengono sububcoltivati in agar sangue, agar cioccolato e agar Schaedler quando il brodo diventa torbido o a fine incubazione. L'analisi microbiologica mediante metodi biochimici viene utilizzata per tutti i  
20 campioni. Viene eseguita la PCR real-time utilizzando primer specifici per specie progettati per valutare il carico biologico. Queste tecniche mirano al rilevamento di un genere o di una specie predeterminata sulla base del contesto clinico e epidemiologico.

#### **Esempio 5.**

I contenitori contenenti il device vengono aperti sotto cappa e ricoperti per almeno il 90 % del suo volume con soluzione di Ringer o soluzione fisiologica sterile. Si procede a Vortexare il contenitore con la componente per 30 secondi.

5 Successivamente il campione viene Sonicato a 30-40 KHz  $0,22 \pm 0,04$  W/cm<sup>2</sup> per 5 minuti e successivamente vortexato per ulteriori 30 secondi. Gli esami colturali vengono effettuati inoculando 0,5 ml di liquido di sonicazione in flaconi da emocoltura per microrganismi aerobi e anaerobi e incubati per

10 14 giorni a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Tali campioni vengono sububcoltivati in agar sangue, agar cioccolato e agar Schaedler quando il brodo diventa torbido o a fine incubazione. Viene inoltre eseguita la PCR real-time utilizzando primer specifici per specie progettati per valutare il carico biologico Queste tecniche

15 mirano al rilevamento di un genere o di una specie predeterminata sulla base del contesto clinico e epidemiologico.

## BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

**A NOME DI:** Giovanni Balato, di nazionalità italiana e domiciliato in via Arrigo Boito 8b, 81030, Lusciano (CE), a  
5 nome di Oreste Tarallo di nazionalità italiana e domiciliato in via Torrebianca 29, 81031, Aversa (CE), ed a nome di Marco Balato, di nazionalità italiana e domiciliato in via Torrebianca 29, 81031, Aversa (CE), domiciliati ad effetto di legge presso Marco Balato, via Torrebianca 29, 81031, Aversa  
10 (CE).

**TITOLO:** IMPIEGO DI COLORANTI NELL'IDENTIFICAZIONE SELETTIVA DI SITI INFETTI NELLE INFEZIONI BIOFILM CORRELATE

15 **INVENTORI:** Giovanni Balato, Oreste Tarallo, Marco Balato, Giuseppina Roviello, Valentina Roviello, Vincenzo de Matteo.

20



## RIVENDICAZIONI

1        Formulazioni contenenti coloranti e miscele di coloranti,  
quali ad esempio e non solo, fucsina, eosina, blu di metilene,  
5    blu di toluidina O, sotto forma di spray, gel, emulsione,  
sospensione, pomata, per applicazioni cliniche quali: i)  
osteomieliti per guidare il trattamento chirurgico; ii)  
infezioni biofilm correlate di protesi articolari e dei mezzi  
di sintesi: a scopo diagnostico e terapeutico; iii) gestione  
10 delle ulcere cutanee infette: a scopo terapeutico e/o guida  
per il debridement; iv) gestione delle ferite contaminate e/o  
infette: a scopo diagnostico e terapeutico.

2        Formulazioni contenenti complessi metallici di Ag, Cu,  
Au, Pd, Pt contenenti coloranti quali ad esempio e non solo,  
15 fucsina, eosina, blu di metilene, blu di toluidina O e  
nanoparticelle metalliche funzionalizzate con tali coloranti,  
sotto forma di spray, gel, emulsione, sospensione, pomata, per  
applicazioni cliniche quali: i) osteomieliti per guidare il  
trattamento chirurgico; ii) infezioni biofilm correlate di  
20 protesi articolari e dei mezzi di sintesi: a scopo diagnostico  
e terapeutico; iii) gestione delle ulcere cutanee infette: a  
scopo terapeutico e/o guida per il debridement; iv) gestione  
delle ferite contaminate e/o infette: a scopo diagnostico e  
terapeutico.

3        Formulazioni contenenti coloranti e miscele di coloranti, quali ad esempio e non solo, fucsina, eosina, blu di metilene, blu di toluidina O, sotto forma di spray, gel, emulsione, sospensione, soluzione, per applicazioni quali la pulizia di  
5 superfici e/o apparecchiature e/o oggetti in generale per verificarne l'effettiva sanificazione.

4        Formulazioni contenenti complessi metallici di Ag, Cu, Au, Pd, Pt contenenti coloranti quali ad esempio e non solo, fucsina, eosina, blu di metilene, blu di toluidina O e  
10 nanoparticelle metalliche funzionalizzate con tali coloranti, sotto forma di spray, gel, emulsione, sospensione, soluzione, per applicazioni quali la pulizia di superfici e/o apparecchiature e/o oggetti in generale per verificarne l'effettiva sanificazione.

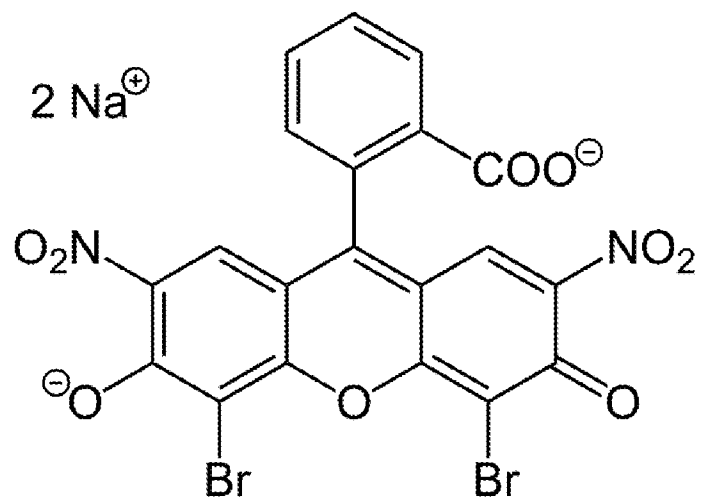
15        5        Realizzazione ed utilizzo di un dispositivo erogatore delle formulazioni di cui alle rivendicazioni 1, 2, 3, 4 in grado di rilevare in maniera semplice ed evidente la presenza e il tipo di batterio e la concentrazione mediante un cambiamento di colore visibile all'occhio, senza ulteriori  
20 strumenti.

6        Realizzazione ed utilizzo di un kit comprendente il dispositivo erogatore di cui alla rivendicazione 5 ed uno spettrofotometro UV-VIS portatile, in grado di rilevare in maniera semplice ed evidente il tipo di batterio e la  
25 concentrazione.

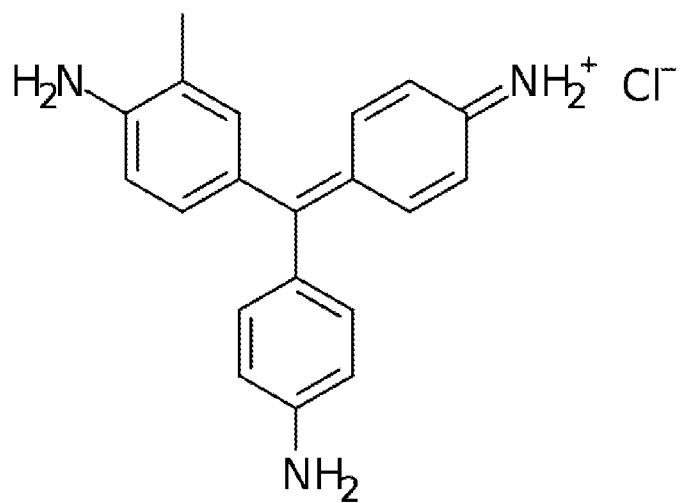
## TAVOLA I

Microrganismi	Protesi Articolari	Mezzi di sintesi
Stafilococchi Coagulasi-negativi (St.epidermidis)	30-43%	22%
Staphylococcus aureus	12-23%	30%
Streptococchi	9-10%	1%
Enterococchi (Enterococcus faecalis)	3-7%	3%
Bacilli Gram negativi (Pseudomonas aeruginosa; Escherichia coli, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae)	10-17%	10%
Specie anaerobie (Propionibacterium acnes)	2-4%	5%
Candida spp	1-3%	-
Infezioni polimicrobiche	10-20%	27%
Assenza isolamento	10-30%	2%

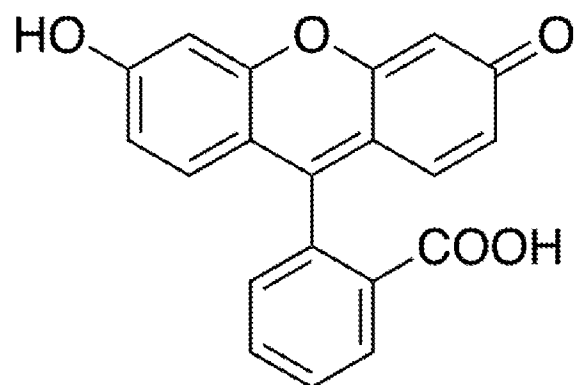
Tabella 1: microrganismi isolati nelle infezioni della protesi articolari [Trampuz A, Zimmerli W. **Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment.** Swiss Med Wkly 2009;41(11-12):831-40; Stefánsdóttir A, Johansson D, Knutson K, Lidgren L, Robertsson O. **Microbiology of the infected knee arthroplasty: report from the Swedish Knee Arthroplasty Register on 426 surgically revised cases.** Scand J Infect Dis 2005;135(17-18):243-51; Corvec S, Loiez C, Portillo ME, Rottman M, **Trampuz A. Bone and Joint infections.** In European manual of Clinical microbiology, 1st Ed. Edtors: Cornaglia G. Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Peigue-Lafeuille H, Vila J 2012b, pp 227-34] e dei mezzi di osteosintesi [Trampuz A, Zimmerli W. **Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices.** Injury, Int. J. Care Injured. 2006;37:S59-S66]



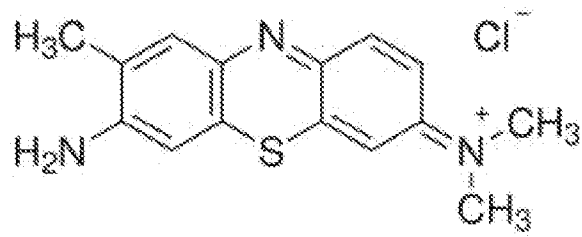
Eosina



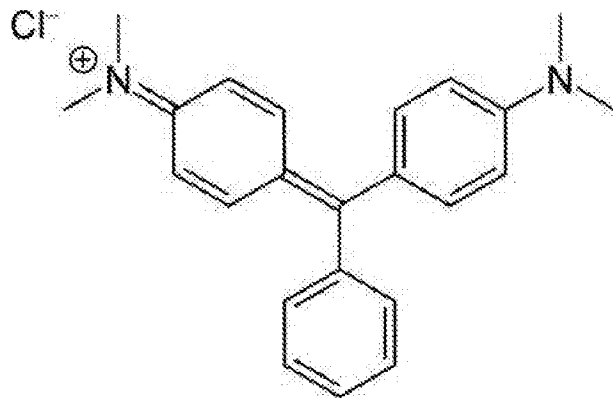
Fucsina



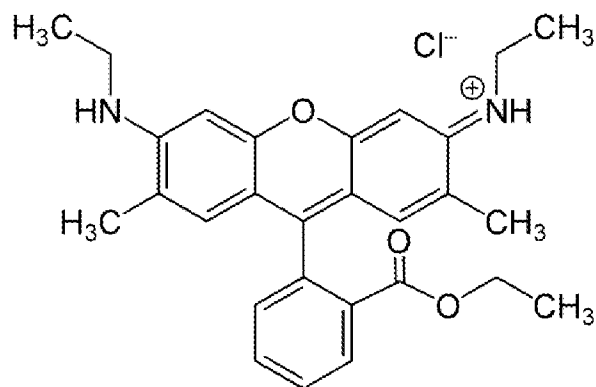
## Fluoresceina



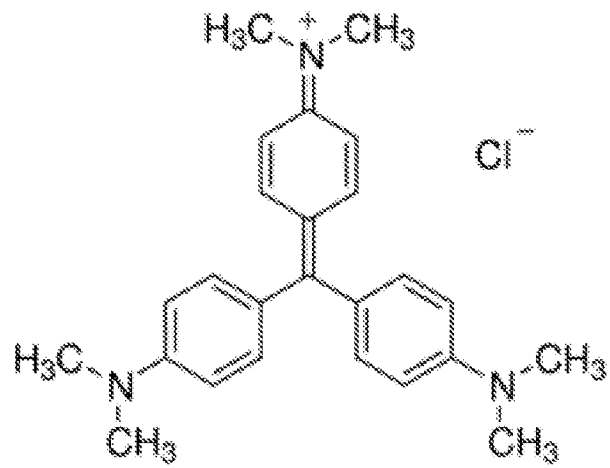
## Toluidine blue O



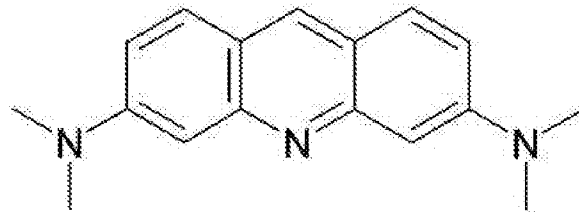
## Malachite green



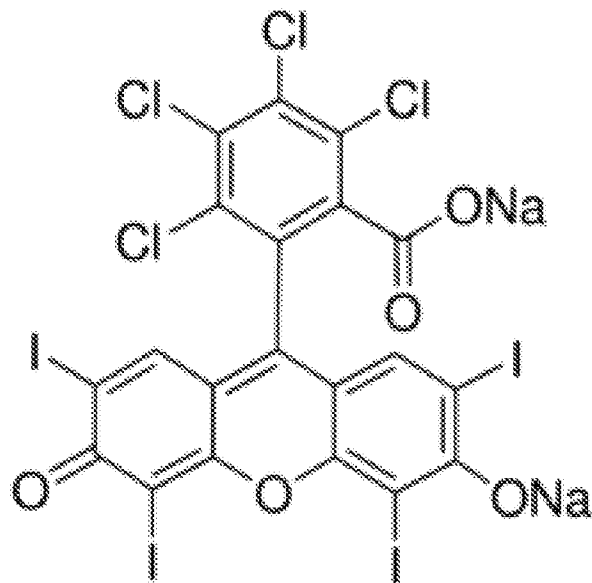
## Rhodamine 6G



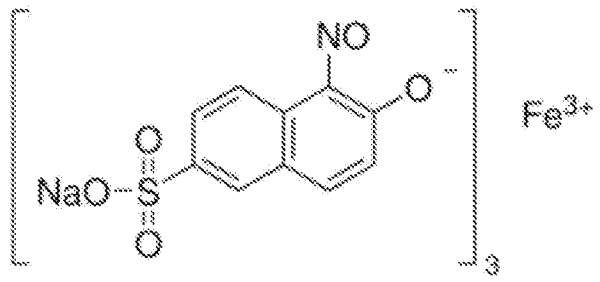
Crystal violet



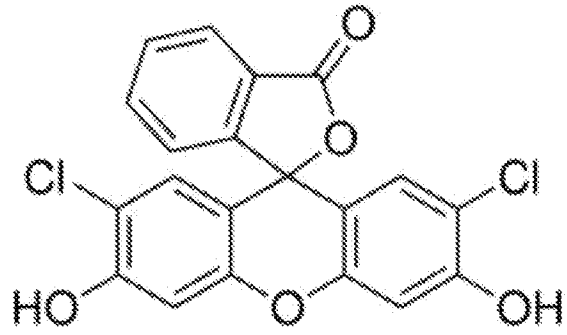
Acridine Orange



Rose Bengal



Naphthol green B



2',7'-Dichlorofluorescein

Figura 1