

**M1.1, M1.2 - METODI INNOVATIVI PER LA CONTA DI BATTERI ADESI , AGGREGATI E IN BIOFILM. ANTIBIOGRAMMA SU BATTERI ADESI A CATETERI VENOSI CENTRALI. CONTROLLO DI QUALITÀ MICROBIOLOGICA DI BIO- E NANO-MATERIALI [P. VALENTI]**

**ASSEGNISTA di RICERCA FILAS:** Antimo CUTONE, Laurea in Genetica e Biologia Molecolare

**Data di attivazione dell'Assegno di Ricerca (12 mesi):** giugno 2016.

**Obiettivi ed innovatività rispetto allo stato dell'arte.**

Obiettivi: gli obiettivi del progetto consistono nell'enumerare i microorganismi adesivi, aggregati e in biofilm colonizzanti cateteri venosi centrali e nell'eseguire l'antibiogramma direttamente sui cateteri.

Stato dell'arte: E' ormai noto che il biofilm è lo stile di vita microbico più comune rispetto a quello in forma planctonica (Brady et al., 2008; Bryers, 2008). Il biofilm consiste in un elevato numero di microorganismi tenuti insieme da un esopolisaccaride (EPS) da loro stessi sintetizzato. Il biofilm in fase fluida o adesivo a supporti abiotici o cellulari si forma e si sviluppa quando la densità microbica, a seguito di un'attiva moltiplicazione o di un'aggregazione, raggiunge valori elevati.

Il metodo universalmente utilizzato per batteri in fase planctonica, basato sulla conta delle Unità Formanti Colonia (UFC), non è affidabile per la conta dei microorganismi adesivi e in biofilm (Berlutti et al., 2003). Un fondamentale prerequisito nella ricerca di strategie per contrastare le infezioni da batteri adesivi o in biofilm è la possibilità di quantizzare il reale numero dei microorganismi unitamente alla certezza di aver isolato ed identificato tutti i generi coinvolti nell'infezione. Disporre di un metodo per contare in modo affidabile i microorganismi adesivi, aggregati o in biofilm è una grande sfida per i microbiologi, in considerazione del ruolo cruciale nelle infezioni e delle implicazioni profonde sulla diagnosi ed i trattamenti terapeutici conseguenti.

In assenza di un metodo affidabile, nella microbiologia medica, la conta dei batteri adesivi e in biofilm deve essere eseguita sui microorganismi rilasciati dai device medici dopo trattamento con vortex (metodo di Cleri) o con vortex e sonicazione (metodo di Cleri modificato). Tuttavia il metodo di Cleri e le sue modifiche, anche se è validate, presenta dei limiti: i) la mancata certezza di aver distaccato con il vortex tutti i batteri adesivi o di averne uccisi, parzialmente e totalmente, con la sonicazione; ii) l'antibiogramma eseguito sulla forma planctonica che è più sensibile agli antibiotici rispetto al biofilm (Pantarella et al 2008). Questi limiti potrebbero spiegare il motivo del significativo fallimento in vivo di molti antibiotici indicati dall'antibiogramma.

Altri metodi di conta dei microorganismi adesivi o in biofilm, definiti metodi biologici, basati sul rapporto tra i prodotti metabolici e il numero dei microorganismi, appaiono più affidabili.

Uno di questi, denominato -Total Microbe Hunter-, basato sulla riduzione di sali di tetrazolio ad opera del metabolismo dei microorganismi, evidenzia solo la presenza o l'assenza di microorganismi senza alcuna enumerazione (Bochner et al 1977).

Un altro metodo, basato sulla determinazione colorimetrica della CO<sub>2</sub> prodotta dai microorganismi vitali, è semi-quantitativa e non è affidabile (Thorpe et al. 1990).

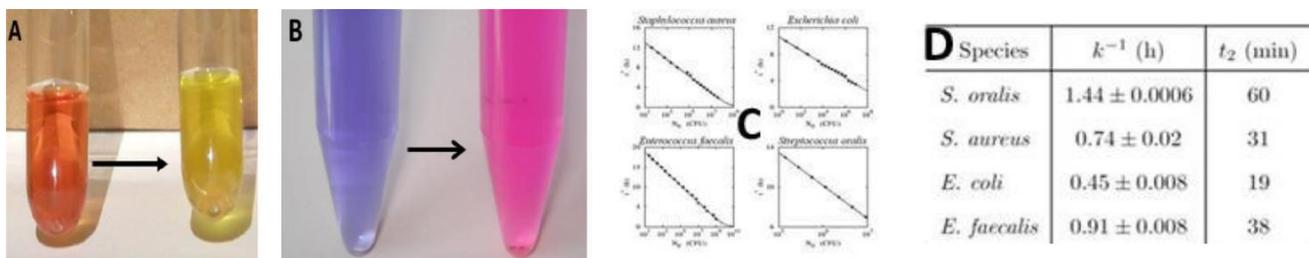
Tutti questi metodi eseguono l'antibiogramma sulla forma planctonica e non sul biofilm dei microorganismi isolati (Bestul and Vandebussche, 2005; Falagas et al., 2007).

L'unico metodo che consente l'esecuzione dell'antibiogramma su biofilm è il Calgary Biofilm Device (Ceri et al., 1999). Questo metodo riproduce, su aghi di plastica, il biofilm dei batteri eluiti dal catetere, ma, sfortunatamente, non si ha la sicurezza che tutti i batteri siano stati eluiti e non è possibile determinare il numero dei batteri nel biofilm che viene saggiato verso numerosi antibiotici. Questo è un serio limite in quanto è noto che la concentrazione dell'inoculo influenza il test di suscettibilità agli antibiotici (Egervarn et al., 2007).

Da quanto detto, è imperativo scoprire un metodo che determini il numero dei batteri adesivi e in biofilm.

## II BIOTIMER ASSAY

In questa ricerca abbiamo utilizzato un metodo biologico, da noi inventato, denominato BioTimer Assay (BTA), che permette di contare i microorganismi adesi o in biofilm senza manipolare il campione. BTA utilizza un reattivo originale che contiene un indicatore in grado di cambiare colore a causa del metabolismo microbico. Il tempo richiesto per lo switch dell'indicatore è messo in relazione al numero dei microorganismi presenti nel campione al tempo 0, attraverso delle curve di correlazione specifiche per l'indicatore e il genere microbico. Nella Figura 1 A e B sono riportati dei reattivi originali con due differenti indicatori: il rosso fenolo che vira dal rosso al giallo per la conta dei batteri fermentanti e la resazurina che vira dal blu al fucsia per la conta dei batteri non fermentanti. Nella Figura 1 C e D sono riportate le curve di correlazione, specifiche per il genere batterico, descritte dall'equazione:  $t^* = -a \log N + b$ , dove  $a$  è una funzione del prodotto metabolico responsabile dello switch dell'indicatore ed è inversamente correlato alla velocità di crescita microbica  $k$  attraverso la formula  $a = -1/k$ .



**Figura 1.** Reattivo per BioTimer con rosso fenolo (A) o con resazurina (B). Curve di correlazione (C e D)

### Risultati del I anno di ricerca

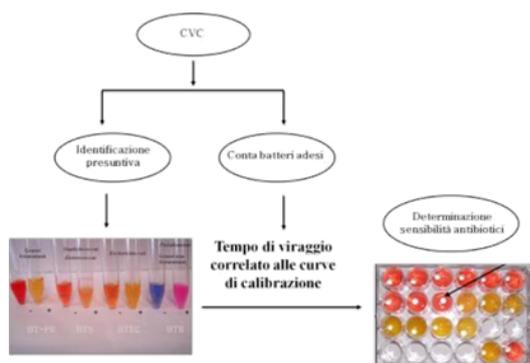
Presso la UOC Microbiologia dell'azienda Policlinico Umberto I, la conta di batteri in biofilm o adesi a cateteri venosi centrali (CVC), è eseguita dopo distacco degli stessi con il Metodo di Cleri che consiste nel trattamento del catetere con Vortex per 30". I risultati del numero delle UFC vengono paragonati con quelli ottenuti mediante BTA sul medesimo CVC. Occorre, tuttavia, sottolineare che le analisi con il BTA sono eseguite sul CVC che è stato precedentemente trattato con Vortex. Infatti, non essendo il BTA validato, non riteniamo etico procedere alla determinazione delle UFC adese o in biofilm direttamente sul CVC non trattato.

I CVC, ricevuti dalla UOC Microbiologia dell'azienda Policlinico Umberto I, dopo trattamento con Vortex, vengono tagliati sterilmente in vari frammenti di ugual misura con cui contemporaneamente vengono seminati i vari reattivi per la conta ed l'identificazione e l'antibiogramma. Nella Tabella 1 è riportato lo schema analitico unitamente ai risultati ottenuti su 84 CVC. Come si può notare c'è un'assoluta concordanza tra i dati ottenuti con il Cleri e quelli ottenuti con il BioTimer nel caso dei CVC infetti, mentre c'è una discordanza sui 9 CVC risultati sterili con il Cleri e colonizzati da *Staphylococcus* spp con il BTA.

Questa discrepanza è dovuta al fatto che con il Metodo di Cleri vengono considerati infetti solo i cateteri colonizzati da un numero di batteri  $>10^3/\text{ml}$ , mentre per valori  $<10^3/\text{ml}$  non si procede all'antibiogramma. Al contrario, l'antibiogramma eseguito con il BTA indica che dei 9 campioni considerati sterili, 2 sono sensibili, 2 sono resistenti a tutti gli antibiotici testati ed i rimanenti 5 sono variamente resistenti o all'oxaciclina o alla vancomicina o alla lincomicina o alla rifampicina.

Anche se questi dati dovranno essere riconfermati, è chiaro che il Metodo di Cleri con questo cut-off  $> 10^3$  pone dei seri limiti ad una corretta strategia terapeutica.

Per ciò che riguarda il controllo di qualità dei nano-materiali, BTA è perfettamente in grado di evidenziarne la sterilità e la colonizzazione microbica con un limite di sensibilità di 100 microorganismi totali.



84 CATETERI totali analizzati con il metodo di Cleri e BioTimer				
METODO	CLERI		BIOTIMER	
RISULTATI	9 STERILI	75 INFETTI	0 STERILI	84 INFETTI
BATTERI/ML	<10 <sup>3</sup>	>10 <sup>3</sup>	10-10 <sup>2</sup>	>10
ANTIBIOGRAMMA	NO	SI	SI	SI

**Tabella 1.** Schema analitico e risultati comparativi tra il metodo di Cleri e del Biotimer

### VANTAGGI DEL BIOTIMER ASSAY

- semplice, sensibile, affidabile e riproducibile
- conta di microorganismi adesivi, aggregati e in biofilm
- antibiogramma direttamente su biofilm
- non richiede alcuna manipolazione dei campioni
- tempi molto più brevi rispetto alle analisi classiche

### Attività previste per il II anno del progetto.

Nel secondo anno del Progetto si cercherà di mettere a punto un nuovo reattivo al fine di enumerare con il BioTimer *Candida* spp adesa a supporti abiotici. Il nuovo reattivo e la curva di correlazione sarà consegnata alla prof.ssa Letizia Angiolella del Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive affinché possa verificarne l'ideoneità e la differenza del tempo impiegato per le analisi classiche rispetto a quello richiesto per il BioTimer.

Inoltre, il BioTimer verrà ancora utilizzato per la conta, identificazione e antibiogramma diretto su CVC gentilmente concessi dopo trattamento con Vortex dalla UOC Microbiologia dell'azienda Policlinico Umberto I.

### Referenze

- Brady R.A, et al. 2008. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 52:13-22.
- Bryers J.D. 2008. Medical biofilms. *Biotechnol Bioeng.* 100(1):1-18.
- Berlutti F. et al.. 2003. Quantitative evaluation of bacteria adherent to polyelectrolyte HEMA-based hydrogels. *J Biomed Mat Res.* 67(1): 18-25.
- Pantarella Fet al. 2008. BioTimer Assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *J Microbiol Methods.* 75(3):478-84.
- Bochner B.R., Savageau M.A. 1977. Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 33:434444.
- Thorpe T.C., et al. 1990. BacT/Alert: An automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Microbiol.* 28:16081612.
- Bestul M.B., Vandenbussche H.L. 2005. Antibiotic lock technique: review of the literature. *Pharmacotherapy.* 25:211227.
- Falagas M.E., Fragoulis K., Bliziotis I.A., Chatzinikolaou I. 2007. Rifampicin impregnated central venous catheters: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Antimicrob. Chemother.* 59(3): 359369.
- Ceri H. et al. 1999. The Calgary Biofilm Device: measurement of antimicrobial sensitivity of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 37:17711776.
- Egervarn M. et al. 2007. Effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility testing of lactic acid bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(1):394396.