

M1.3 - BIOTIMER ASSAY NELL'ENUMERAZIONE DI BATTERI ADESI O IN BIOFILM A PACEMAKER, A ELETTRODI ATRIALI, VENTRICOLARI E AD ALTRI DISPOSITIVI MEDICI [P. VALENTI]

BORSISTA FILAS: Luigi ROSA, Laurea in Biotecnologie Farmaceutiche.

Data di attivazione della borsa di studio (12 mesi): giugno 2016.

Obiettivi ed innovatività rispetto allo stato dell'arte

Obiettivi: gli obiettivi del progetto consistono nel verificare, rispetto al metodo classico del Cleri modificato, l'affidabilità del BioTimer nell'enumerare i microorganismi adesi o in biofilm a pacemaker, elettrodi atriali, elettrodi ventricolari ed a altri dispositivi medici. In seguito si tenterà di eseguire l'antibiogramma direttamente sugli elettrodi infetti.

Stato dell'arte: Come già descritto al punto M1.1 e M1.2 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 adesi e in biofilm (Berlutti et al., 2003). Ne deriva che al fine di contare i batteri che si sviluppano attraverso uno stile di vita diverso da quello planctonico, la microbiologia medica indica delle procedure analitiche che modificano i campioni infetti in modo che, ottenendo il distacco dei batteri adesi o del biofilm, si possa sempre applicare la conta delle CFU alla controparte planctonica. Se da una parte è vero che la conta delle CFU è l'unico metodo validato e universalmente applicato, dall'altra crea un impedimento alla validazione di metodi di conta alternativi in quanto questo metodo ha un'ambiguità di fondo: la stessa definizione di conta delle UFC deve far riflettere perché il termine **UNITA'** non significa un singolo batterio ma ciò che produce una colonia. I 20 elementi che costituiscono ad esempio *Streptococcus spp*, vengono valutati come 1 UFC. Gli altri metodi, tra cui quelli biologici, che si basano sulla conta batterica correlata alla concentrazione dei prodotti metabolici, contano la presenza di 20 batteri vivi.

Ne consegue che nessun metodo biologico è stato, ovviamente, validato per la conta dei microorganismi in quanto spesso è in disaccordo con il metodo delle conte delle UFC. In assenza di un metodo affidabile, nella microbiologia medica, la conta dei batteri adesi e in biofilm **deve essere eseguita** sui microorganismi rilasciati dai device medici dopo trattamento con vortex (metodo di Cleri). Tuttavia, in qualche laboratorio, per ovviare alla mancata certezza di un distacco batterico totale, il metodo di Cleri è stato modificato aggiungendo al primo trattamento di 30'' con Vortex, una fase di sonicazione seguita da un altro trattamento di 30'' con il vortex. Inoltre, con il metodo di Cleri anche quello modificato, l'antibiogramma viene sempre eseguito sulla forma planctonica che è più sensibile agli antibiotici rispetto al biofilm (Pantanella et al 2008). Questo limite potrebbe spiegare il motivo del significativo fallimento in vivo di molti antibiotici indicati dall'antibiogramma. Anche il Calgary Biofilm Device (Ceri et al., 1999), unico metodo che esegue l'antibiogramma sul biofilm ricreato su aghi di plastica, non è affidabile e replicabile in quanto il numero dei batteri in biofilm su cui si determina la suscettibilità agli antibiotici è completamente ignorato. I test in vitro sulla suscettibilità di un batterio agli antibiotici dipendono principalmente dal numero di batteri presenti: maggiore è il numero e minore è la suscettibilità batterica agli antibiotici (Egervarn et al., 2007). Da quanto detto, è imperativo scoprire un metodo che determini il numero dei batteri adesi e in biofilm e che permetta di eseguire l'antibiogramma direttamente sui device medici colonizzati.

In questa ricerca, visto i risultati incoraggianti ottenuti con i cateteri venosi centrali (CVC) espantati al Policlinico Umberto I, abbiamo voluto verificare se il metodo BioTimer fosse applicabile anche per enumerare i batteri adesi o in biofilm a pacemaker e a elettrodi atriali e ventricolari forniti dal prof. Mastroianni.

II BIOTIMER ASSAY

Il BioTimer Assay (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 adesi o in biofilm presenti nel campione al tempo 0, attraverso delle curve di correlazione specifiche per l'indicatore e il genere microbico (vedi descrizione ai punti M1.1 e M1.2).

Risultati dell'1 Anno di Ricerca

Presso i laboratori diretti dal prof Mastroianni, la conta di batteri in biofilm o adesi a pacemaker e a elettrodi atriali e ventricolari è eseguita dalla dott.ssa Alessandra Oliva dopo distacco degli stessi con il Metodo di Cleri modificato che consiste nel trattamento del pacemaker e degli elettrodi con Vortex per 30", seguito da 5' di sonicazione ed ancora un trattamento per 30" con il vortex. I risultati del numero delle UFC dopo distacco vengono paragonati con quelli ottenuti mediante BTA sui medesimi campioni. Occorre, tuttavia, sottolineare che le analisi con il BTA sono eseguite sia sul pacemaker che sugli elettrodi precedentemente trattati con Vortex, sonicazione e vortex ancora. Infatti, non essendo il BTA validato, non riteniamo etico procedere alla determinazione delle UFC adese o in biofilm direttamente sui pacemaker e sugli elettrodi non trattati.

E' inoltre importante sottolineare che, a differenza dei CVC che possono essere tagliati in frammenti di ugual misura, gli elettrodi atriali e ventricolari, essendo realizzati in titanio microporoso ricoperto di platino, non possono essere tagliati. Ne consegue che gli elettrodi possono essere messi in contatto con un solo reattivo e non può essere eseguito, contemporaneamente, un antibiogramma direttamente sugli stessi.

Durante questo primo anno di ricerca, dal laboratorio del prof Claudio Mastroianni sono stati gentilmente forniti pacemaker ed elettrodi atriali e ventricolari espantati per sospetta infezione da 4 pazienti; un elettrodo atriale e uno ventricolare da un paziente; un pacemaker con un solo elettrodo ventricolare da un solo paziente; un pacemaker con un elettrodo atriale, ventricolare e coronarico da un solo paziente; un elettrodo più un fibrillatore; un port-a-cath; uno stent ureterale destro e uno sinistro da uno stesso paziente.

I risultati ottenuti con il BioTimer sono stati paragonati a quelli ottenuti con il metodo di Cleri modificato dalla dott.ssa Alessandra Oliva dell'UO del prof Mastroianni (Tabella 1).

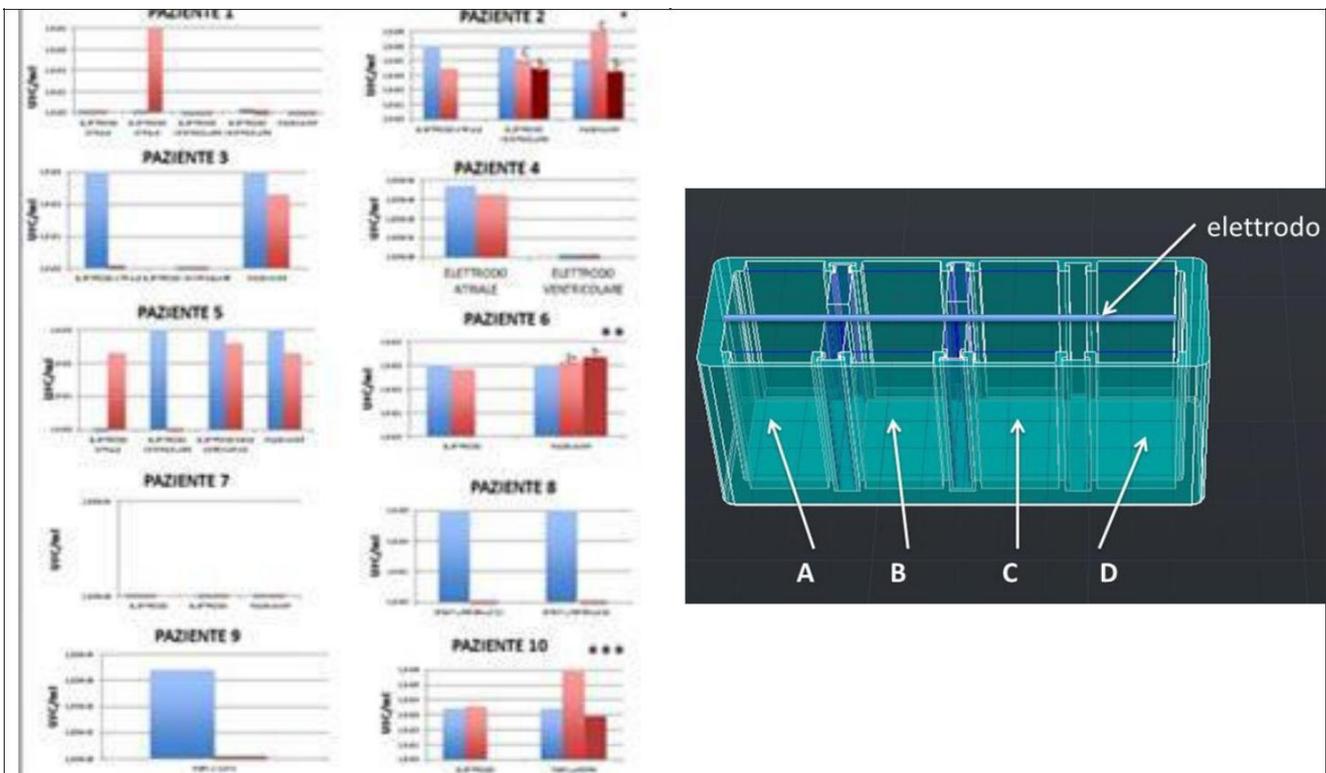


Tabella 1: Rappresentazione schematica della carica batterica presente sui device di ogni paziente analizzato. In blu la carica batterica rilevata tramite BioTimer Assay, in rosso la carica batterica rilevata tramite metodo Cleri modificato.

Figure 1: Nuovo dispositivo analitico per conta batteri adesi a elettrodi atriali e ventricolare A,B,C,D scompartimenti con differenti reattivi per BioTimer

La prima osservazione riguarda il fatto che sia nei pacemaker che negli elettrodi, l'assenza di batteri adesi o in biofilm, che definisce la sterilità del device, è stata totalmente concordante tra i due metodi in un paziente (n.7) e concordante nelle analisi di 5 elettrodi ventricolari, uno atriale ed in un pacemaker. Nelle altre analisi, il metodo del BioTimer ha evidenziato un maggiore numero di batteri in 3 elettrodi atriali, 2 elettrodi ventricolari, un elettrodo coronarico e in due pacemaker. Al contrario, il metodo di Cleri modificato evidenzia la presenza di batteri in due elettrodi atriali che BioTimer considera sterili. Nei restanti campioni abbiamo osservato una discrepanza quantitativa significativa quando la colonizzazione è operata da *Corynebacterium spp* e *Staphylococcus epidermidis* e meno significativa nel caso di *S.epidermidis* e *S. aureus*.

Per ciò che riguarda l'analisi del port-a-cath il BioTimer determina una significativa carica batterica mentre il Cleri definisce il campione sterile. Gli stessi risultati sono ottenuti nelle analisi degli stent ureterali, dove il BioTimer determina una significativa carica batterica mentre il Cleri definisce i due stent sterili.

I risultati ottenuti sono particolarmente interessanti, in quanto il BioTimer determina in genere un maggior numero di batteri, nonostante utilizzi i campioni già trattati per staccare i batteri. Tuttavia, quando gli elettrodi o il pacemaker sono colonizzati da due generi batterici come nel caso di *Corynebacterium spp* e *Staphylococcus epidermidis*, i dati del Cleri e del BioTimer differiscono significativamente. La ragione di questa discrepanza consiste nel fatto che gli elettrodi non possono essere suddivisi in differenti reattivi.

Per ovviare a questo inconveniente, abbiamo ritenuto fondamentale disegnare un nuovo dispositivo analitico in cui ciascun elettrodo potesse essere a contatto contemporaneamente con vari reattivi per la conta e l'identificazione e successivamente anche per l'antibiogramma (Figura 1). Come appare evidente, il nuovo dispositivo analitico permette l'immersione di ciascun elettrodo in differenti reattivi separati da pareti a tenuta. L'elettrodo è bloccato attraverso la paraffina in modo da evitare le contaminazioni tra reattivi.

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 *Corynebacterium spp* adeso a pacemaker, elettrodi atriali e ventricolari. Il nuovo reattivo e la curva di correlazione sarà disegnata utilizzando un ceppo di *Corynebacterium spp* isolato dalla dott.ssa Alessandra Oliva da un paziente con pacemaker e elettrodo ventricolare colonizzato.

L'affidabilità e la replicabilità dei risultati quantitativi verrà verificata su pacemaker ed elettrodi gentilmente concessi dal prof. Claudio Mastroianni. Dopo aver stabilito l'eventuale idoneità del nuovo dispositivo con il nuovo reattivo per *Corynebacterium spp*, si valuteranno comparativamente i dati quantitativi ottenuti con il Cleri modificato ed il BioTimer considerando anche il minor tempo impiegato per le analisi con il BioTimer.

Nell'ultima fase della ricerca, un ulteriore nuovo dispositivo con un maggior numero di celle verrà realizzato al fine di eseguire anche l'antibiogramma su batteri adesi o in biofilm senza alcuna manipolazione del campione.

Referenze citate

- Berlutti F., Rosso F., Bosso P., Giansanti F., Ajello M., De Rosa A., Farina E., Antonini G., Valenti P. 2003. Quantitative evaluation of bacteria adherent to polyelectrolyte HEMA-based hydrogels. *J Biomed Mat Res.* 67(1): 18-25.
- Pantarella F, Valenti P, Frioni A, Natalizi T, Coltella L, Berlutti F. 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.
- Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Morck D.W., Read R.R., Buret A.G. 1999. The Calgary Biofilm Device: measurement of antimicrobial sensitivity of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 37:1771-1776.
- Egervarn M., Lindmark H., Roos S., Huys G., Lindgren S., 2007. Effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility testing of lactic acid bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(1):394-396.