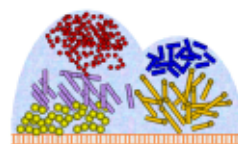


ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ



Biofilm Microbici 2005
I Workshop nazionale

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 20-21 giugno 2005

RIASSUNTI

A cura di
Gianfranco Donelli ed Emilio Guaglianone
Dipartimento di Tecnologie e Salute

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
05/C5

Istituto Superiore di Sanità

Biofilm Microbici 2005. I Workshop nazionale. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 20-21 giugno 2005. Riassunti.

A cura di Gianfranco Donelli ed Emilio Guaglianone
2005, x, 58 p. ISTISAN Congressi 05/C5

Microbiologi, infettivologi, igienisti e operatori di sanità pubblica si trovano a dover affrontare sempre più frequentemente problematiche inerenti alla formazione di biofilm batterici e fungini. In particolare, la crescita microbica bentonica rappresenta un problema per il trattamento di un vasto numero di infezioni umane, dato l'osservato aumento di antibiotico-resistenza da parte degli agenti causali coinvolti. Non trascurabile è inoltre il rilievo che la formazione di biofilm assume in numerosi sistemi ambientali ed industriali, con la necessità da parte di biotecnologi, chimici ed ingegneri di individuare interventi preventivi e trattamenti adeguati. La valutazione dei rischi sanitari e ambientali associati allo sviluppo microbico in forma sessile e la conseguente risposta in termini di prevenzione e/o trattamento, deve essere ovviamente basata su una approfondita conoscenza dei vari aspetti del problema. Questo Workshop ha appunto lo scopo di informare e aggiornare sulle più recenti acquisizioni scientifiche in materia di biofilm microbici e fornire un'utile ed attesa occasione di dibattito ed interazione tra i vari gruppi di ricerca italiani che si stanno impegnando in questo importante settore scientifico-sanitario.

Parole chiave: Biofilm microbici, *Quorum sensing*, Antibiotico-resistenza, Infezioni, Ambiente

Istituto Superiore di Sanità

Microbial Biofilm 2005. I National Workshop. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 20-21 June 2005. Abstract book.

Edited by Gianfranco Donelli and Emilio Guaglianone
2005, x, 58 p. ISTISAN Congressi 05/C5 (in Italian)

Microbiologists and specialists in infectious diseases, hygiene and public health have to face more and more frequently problems related to bacterial and fungal biofilm formation. In particular, benthonic microbial growth represents a critical issue in the treatment of a large number of human infectious diseases, taking into account the well known increased antibiotic-resistance of implicated microbial agents. Not negligible is also the relevance of biofilms in a number of environmental and industrial systems which require the designing of preventive measures and /or adequate treatments by biotechnologists, chemists and engineers. Of course, the evaluation of health and environmental risks related to the sessile mode of microbial growth and the response in terms of prevention and/or treatment should be based on a deep knowledge of this topic. This Workshop aims to inform and update on the most recent research advances in the field of microbial biofilms and to provide a valuable meeting point among the numerous Italian researchers involved in this area.

Key words: Microbial biofilm, Quorum sensing, Antibiotic-resistance, Infections, Environment

Si ringraziano, per la collaborazione alla realizzazione del Workshop, Patrizia Gozzi e Paola Tacchi Venturi dell'Ufficio Relazioni Esterne e Luisa di Marzo e Stefania Razeto del Dipartimento di Tecnologie e Salute dell'Istituto Superiore di Sanità.

Per informazioni su questo documento scrivere a: donelli@iss.it

Il rapporto è disponibile online sul sito di questo Istituto: www.iss.it.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2005 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

Comitato di Presidenza

E. Garaci (*Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità*)
G. Nicoletti (*Presidente della Società Italiana di Microbiologia*)
G. Donelli (*Presidente del Workshop*)

Comitato scientifico

F. Bistoni (Perugia)
C. Buonavoglia (Bari)
A. Cassone (Roma)
M. Clementi (Milano)
P. Di Francesco (Roma)
G. Donelli (Roma)
B. Facinelli (Ancona)
G. Fadda (Roma)
F. Galdiero (Napoli)
E. Garaci (Roma)
P. La Colla (Cagliari)
M. La Placa (Bologna)
P. Mastrantonio (Roma)
R. Materassi (Firenze)
T. Mazzei (Firenze)
G. Morace (Milano)
G. Nicoletti (Catania)
A. Panà (Roma)
F. Paradisi (Firenze)
G. Pozzi (Siena)
C. Pruzzo (Genova)
M. C. Re (Bologna)
S. Ripa (Camerino)
F. Rossano (Napoli)
G. M. Rossolini (Siena)
L. Selan (Roma)
G.C. Schito (Genova)
C. Sorlini (Milano)
S. Stefani (Catania)
A. Toniolo (Varese)
M. A. Tufano (Napoli)
R. Tufano (Napoli)
P.E. Varaldo (Ancona)
G.A. Zapponi (Roma)

Il Workshop è stato realizzato con la collaborazione della Società Italiana di Microbiologia.

INDICE

Programma	v
Prima sessione	
Sviluppo di biofilm microbici e <i>quorum sensing</i>	1
Seconda sessione	
Aspetti strutturali e funzionali di biofilm batterici e fungini	7
Terza sessione	
Biofilm in sistemi ambientali e industriali.....	15
Quarta sessione	
Biofilm, patogenicità microbica e antibiotico-resistenza.....	21
Quinta sessione	
Approcci terapeutici innovativi alle infezioni delle alte vie respiratorie sostenute da biofilm microbici: evidenze microbiologiche e morfo-funzionali	29
Sesta sessione	
Prevenzione e disgregazione di biofilm batterici.....	33
Sessioni poster	39
Indice degli autori	57

PROGRAMMA

Lunedì 20 giugno 2005

- 8.30 Registrazione dei partecipanti
- 9.30 Inaugurazione del Workshop
Enrico Garaci, Giuseppe Nicoletti, Gianfranco Donelli
- 9.45 Lettura magistrale
Il ruolo dei biofilm in sistemi naturali, ingegnerizzati e patologici
J. William Costerton
- 10.30 Intervallo

Prima sessione

SVILUPPO DI BIOFILM MICROBICI E QUORUM SENSING

Moderatori: Francesco Galdiero, Gian Maria Rossolini

- 11.00 *Lo sviluppo di biofilm è un passo cruciale nella patogenicità di Streptococcus pneumoniae*
Marco R. Oggioni
- 11.30 *Ruolo e regolazione del quorum sensing in Pseudomonas*
Vittorio Venturi
- 12.00 *Modulatori del quorum sensing batterico e farmaci anti-biofilm*
Laura Selan

Sessione poster (I)

Moderatori: Patrizia Albertano, Pier Sandro Cocconcelli

- 12.30 Presentazione e discussione poster 1-7
- 13.30 Colazione di lavoro

Seconda sessione

ASPETTI STRUTTURALI E FUNZIONALI DI BIOFILM BATTERICI E FUNGINI

Moderatori: Michele La Placa, Fabio Rossano

- 14.30 *Il biofilm nella patogenesi delle infezioni da Enterococcus faecalis*
Lucilla Baldassarri
- 14.50 *Basi molecolari della produzione di biofilm in Staphylococcus spp.*
Stefania Stefani
- 15.10 *La lattoferrina e gli ioni ferrici influenzano l'aggregazione e la formazione di biofilm in Streptococcus mutans*
Piera Valenti
- 15.30 *BHP (Bap Homologous Protein) media l'interazione di Staphylococcus epidermidis con la citocheratina 10*
Pietro Speciale
- 15.45 *Un sistema modello per lo studio della formazione di biofilm: il batterio lattico Lactobacillus plantarum*
Lidia Muscariello
- 16.00 Intervallo

Terza sessione

BIOFILM IN SISTEMI AMBIENTALI E INDUSTRIALI

Moderatori: Paolo Di Francesco, Raffaello Pompei

- 16.30 *Approcci multidisciplinari allo studio dei biofilm fototrofi in ambiente sub-aereo e acquatico*
Patrizia Albertano
- 17.00 *Caratterizzazione e performance di un biofilm microbico adeso a granuli di pomice e avente attività degradativa nei confronti del toluene*
Elisabetta de Alteriis
- 17.20 *Caratterizzazione cinetica e microbiologica di biofilm anaerobici nel risanamento in situ di falde acquifere contaminate da solventi clorurati*
Federico Aulenta
- 17.40 *Formazione di biofilm di Streptococcus thermophilus su superfici di acciaio*
Fabrizio Cappa

Martedì 21 giugno 2005

Quarta sessione

BIOFILM, PATOGENICITÀ MICROBICA E ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Moderatori: Sandro Ripa, Pietro E. Varaldo

- 9.00 *Biofilm e resistenza agli antimicrobici*
Gian Maria Rossolini
- 9.30 *Sviluppo dell'antibiotico-resistenza in biofilm di Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa*
Claudia Zampaloni
- 9.50 *Biofilm fungino e farmaco-resistenza: stato dell'arte e nuove evidenze sul patogeno emergente Trichosporon asahii*
Giovanni Di Bonaventura
- 10.10 *Monitoraggio e diagnosi di infezioni da protesi*
Marco Artini
- 10.30 *Dinamica di formazione del biofilm di Helicobacter pylori*
Luigina Cellini
- 10.45 *Aumento dei fattori di virulenza mediati da sviluppo ifale in ceppi di Candida albicans resistenti ai farmaci antifungini*
Letizia Angiolella
- 11.00 Intervallo

Quinta sessione

APPROCCI TERAPEUTICI INNOVATIVI ALLE INFEZIONI DELLE ALTE VIE RESPIRATORIE SOSTENUTE DA BIOFILM MICROBICI: EVIDENZE MICROBIOLOGICHE E MORFO-FUNZIONALI

Moderatori: Giovanni Fadda, Giuseppe Nicoletti

- 11.30 *Efficacia della terapia antibiotica sequenziale nelle infezioni delle alte vie respiratorie sostenute da biofilm microbici: evidenze microbiologiche e morfo-funzionali*
Giancarlo Schito, Giovanni Fadda
- 12.00 *Primi risultati clinici della terapia antibiotica sequenziale nelle infezioni delle alte vie respiratorie associate a biofilm microbici*
Alberto Macchi

Sessione poster (II)

Moderatori: Piera Valenti, Stefania Zanetti

12.30 Presentazione e discussione poster 8-16

13.30 Colazione di lavoro

Sesta sessione

PREVENZIONE E DISGREGAZIONE DI BIOFILM BATTERICI

Moderatori: Franco Paradisi, Rosalba Tufano

14.30 *Nuove strategie per prevenire lo sviluppo di biofilm microbici e ottenerne la disgregazione*

Gianfranco Donelli

15.00 *Biomateriali a rilascio di agenti antimicrobici per lo sviluppo di dispositivi medici anti-biofilm*

Iolanda Francolini

15.30 *Produzione di biofilm batterici su substrati idrofobici e inibizione dell'adesione mediante ramnolipidi*

Elena di Mattia

15.45 *Influenza di N-acetilcisteina sulla produzione di biofilm e correlazione con l'antibiotico-resistenza in stafilococchi coagulasi-negativi*

Vincenzo Cuteri

16.00 **Test finale ECM**

16.30 Chiusura del Workshop

POSTER

- 1 *Nuove strategie anti-biofilm basate sulla applicazione di campi elettrici ed elettromagnetici*
Marco Artini, Federica Poggiali, Stefano Quadri, Vanessa Ripavecchia, Laura Selan
- 2 *I biofilm fototrofi ad attività biodeteriogenica degli ipogei romani*
Laura Bruno, Simona Bellezza, Patrizia Albertano
- 3 *Studio dei fattori che influenzano la dinamica di adesione ad una superficie di acciaio di ceppi di *B. cereus* termotolleranti e psicrotrofi isolati da alimenti*
Andrea Gianotti, Melania Vallicelli, Maria Elisabetta Guerzoni
- 4 *Studio della dinamica di adesione di *E. coli*-gfp ad una superficie di materiale di imballaggio per alimenti in funzione di alcuni stress chimico-fisici*
Andrea Gianotti, Fabrizio Cappa, Pier Sandro Cocconcelli, Maria Elisabetta Guerzoni
- 5 *Influenza dei nutrienti e delle superfici abiotiche nella formazione del biofilm di *Pseudomonas aeruginosa**
Angela Giofrè, Manuela Caratozzolo, Santina Carnazza, Salvatore Guglielmino
- 6 *Biofilm fototrofi in ambienti acquatici: biodiversità ed ecofisiologia*
Antonella Guzzon, Francesca Di Pippo, Roberta Congestri, Patrizia Albertano
- 7 *Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM): utilizzo e limiti nello studio dei biofilm*
Riccardo Tombolino, Elodia Musu, Raffaello Pompei
- 8 *Efficienza di adesione e invasione di differenti forme morfologiche di *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cenocepacia* ferro-modulate*
Francesca Berlutti, Clara Morea, Andrea Battistoni, Serena Sarli, Paola Cipriani, Fabiana Superti, Maria Grazia Ammendolia, Piera Valenti
- 9 *Formazione di biofilm e antibiotico-resistenza in ceppi di *Vibrio* spp. isolati da prodotti ittici*
Antonella Deriu, Giovanna Felis, Francesca Murineddu, Leonardo A. Sechi, Stefania Zanetti
- 10 *Formazione di biofilm e resistenza alla vancomicina in *Staphylococcus epidermidis* CNBL7032 isolato da alimenti*
Simona Gazzola, Pier Sandro Cocconcelli

- 11 *Ruolo del biofilm microbico multispecie nell'occlusione degli stent biliari*
Emilio Guaglianone, Perla Filippini, Rita Cardines, Roberta Di Rosa, Adriano Penni, Antonio Basoli, Fausto Fiocca, Paola Mastrantonio, Gianfranco Donelli
- 12 *Produzione di violaceina e sviluppo di biofilm in *Janthinobacterium lividum**
Fabrizio Pantanella, Francesca Berlutti, Claudio Passariello, Serena Schippa
- 13 *Studio in vivo dell'efficacia di differenti protocolli di prevenzione farmacologia contro l'infezione precoce di cateteri vascolari*
Federica Poggiali, Vanessa Ripavecchia, Claudio Passariello, Marco Artini, Luigi Rizzo, Laura Selan
- 14 *Studio dell'efficacia di un nuovo biomateriale per ridurre la formazione di biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* su lenti a contatto*
Federica Poggiali, Richard Weeh, Betsey Pitts, Fabrizio Pantanella, Stefano Palma, Marco Artini, Laura Selan
- 15 *Rilascio di una combinazione di antibiotici da matrici poliuretatiche per prevenire la formazione di biofilm microbici e contrastare l'insorgenza di antibiotico-resistenza*
Valeria Ruggeri, Iolanda Francolini, Mariangela Bellusci, Antonella Piozzi, Gianfranco Donelli
- 16 *Azione inibente di N-acetilcisteina sulla formazione di biofilm da parte di un ceppo di *Klebsiella pneumoniae**
Stefania Zanetti, Antonio Pinna, Giovanni Pecorini, Donatella Usai, Paola Molicotti, Leonardo A. Sechi

Prima sessione

Sviluppo di biofilm microbici e *quorum sensing*

Moderatori

Francesco Galdiero, Gian Maria Rossolini

IL RUOLO DEI BIOFILM IN SISTEMI NATURALI, INGEGNERIZZATI E PATOLOGICI

J. William Costerton

Center for Biofilms, Dental Science Center-DEN, University of Southern California, Los Angeles, USA

Esami diretti delle popolazioni batteriche presenti in una grande varietà di sistemi naturali e patologici hanno mostrato che la maggior parte di questi microorganismi cresce sotto forma di biofilm, cioè di comunità batteriche immerse in una matrice polisaccaridica da esse prodotta. In effetti, singole cellule batteriche allo stato planktonico sono raramente osservabili se non in ecosistemi con ridotto apporto di nutrienti, quali il fondo degli oceani, e nelle infezioni batteriche acute che hanno caratterizzato le epoche pre-antibiotici e pre-vaccinazioni. È stato riportato che una percentuale compresa tra il 65% e l'80% delle infezioni batteriche trattate dai medici nei paesi sviluppati è causata da batteri che crescono in biofilm, e che tutte le infezioni batteriche associate all'uso di dispositivi medici impiantabili appartengono a questa categoria. Le infezioni da biofilm sono generalmente caratterizzate da una lenta comparsa, da sintomi lievi, dalla loro cronicità e dalla loro risposta refrattaria alla terapia antibiotica. Questa innata resistenza agli agenti antimicrobici e alle difese dell'ospite è stata dimostrata *in vitro* e i suoi meccanismi sono stati parzialmente chiariti. La matrice esopolisaccaridica protegge i batteri in essa immersi dall'azione degli anticorpi e dei fagociti; inoltre, tali batteri sessili assumono uno speciale fenotipo, che differisce profondamente da quello dei batteri planktonici, e mediano alti livelli di resistenza agli antibiotici e ai disinfettanti. Ora che molte delle caratteristiche salienti delle infezioni batteriche croniche sono state attribuite al fatto che i microorganismi causali vivono in biofilm, noi possiamo comprendere l'eziologia di decine di infezioni che vanno dall'otite media a quelle associate alle valvole cardiache naturali e artificiali.

I batteri colonizzano sia superfici inerti che tessuti, si sviluppano in biofilm, resistono ai meccanismi di rimozione dell'ospite e ai chemioterapici e danneggiano i tessuti adiacenti stimolandone risposte infiammatorie. Essendo oggi ormai accettato che il problema centrale delle infezioni croniche è dovuto alla persistenza dei biofilm microbici, diversi metodi per il controllo del biofilm possono essere "presi in prestito" sia dalla natura che da strategie di bioingegneria. Molti organismi sessili, sia vegetali che animali, proteggono se stessi dalla "sepoltura" all'interno di biofilm microbici, producendo sostanze chimiche in grado di bloccare la formazione: e queste sostanze sono attualmente utilizzate a livello industriale per controllare la crescita dei biofilm. I bioingegneri hanno scoperto che i batteri all'interno del biofilm possono essere eliminati da antibiotici convenzionali se la struttura di queste comunità sessili viene perturbata da ultrasuoni o da campi elettrici a corrente continua. Verranno riportati esempi di utilizzo di queste nuove misure di controllo dei biofilm sia in contesti medici che odontoiatrici.

LO SVILUPPO DI BIOFILM È UN PASSO CRUCIALE NELLA PATOGENICITÀ DI *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Marco R. Oggioni (a, b), Claudia Trappetti (b), Gianni Pozzi (b)

(a) UOC Batteriologia, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena

(b) Dipartimento di Biologia Molecolare, Università degli Studi di Siena, Siena

In *Streptococcus pneumoniae* un peptide (CSP) è responsabile della regolazione della competenza per la trasformazione genetica con meccanismo di *quorum sensing*. Basandosi su lievi effetti batteriostatici *in vitro* il CSP, prodotto industrialmente, è stato saggiato nella terapia della sepsi da pneumococco nel modello animale. Somministrazione endovenosa del peptide ha aumentato significativamente la sopravvivenza e diminuito la batteriemia. Nell'intento di indagare le basi molecolari di questo fenomeno sono stati utilizzati la *real time* RT-PCR quantitativa di geni di pneumococco durante l'infezione *in vivo* e diversi modelli sperimentali di infezione con una serie di mutanti. In analogia a dati ottenuti da altri streptococchi orali, un modello di crescita in biofilm è stato sviluppato per pneumococco. Verranno discussi la stretta correlazione tra i dati ottenuti *in vivo* e i dati ottenuti nei modelli *in vitro*.

RUOLO E REGOLAZIONE DEL *QUORUM SENSING* IN PSEUDOMONAS

Vittorio Venturi

Bacteriology Group, International Centre for Genetic Engineering & Biotechnology, Trieste, E-mail: venturi@icgeb.org

Il biofilm formato da *Pseudomonas* è una delle cause principali della gravità e letalità delle infezioni polmonari croniche che colpiscono i pazienti affetti da fibrosi cistica. La ragione è che i batteri che crescono immersi nel biofilm risultano protetti dai meccanismi di difesa dell'ospite e più resistenti, perchè difficilmente raggiungibili, ad una ampia varietà di antibiotici. Gli *Pseudomonas*, come altri batteri Gram-negativi, hanno sviluppato meccanismi che permettono a tutta la comunità di coordinare l'espressione dei loro geni attraverso la secrezione di molecole di lattoni omoserinici (AHL) e il monitoraggio della loro concentrazione. Questo meccanismo di comunicazione cellulare è chiamato *quorum sensing* ed è usato per promuovere o reprimere, in risposta alla densità cellulare, una serie di geni "utili" al batterio solo se espressi da tutta la comunità. *Pseudomonas aeruginosa* porta due sistemi di *quorum sensing*: i sistemi *las* e *rhl*. Il primo consiste in un sensore/regolatore LasR e in una AHL-sintetasi LasI che sintetizza il 3-oxo-C12-AHL, il secondo comprende un sensore/regolatore RhlR e una sintetasi RhlI che produce il C4-AHL. Tra i due sistemi esiste una gerarchia: è il sistema *las* che tra i suoi obiettivi ha anche quello di attivare il sistema *rhl*. Studi sui geni regolati da questi due sistemi hanno evidenziato che essi coordinano l'espressione del 6% dei geni totali, inclusi molti geni codificanti per fattori di virulenza. È stato riportato che mutanti *las⁻* di *P. aeruginosa* formano biofilm piatti e indifferenziati, mentre i ceppi selvatici formano biofilm con strutture più complesse ("tower and mushroom-shaped microcolonies"). Questa osservazione supporta l'idea che il sistema *quorum sensing* giochi un ruolo molto importante negli stadi di maturazione del biofilm e delle sue architetture e questo lo rende un obiettivo molto attraente per lo sviluppo di nuovi agenti antimicrobici. In ogni caso la cascata di eventi controllata dal *quorum sensing* è sensibile anche ad altri fattori di regolazione che permettono un ulteriore controllo del sistema non solo in risposta alla densità cellulare ma anche ad altri stimoli ambientali. Trovare questi regolatori e gli stimoli che essi riconoscono è l'interesse primario della nostra ricerca; in particolare stiamo studiando come *Pseudomonas* reprime il sistema *las* a bassa densità cellulare e abbiamo trovato diversi regolatori che controllano la tempistica dell'espressione del *quorum sensing* impedendo a quest'ultimo di attivarsi a basse densità cellulari anche in presenza di alte concentrazioni di lattoni.

MODULATORI DEL QUORUM SENSING BATTERICO E FARMACI ANTI-BIOFILM

Laura Selan (a), Federica Poggiali (a), Claudio Passariello (a), Vanessa Ripavecchia (a), J. William Costerton (b), Marco Artini (a)

(a) Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica “G. Sanarelli”,
Università di Roma “La Sapienza”, Roma

(b) Center for Biofilms, Dental Science Center-DEN, University of Southern California,
Los Angeles, USA

Gli stafilococchi coagulasi negativi (soprattutto *S. epidermidis*) non possono più essere considerati batteri saprofiti, perchè si comportano come patogeni quando colonizzano la superficie di dispositivi protesici in forma di biofilm. L'insorgenza di biofilm antibiotico-resistenti è il principale fattore responsabile delle infezioni protesiche, in cui la rimozione chirurgica delle protesi risulta essere l'unica possibilità terapeutica. Lo scopo del nostro studio è lo studio dell'attività “anti-biofilm” di un enzima proteolitico selezionato in base a precedenti studi: la Serratio-peptidasi (SPEP).

Abbiamo usato 5 ceppi differenti di *S. epidermidis* (un ceppo clinico isolato da una protesi vascolare infetta, 3 ceppi gentilmente concessi dal Prof. F. Gotz e un ceppo di riferimento in grado di formare biofilm: RP62A) e due ceppi di *S. aureus* (un isolato clinico e un ceppo ATCC 6538P). Tutti i ceppi sono stati coltivati su piastre da 96 pozzetti (seguendo il protocollo Christensen); per valutare le proprietà antibiofilm della SPEP - da sola o in combinazione con antibiotici attivi sui ceppi utilizzati- abbiamo sperimentato tre diverse condizioni: i biofilm preformati sono stati trattati con gli antibiotici da soli, (oxacillina, gentamicina, ofloxacina), con SPEP da sola e con la combinazione di SPEP e antibiotico.

Per investigare la modalità di azione della SPEP i ceppi sono stati coltivati in presenza o in assenza della SPEP ed è stato effettuato un confronto dei profili di espressione proteica di tutti i ceppi cresciuti nelle due diverse condizioni analizzando separatamente la frazione proteica totale, quella di membrana e quella delle proteine escrete. Le modificazioni indotte sui profili di espressione proteica sono state valutate mediante SDS-PAGE e *Northern-blotting*.

I risultati ottenuti sugli esperimenti effettuati sulle piastre di 96 pozzetti hanno dimostrato che il trattamento combinato di antibiotico più SPEP riduce drasticamente la formazione del biofilm *in vitro* in tutti i ceppi batterici. La SPEP modifica drasticamente anche il profilo d'espressione delle proteine di membrana di tutti i ceppi studiati. Inoltre in presenza di SPEP si riscontrano cambiamenti significativi nella trascrizione del prodotto del gene *atl* (*S. aureus*) e del gene *atlE* (*S. epidermidis*), due adesine responsabili coinvolte nella prima fase dell'adesione batterica e nella stabilizzazione del biofilm maturo.

Precedenti studi del nostro laboratorio hanno dimostrato l'attività anti-biofilm di SPEP in *P. aeruginosa*. Pertanto si prevede di poter confermare un'attività di modulazione del *quorum sensing* anche in questa specie batterica. In tal caso l'uso combinato di SPEP e antibiotici potrebbe rappresentare in futuro una promettente strategia terapeutica nelle infezioni sostenute da biofilm.

Seconda sessione
Aspetti strutturali e funzionali di biofilm
batterici e fungini

Moderatori
Michele La Placa, Fabio Rossano

IL BIOFILM NELLA PATOGENESI DELLE INFEZIONI DA *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Lucilla Baldassarri

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Gli enterococchi, particolarmente *Enterococcus faecalis*, sono emersi negli ultimi anni quali importanti agenti di infezioni nosocomiali, principalmente del tratto urinario, ma anche di batteriemie ed endocarditi.

Solo recentemente la capacità di questo organismo di formare biofilm è stata identificata e caratterizzata; l'80% di ceppi di *E. faecalis*, vs. il 20% di *E. faecium*, isolati da fonti diverse è stata trovata in grado di formare biofilm, ma solo in risposta a stimoli precisi, quali la presenza di fonti aggiuntive di carboidrati e condizioni di stress. La formazione di biofilm è risultata tra i più probabili fattori di virulenza particolarmente nello sviluppo di endocarditi. Oltre a conferire resistenza, non geneticamente determinata, agli agenti antimicrobici, il biofilm di *E. faecalis* appare coinvolto direttamente nell'interazione con le cellule dell'ospite, e in grado di mediare sia la penetrazione in fagociti non professionali che la sopravvivenza in macrofagi professionali. Il meccanismo interessato, una endocitosi recettore-mediata, coinvolgerebbe la componente polisaccaridica batterica e i glicosaminoglicani presenti sulla superficie delle cellule dell'ospite. Dal punto di vista genetico, la formazione di biofilm appare legata alla presenza di un locus composto da quattro geni e denominato *bop* (*biofilm on plastic surfaces*), controllato da un regolatore trascrizionale la cui espressione è dipendente dai carboidrati disponibili nel milieu.

BASI MOLECOLARI DELLA PRODUZIONE DI BIOFILM IN STAPHYLOCOCCUS spp.

Stefania Stefani

Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Università degli Studi di Catania, Catania

E-mail stefanis@unict.it

Gli Stafilococchi sono i più comuni microrganismi patogeni delle infezioni associate a cateteri e/o a diversi corpi estranei usati nella pratica medica. Uno dei contributi maggiori al meccanismo etio-patogenetico di queste infezioni, risiede proprio nella capacità di questi microrganismi di formare biofilm su bio-superfici. Benché non del tutto delucidate, le basi molecolari del meccanismo di formazione del biofilm negli Stafilococchi mettono in evidenza che questo è un fenomeno biologico complesso e multifattoriale. L'abilità di formare biofilm richiede che vengano esplicate almeno due proprietà: la prima risiede nell'adesione del microrganismo ad una superficie; la seconda, che sia in grado di accumulare strati multipli di una sostanza detta *slime*, costituita da un esopolisaccaride detto PIA (polisaccaride intracellulare di adesione), composto da N-acetylglucosamina, legata con legami β -1,6, parzialmente deacetilata e carica positivamente, nella quale le cellule vengono racchiuse e, in qualche modo, protette dall'attacco del sistema immunitario e dagli antibiotici.

I geni biosintetici responsabili della produzione del PIA sono localizzati in un operon detto *icaADBC*, presente in entrambe le specie maggiori, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. La produzione del PIA è correlata con la patogenesi di questi microrganismi, tuttavia la sua presenza da sola non è sufficiente per la formazione di un biofilm: sono stati messi in evidenza diversi fattori addizionali indipendenti dalla espressione di *ica* stesso in entrambe le specie.

La complessa regolazione della formazione di biofilm, dipendente fortemente dalle condizioni ambientali e dalla concentrazione cellulare, dimostra quindi come esso abbia un ruolo importantissimo nella sopravvivenza del microrganismo conferendogli un vantaggio selettivo nell'eziologia delle successive infezioni.

LA LATTOFERRINA E GLI IONI FERRICI INFLUENZANO L'AGGREGAZIONE E LA FORMAZIONE DI BIOFILM IN *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Piera Valenti

Dipartimento di Medicina Sperimentale, II Università di Napoli

Streptococcus mutans, un batterio Gram-positivo immobile, è considerato il principale agente eziologico della carie dentale. Sebbene alcune ricerche suggeriscano che gli ioni ferrici possano essere importanti nello sviluppo della carie dentale, la funzione del Fe^{3+} e della lattoferrina (Lf) nella saliva è stata solo recentemente definita.

I risultati riportati in questo studio indicano che la saliva, contenente $Fe^{3+} < 0.1 \mu M$ aumenta l'aggregazione e la formazione di biofilm di *S. mutans*, mentre concentrazioni di $Fe^{3+} > 1 \mu M$ inibiscono entrambi i fenomeni. Pertanto, la formazione di aggregati e di biofilm, in *S. mutans* sono negativamente modulati dagli ioni ferrici presenti nella saliva.

Inoltre, la Lf, una proteina appartenente alla famiglia delle transferrine, in grado di chelare due ioni ferrici per molecola, è presente nella saliva, in condizioni fisiologiche, alla concentrazione di $20 \mu g/ml$ in forma apo. Apo-Lf è responsabile del notevole incremento dell'aggregazione e dello sviluppo del biofilm di *S. mutans*. In condizioni patologiche (gingiviti o periodontopatie), la Lf si trova, invece, nella forma completamente saturata in ferro, che, al contrario della apo-Lf, inibisce l'aggregazione e la formazione di biofilm di *S. mutans*.

Ne consegue che la Lf, unitamente alla disponibilità di ioni ferrici nella saliva, potrebbe avere un ruolo chiave nella protezione delle infezioni del cavo orale.

BHP (BAP HOMOLOGOUS PROTEIN) MEDIA L'INTERAZIONE DI STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS CON LA CITOCHERATINA 10

Ilaria Pezzali (a), Livia Visa (a), Maria Gabriela Bowden (b), Timothy Foster (c),
Pietro Speciale (a)

(a) *Dipartimento di Biochimica, Università di Pavia, Pavia*

(b) *Institute of Biosciences and Technology, Texas A&M University, Houston, Texas*

(c) *Department of Microbiology, Moyne Institute of Preventive Medicine, Trinity College,
Dublin*

Bhp è una proteina di *Staphylococcus epidermidis* covalentemente ancorata attraverso il classico motivo LPQTG alla superficie cellulare e che si presume abbia un ruolo nella formazione del biofilm. All'estremità N-terminale immediatamente dopo la sequenza segnale, Bhp comprende una regione A (aa 44-722) organizzata in un dominio tutto beta, topologicamente analogo al dominio extracellulare del recettore umano per le LDL e alle idrolasi glucidiche, e un grosso segmento formato da copie multiple di motivi ripetitivi disposti in tandem.

In questo studio si è esaminata l'interazione della regione A di Bhp con proteine della matrice extracellulare e scoperto che essa specificamente riconosce e lega la fibronectina e in misura più evidente la citocheratina 10 di topo (MK10), un componente fondamentale dei filamenti intermedi. Il legame di Bhp a MK10 ricombinante è risultato essere saturabile e inibibile con il dominio A di ClfB, l'adesina di *S. aureus* che lega il fibrinogeno e la MK10. Quest'ultima osservazione suggerisce la sovrapposibilità dei siti di legame di Bhp e ClfB su MK10. L'adesione di *S. epidermidis* RP62A a substrati di MK10 è correlata all'espressione di Bhp e appare dipendente dal tempo d'incubazione e dal numero di cellule impiegate. Inoltre l'attacco degli stafilococchi alla MK10 risulta essere specifico perché non inibito da un eccesso di proteine stafilococciche affacciate sulla superficie cellulare come SdrG, Aap, SesI e SesG né da proteine del siero come la fibronectina o il fibrinogeno; al contrario, l'interazione batterica con MK10 viene bloccata in maniera dose-dipendente da Bhp o ClfB o per aggiunta al mezzo d'incubazione di IgG isolate dal siero immune contro Bhp.

Viene prospettata la possibilità che Bhp abbia un ruolo nella colonizzazione stafilococcica degli epiteli.

UN SISTEMA MODELLO PER LO STUDIO DELLA FORMAZIONE DEI BIOFILM: IL BATTERIO LATTICO *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Lidia Muscariello (a), Carlo Marino (a), Cristiana Castaldo (a), Rosangela Marasco (b), Margherita Sacco (a)

(a) Dipartimento di Scienze Ambientali, II Università di Napoli, Caserta

(b) Dipartimento di Scienze della Vita, II Università di Napoli, Caserta

Il biofilm rappresenta un sistema biologico con un alto livello di organizzazione dove i batteri sono strutturati e organizzati in una comunità funzionale, che può essere formata da una singola specie o da diverse specie. La transizione delle cellule batteriche dalla forma planctonica a quella sessile è caratterizzata da profondi cambiamenti fisiologici, indotti da stimoli ambientali e geneticamente controllati. Studi recenti suggeriscono che la formazione di biofilm sia regolata da un sistema di regolazione a cascata in cui un ruolo rilevante è svolto da alcuni regolatori globali della trascrizione. Recentemente è stato dimostrato il coinvolgimento della proteina CcpA (*catabolite control protein A*) nella regolazione della formazione dei biofilm. La proteina CcpA è un regolatore globale che gioca un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo centrale del carbonio nei batteri Gram-positivi a basso contenuto di GC. Scopo della nostra ricerca è quello di studiare i geni coinvolti nella formazione di biofilm nel batterio lattico *Lactobacillus plantarum* LM3, un componente della microflora intestinale umana con proprietà probiotiche e per questo utilizzato in molti processi di conservazione e trasformazione alimentare. Le caratteristiche di questo batterio e il suo utilizzo nell'industria alimentare lo rendono un sistema modello interessante per gli studi sulla regolazione di pathways metabolici coinvolti nei processi di differenziamento.

Una ricerca in banca dati ha permesso l'identificazione di due ORF nel genoma di *L. plantarum* WCFS1, denominate *flm1* ed *flm2*, le cui sequenze aminoacidiche dedotte mostrano una significativa percentuale d'identità con la proteina BrpA (*biofilm regulator protein A*) di *Streptococcus mutans*. Abbiamo costruito due ceppi mutanti, denominati LM3-4 e LM3-5, recanti rispettivamente una delezione dei geni *flm1* ed *flm2*. Test di formazione di biofilm su superfici di polipropilene dimostrano una ridotta capacità di formare biofilm solo nel ceppo mutante LM3-4 rispetto al ceppo selvatico LM3, suggerendo il coinvolgimento della proteina Flm1 nella formazione di biofilm. Un'analisi trascrizionale ha inoltre dimostrato che l'espressione del gene *flm1* è attivata dalla proteina CcpA. Tale dato è supportato dalla ridotta capacità del ceppo *L. plantarum* LM3-2 (*delta-ccpA*) di formare biofilm suggerendo, quindi, il coinvolgimento del regolatore globale CcpA nel processo di formazione di biofilm.

Terza sessione
Biofilm in sistemi ambientali e industriali

Moderatori
Paolo Di Francesco, Raffaello Pompei

APPROCCI MULTIDISCIPLINARI ALLO STUDIO DEI BIOFILM FOTOTROFI IN AMBIENTE SUB-AEREO E ACQUATICO

Patrizia Albertano

Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata", Roma

E-mail: albertano@uniroma2.it

I biofilm fototrofi sono comunità complesse di microrganismi che colonizzano substrati solidi in ambiente sub-aereo e acquatico, interagendo sia con gli organismi eterotrofi a cui forniscono sostanza organica e ossigeno, sia con la fase acquosa e il substrato colonizzato da cui possono assorbire nutrienti che ne sostengono la crescita. All'interno dei biofilm si stabiliscono, così, microambienti caratterizzati da gradienti fisici e chimici in cui un ruolo fondamentale viene svolto dai composti esopolimerici (EPS) che ne costituiscono la matrice mucillaginosa grazie alla quale queste comunità microbiche, sostenute dall'attività fotosintetica, possono aderire e svilupparsi.

Biofilm fototrofi formati da cianobatteri associati ad altri microrganismi causano estesi danni alle superfici lapidee di monumenti e siti archeologici [Albertano & Urzi (1999) *Microb. Ecol.* 38: 244-252; Urzi & Albertano (2001) *Meth. Enzymol.* 336: 340-355], già di per sé già esposte all'azione combinata di fattori di degrado abiotici.

Biofilm fototrofi dominati da cianobatteri e diatomee si sviluppano anche negli impianti di depurazione di acque reflue [Albertano *et al.* (1999) *Arch. Hydrobiol., Algological Studies* 94: 13-24; Congesti *et al.* (2005) *Diatom Res.* 20 (2)] dove possono naturalmente rappresentare un sistema biologico di depurazione e dove la loro biomassa può essere applicata nel campo del biorimediazione degli effluenti.

Una illustrazione dei principali risultati sulla ecologia, struttura, diversità e funzionamento di tali comunità microbiche e dei metodi di analisi utilizzati consentirà di evidenziare caratteristiche comuni e differenze tra l'ambiente sub-aereo e quello acquatico e di sottolineare l'importanza di un approccio multidisciplinare allo studio dei biofilm fototrofi. Inoltre, accenni sull'applicazione di strumenti e metodi sviluppati nel corso dei progetti dedicati allo studio di queste comunità microbiche permetteranno di commentare le potenzialità di ricaduta di queste ricerche in campo ambientale e nel settore della conservazione del patrimonio culturale.

Questo lavoro è stato svolto con il contributo della Unione Europea nell'ambito del Progetto CATS (EVK4-CT2000-00028) e del Progetto PHOBIA (QLK3-CT2002-01938).

CARATTERIZZAZIONE E PERFORMANCE DI UN BIOFILM MICROBICO ADESO A GRANULI DI POMICE E AVENTE ATTIVITÀ DEGRADATIVA NEI CONFRONTI DEL TOLUENE

Alessandra Di Lorenzo (a), Mario Varcamonti (a), Palma Parascandola (b),
Rodolfo Vignola (c), Adriano Bernardi (c), Pasquale Saceddu (c), Raffaello Sisto (c),
Elisabetta de Alteriis (a)

(a) *Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università degli Studi
"Federico II", Napoli*

(b) *Dipartimento di Ingegneria Chimica e Alimentare, Università di Salerno,
Fisciano, Salerno*

(c) *EniTecnologie S.p.A, Monterotondo, Roma*

I biofilm microbici sono tradizionalmente impiegati per il trattamento delle acque reflue in impianti "a biofilm" (letti percolatori, reattori a dischi rotanti). Recentemente, anche nella decontaminazione delle acque di falda sono state proposte tecnologie basate sull'utilizzo di biofilm microbici: si tratta delle cosiddette biobarriere, da collocarsi *in situ*, perpendicolarmente al flusso d'acqua. Il sistema reattivo di una biobarriera è costituito dal biofilm che si origina dall'adesione, su di un supporto opportuno, della microflora autoctona presente nell'acqua di falda e avente capacità degradativa nei confronti del contaminante.

In questa presentazione, verrà illustrata la caratterizzazione e la prestazione di un biofilm microbico sviluppatosi su granuli di pomice in due biobarriere, allestite su scala di laboratorio, per la decontaminazione di un acqua di falda contenente toluene. Il sistema reattivo è rappresentato dalla microflora adesa a granuli di pomice contenuti in due mini-colonne. La pomice, roccia di origine vulcanica, è stata scelta come materiale di supporto per la sua elevata area superficiale, la facile reperibilità e il basso costo.

La caratterizzazione del biofilm sviluppatosi su granuli di pomice, nell'arco di 12 mesi, è stata effettuata mediante tre approcci complementari: l'osservazione al microscopio elettronico a scansione, la quantificazione della biomassa adesa e l'identificazione delle specie presenti nel biofilm, basata sull'analisi comparativa delle sequenze del DNA ribosomale 16S (rDNA). È stata messa in evidenza la complessa struttura del biofilm sviluppatosi, formato prevalentemente da *Rhodococcus erythropolis* e *Pseudomonas marginalis*, e l'efficienza di rimozione del toluene.

CARATTERIZZAZIONE CINETICA E MICROBIOLOGICA DI BIOFILM ANAEROBICI NEL RISANAMENTO *IN SITU* DI FALDE ACQUIFERE CONTAMINATE DA SOLVENTI CLORURATI

Federico Aulenta, Marco Petrangeli Papini, Mario Beccari, Mauro Majone
Dipartimento di Chimica, Università di Roma "La Sapienza", Roma

Gli idrocarburi clorurati alifatici, tra i quali il percloroetilene (PCE) e il tricloroetilene (TCE), sono largamente utilizzati come sgrassanti e solventi di processo in vari settori industriali. A seguito di improprie pratiche di utilizzo e smaltimento, queste sostanze sono divenute frequenti inquinanti delle falde acquifere. La contaminazione delle falde acquifere da solventi clorurati pone importanti rischi sul piano sanitario sia per l'elevata tossicità e persistenza nell'ambiente di tali sostanze sia perché le acque di falda rappresentano una importante risorsa idropotabile.

Recentemente sono stati isolati e caratterizzati alcuni microrganismi in grado di degradare anaerobicamente il PCE e il TCE attraverso un processo noto come "declorazione riduttiva". Tra questi, *Dehalococcoides* spp. è in grado di trasformare completamente il PCE fino al non tossico etilene e per tale motivo è promettente l'utilizzo di tale microrganismo in processi biologici per il biorisanamento di acque contaminate da PCE o TCE. La presenza di *Dehalococcoides*, all'interno di biofilm microbici adesi al materiale acquifero, è frequentemente riscontrata in siti storicamente contaminati da PCE o TCE. Di conseguenza, una possibile strategia per accelerare il biorisanamento di falde acquifere contaminate da solventi clorurati consiste nello stimolare *in situ* l'attività di *Dehalococcoides* mediante opportuna aggiunta di ammendanti e/o nutrienti.

Obiettivo di questo studio è la caratterizzazione di un biofilm declorante, costituito da *Dehalococcoides* spp., mediante analisi cinetica e l'ausilio di tecniche di biologia molecolare.

FORMAZIONE DI BIOFILM DI *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* SU SUPERFICI DI ACCIAIO

Fabrizio Cappa (a), Pier Sandro Cocconcetti (a, b)

(a) *Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza,*

E-mail: fabrizio.cappa@unicatt.it

(b) *Centro Ricerche Biotecnologiche, Cremona*

Lo *Streptococcus thermophilus* è una specie microbica largamente diffusa e utilizzata nelle produzioni casearie sia nelle colture naturali che nelle applicazioni industriali. In natura e nei sistemi alimentari, i microrganismi sono attratti verso le superfici dei solidi condizionati dalla presenza di elementi nutrizionali che possono essere sufficienti per la loro vitalità e crescita. Lo scopo di questo studio è stato di valutare la capacità dello *Streptococcus thermophilus* di formare la struttura di un biofilm sulla superficie dell'acciaio, poiché questo materiale è largamente utilizzato negli impianti alimentari industriali. La formazione del biofilm è stata studiata in un modello dove un filo di acciaio era immerso in un lento flusso di latte o terreno colturale M17. Lo sviluppo del biofilm era valutato per mezzo di osservazioni al microscopio a scansione a diversi tempi e il rilascio di cellule planktoniche era valutato per mezzo delle unità formanti colonie. Il ceppo di *S. thermophilus* PBV utilizzato in questo studio, isolato da una preparazione industriale di mozzarella, è caratterizzato dalla capacità di formare aggregati quando coltivato in brodo colturale. Inoltre il mutante spontaneo *S. thermophilus* PBV3, che mostra una ridotta idrofobicità cellulare e che ha perso le caratteristiche di aggregazione, è stato utilizzato nel corso degli esperimenti per valutare il diverso comportamento di PBV e PBV3 nella formazione di biofilm. Rilevanti differenze sono state osservate dopo 6 ore di inoculo del latte. Il ceppo PBV ha mostrato capacità di adesione al filo di acciaio e le cellule erano immerse in una matrice proteinaea, mentre le cellule del PBV3 non erano in grado di formare un biofilm. In particolare le cellule di *S. thermophilus* PBV erano ricoperte di caseine e della matrice del biofilm mentre il mutante spontaneo PBV3 non era circondato da materia organica.

Per confermare la specifica affinità dello *S. thermophilus* PBV ai componenti del latte, un esperimento è stato condotto utilizzando un filo di acciaio precedentemente ricoperto di caseine e poi immerso in M17 brodo e comparato con un filo di acciaio non ricoperto. Le osservazioni al SEM hanno rivelato la capacità dello *S. thermophilus* BPV nel formare una struttura di biofilm in presenza dei componenti del latte mentre un debole attacco di cellule senza la formazione è stata osservata sulla superficie di acciaio non pre-trattata con caseine. Il ruolo delle proteine associate alla parete cellulare nella formazione del biofilm è stato inoltre studiato con la creazione di un mutante del gene *priS* e la sua espressione è stata analizzata tramite RT-PCR.

Quarta sessione
Biofilm, patogenicità microbica
e antibiotico-resistenza

Moderatori
Sandro Ripa, Pietro E. Varaldo

BIOFILM E RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI

Gian Maria Rossolini

Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, Siena

Le infezioni in cui è coinvolta la presenza di biofilm microbici rappresentano una delle principali sfide per la medicina moderna. Tali infezioni sono tipicamente associate con la presenza di materiali estranei all'interno dell'organismo, ma la formazione di biofilm può svolgere un ruolo importante anche in altre infezioni. I biofilm sono comunità microbiche che crescono attaccate a superfici e che presentano una architettura caratteristica e proprietà fenotipiche molto diverse da quelle proprie dei microrganismi in fase planctonica. Una di queste proprietà è rappresentata dalla minore sensibilità ai farmaci antimicrobici, che rende problematica la chemioterapia anti-infettiva delle infezioni in cui è presente biofilm. In questa presentazione saranno illustrate le principali situazioni patologiche in cui la presenza di biofilm resistenti agli antibiotici comporta problemi di carattere clinico, e saranno discussi i meccanismi responsabili della ridotta sensibilità agli antibiotici dei biofilm microbici.

SVILUPPO DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN BIOFILM DI *ESCHERICHIA COLI* E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Claudia Zampaloni, Sandro Ripa

Dipartimento di Biologia M.C.A., Università di Camerino, Camerino

I biofilm batterici rivestono notevole importanza in campo sanitario in quanto caratterizzati da una drastica diminuzione della sensibilità dei microrganismi coinvolti in tale tipo di crescita a vari agenti antibiotici. La resistenza osservata nei biofilm non è genotipica, cioè portata da plasmidi, trasposoni o legata ad eventi mutazionali, ma piuttosto dovuta a strategie multicellulari e/o alla capacità di singole cellule interne al biofilm di differenziarsi in uno stato fenotipico protetto e tollerante l'azione antibiotica.

Quest'ultimo fenotipo di resistenza biofilm-specifico è stato il principale interesse della nostra attività di ricerca rivolta alla individuazione e caratterizzazione delle cellule capaci di differenziarsi come tolleranti all'interno del biofilm durante il trattamento antibiotico e di moltiplicarsi come tali esclusivamente nelle condizioni proprie della crescita sessile.

In particolare, biofilm monospecie di *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, due tra i batteri Gram-negativi maggiormente implicati nelle infezioni croniche da biofilm in dispositivi medici impiantabili (i.e. *E. coli* nelle infezioni del tratto urinario legate all'utilizzo del catetere) e in tessuti umani (i.e. *P. aeruginosa* nelle infezioni del polmone nei pazienti affetti da fibrosi cistica), sono stati investigati per la capacità di differenziare sotto-popolazioni tolleranti alla colistina (una polimixina).

I biofilm dei due microrganismi sono stati fatti crescere con il sistema *flow-chamber* e il loro sviluppo e sensibilità alla colistina è stato seguito attraverso microscopia confocale laser a scansione (CSLM) dopo opportuna marcatura fluorescente dei batteri investigati e colorazione con il kit live/dead. La valutazione dell'attività battericida della colistina è stata inoltre verificata con la conta delle cellule vive dopo piastratura del biofilm recuperato e in parallelo attraverso *cell-sorting*.

I risultati ottenuti mostrano che: nel corso del trattamento antibiotico piccole sottopopolazioni con una incrementata tolleranza alla colistina possono apparire all'interno di biofilm sia di *E. coli* che di *P. aeruginosa*; la localizzazione e l'attività di tali sottopopolazioni sono diverse nei due microrganismi e potrebbero riflettere il loro ruolo generale nel normale sviluppo del biofilm; una correlazione tra differenziazione cellulare legata all'organizzazione del biofilm e sviluppo della tolleranza antibiotica è stata quindi ipotizzata

BIOFILM FUNGINO E FARMACO-RESISTENZA: STATO DELL'ARTE E NUOVE EVIDENZE SUL PATOGENO EMERGENTE *TRICHOSPORON ASAHII*

Giovanni Di Bonaventura, Carla Picciani, Ilaria Spedicato, Raffaele Piccolomini
*Dipartimento di Scienze Biomediche, Laboratorio di Microbiologia Clinica, Università di
Chieti "G. d'Annunzio", Chieti*

Contrariamente ai biofilm di natura batterica, ampiamente descritti in letteratura, poco si conosce al riguardo di quelli di origine fungina. Recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato come le infezioni catetere-correlate sostenute da *Candida* spp. siano associate alla produzione di biofilm. Le infezioni fungine biofilm-associate sono frequentemente refrattarie alla terapia convenzionale per la comparsa di un fenotipo altamente resistente, probabilmente causato da una iper-regolazione, contatto-indotta, di sistemi attivi di efflusso. I biofilm prodotti da *Candida* spp. esibiscono una uniforme resistenza ad un esteso spettro di molecole comunemente impiegate in terapia, suggerendo l'esigenza di individuare molecole dotate di attività biofilm-specifica. In tal senso, le nuove classi di agenti antifungini quali le formulazioni lipidiche delle amfotericine e le echinocandine, dimostrando una caratteristica attività nei confronti di biofilm resistenti prodotti da *Candida* spp., si candidano per il trattamento di micosi sistemiche invasive.

Recentemente, è stata evidenziata l'importanza eziopatogenetica di *Trichosporon asahii*, un patogeno fungino opportunista "emergente" soprattutto nei pazienti neutropenici e immunodepressi. Sebbene il principale fattore di rischio per l'infezione sia rappresentato dalla condizione di neutropenia, recenti evidenze cliniche suggeriscono come anche la presenza di dispositivi protesici (cateteri urinari o venosi, grafts artero-venosi) possa svolgere un ruolo critico nella patogenesi dell'infezione da *T. asahii*. È dunque plausibile ipotizzare che *T. asahii*, al pari di altri funghi, sia in grado di aderire a superfici protesiche e, successivamente, di colonizzarle con associata produzione di biofilm. Le evidenze sperimentali da noi prodotte, seppur preliminari, depongono a favore di tale ipotesi. *T. asahii* esibisce una spiccata capacità adesiva al polistirene, colonizzando la superficie già dopo 30 min di incubazione. La quantità di biofilm prodotto aumenta in maniera esponenziale dopo le prime 24 h, per raggiungere la massima quantità dopo 72 h. L'analisi morfologica rivela come il biofilm sia costituito prevalentemente da cellule lievitiformenti e, in minima parte, da forme filamentose. Il biofilm prodotto da *T. asahii* risulta essere generalmente resistente all'azione *in vitro* di fluconazolo, voriconazolo, amfotericina B e caspofungina, esibendo tuttavia differenti livelli di resistenza. La capacità esibita da *T. asahii* nel produrre un biofilm altamente resistente alle molecole comunemente impiegate in terapia potrebbe render conto della elevata mortalità associata all'infezione.

MONITORAGGIO E DIAGNOSI DI INFEZIONI DA PROTESI

Marco Artini (a), Federica Poggiali (a), Vanessa Ripavecchia (a), Luigi Rizzo (b),
Laura Selan (a)

(a) *Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica “G. Sanarelli”, Università di Roma
“La Sapienza”, Roma*

(b) *Unità Operativa di Chirurgia Vascolare, Ospedale Sant’Andrea, Roma*

Uno dei principali rischi per la salute dei pazienti portatori di dispositivi medici impiantabili - come le protesi vascolari, ortopediche, e le valvole cardiache - è la colonizzazione della protesi da parte di batteri capaci di formare biofilm. Le caratteristiche principali di queste infezioni sono l’assenza di sintomatologia e l’enorme difficoltà di eradicazione; pertanto la diagnosi precoce potrebbe rivelarsi uno strumento efficace per la cura e la risoluzione di queste infezioni. La maggior parte di queste infezioni è causata da *Staphylococcus* spp. Abbiamo sviluppato un test immunoenzimatico basato su tecnologia ELISA per individuare anticorpi sierici IgM capaci di riconoscere antigeni polisaccaridici presenti nel biofilm formato da *Staphylococcus* spp. e abbiamo valutato la sua efficacia diagnostica in pazienti portatori di protesi ortopediche e vascolari contaminate da queste specie. Gli antigeni polisaccaridici sono stati estratti e purificati da un ceppo batterico depositato e brevettato. Mediante il test immunoenzimatico è stato dosato il titolo anti-IgM in 231 sieri di pazienti classificati nei seguenti gruppi:

68 sieri di pazienti portatori di protesi colonizzate da Stafilococco.

163 sieri di controllo suddivisi: sieri di pazienti con protesi non infetta (sostituita a causa di una precedente infezione da Stafilococco); sieri di pazienti con protesi non infette; sieri di soggetti sani; sieri di pazienti con protesi colonizzate da batteri diversi da Stafilococco.

I valori del test sono espressi in Unità Elisa (EU). Abbiamo definito un valore di cut-off per distinguere risultati positivi e negativi. Su ogni campione il test è stato ripetuto tre volte. I sieri dei pazienti con protesi colonizzate da Stafilococco hanno mostrato un alto titolo anticorpale (IgM) contro gli antigeni polisaccaridici rispetto a sieri di controllo. Sono stati ottenuti valori ELISA maggiori di 0,4 EU nel 94,13% nei sieri di pazienti con protesi ortopediche e vascolari contaminate da Stafilococco con una specificità del 98,08%; utilizzando un valore di cut-off maggiore di 0,35 EU i pazienti infetti sono risultati positivi al test ELISA nel 100% dei casi ma tra i negativi sono stati riscontrati 2% di casi falsi-positivi. I nostri risultati indicano che questo metodo può rappresentare un test diagnostico non invasivo altamente sensibile e specifico per le infezioni protesiche da *Staphylococcus* spp.

Poiché è un test molto semplice ed economico potrebbe essere utilizzato nella diagnosi clinica di routine per la prevenzione e per il monitoraggio dei pazienti sottoposti a trattamento medico o chirurgico per infezioni di protesi. Invasivo altamente sensibile e specifico per le infezioni protesiche da *Staphylococcus* spp.

DINAMICA DI FORMAZIONE DEL BIOFILM DI *HELICOBACTER PYLORI*

Rossella Grande (a), Emanuela Di Campli (a), Soraya Di Bartolomeo (a), Tonino Traini (b),
Luigina Cellini (a)

(a) Dipartimento di Scienze Biomediche, Università “G. d’Annunzio”, Chieti

(b) Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche, Università “G. d’Annunzio”, Chieti

I biofilm, comunità microbiche organizzate immerse in una matrice idratata, si sviluppano come possibile strategia di sopravvivenza microbica allo stress.

Helicobacter pylori, patogeno gastroduodenale, è capace di sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli attraverso lo stato vitale non coltivabile (VBNC) assimilabile alla popolazione dei persister che costituisce quella parte del biofilm eterogeneo responsabile dell’elevata resistenza agli antibiotici.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare la capacità di *H. pylori* di formare biofilm *in vitro* su una superficie di polistirene. A tale proposito, sono state valutate la vitalità e le differenti morfologie cellulari in esso presenti, unitamente con l’espressione dei geni *luxS* e *rpoD* coinvolti nel quorum-sensing e nella specificità trascrizionale, rispettivamente.

Sono stati utilizzati due ceppi clinici, caratterizzati per la sensibilità ai farmaci impiegati comunemente nella terapia e per i principali fattori di virulenza, e un ceppo di riferimento internazionale *H. pylori* ATCC 43629.

La presenza di cellule riunite in grandi cluster, immersi in una abbondante matrice, è stata registrata dopo 2 giorni di incubazione delle colture sessili senza agitazione. A questo punto di controllo, le colture sessili, osservate con la colorazione vitale Live/Dead Kit, presentavano una omogenea fluorescenza verde con poche cellule danneggiate rosse al centro degli aggregati di maggiori dimensioni. Cellule coccoidi, con un aspetto “raggrinzito”, osservate mediante microscopia elettronica a scansione, rappresentavano la morfologia predominante presente tra le cellule batteriche nella struttura del biofilm.

Lo scenario delle colture sessili a 7 giorni era caratterizzato da una rete di piccoli aggregati di cocci e bastoncini vitali.

In colture sessili invecchiate di *H. pylori*, la morte cellulare, valutata mediante Live/Dead Kit, si verificava in cellule singole o raggruppate in micro-colonie in cui batteri degenerati erano localizzati all’interno degli aggregati. La massima espressione dei geni *luxS* e *rpoD*, valutata mediante MRT-PCR tra la popolazione batterica sessile, è stata rilevata dopo 2 giorni con una significativa riduzione nei successivi controlli.

Nessuna differenza nell’espressione genica e nella formazione del biofilm è stata registrata tra i differenti ceppi esaminati.

Questi dati sottolineano il comportamento dinamico della popolazione di *H. pylori* in cui il microorganismo esprime autentiche strategie per bilanciare la sua diffusione all’esterno e all’interno dell’ospite.

AUMENTO DEI FATTORI DI VIRULENZA MEDIATI DA SVILUPPO IFALE IN CEPPI DI *CANDIDA ALBICANS* RESISTENTI AI FARMACI ANTIFUNGINI

Letizia Angiolella (a), Antonietta Bonito (a), Cecilia Testa (a), Alessandra Ciocci (a), Anna Rita Stringaro (b), Laura Toccaceli (b), Antonella Torosantucci (c), Paola Chiani (c), Anna Teresa Palamara (a)

(a) *Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università di Roma "La Sapienza", Roma*

(b) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Candida albicans, fungo dimorfo, patogeno opportunisto, in determinate condizioni può causare infezioni, che vanno dalle infezioni superficiali ad infezione di tipo sistemico. L'intensivo uso clinico di azoli sia in terapia che in profilassi favorisce la formazione di ceppi resistenti, l'azione fungistatica degli azoli facilita adattamenti genetici che portano alla formazione di isolati clinici farmaco resistenti che coinvolgono diversi meccanismi che vanno dall'alterazione dell'*uptake* del farmaco ai cambiamenti di permeabilità, all'aumento delle pompe di efflusso. Recenti studi condotti *in vivo* hanno mostrato un insospettato aumento della virulenza in ceppi resistenti di *C. albicans*. La capacità di un microrganismo di aderire alle superfici è uno dei più importanti fattori della patogenesi. Diversi autori hanno messo in evidenza che la capacità dei funghi patogeni ad aderire alle superficie e formare biofilm è fortemente correlato con la morfogenesi, la virulenza e la resistenza ai farmaci antifungini. Per la formazione di un biofilm stabile sono probabilmente richiesti cambiamenti nella morfogenesi che coinvolgono sia modificazioni strutturali della parete cellulare che modificazioni della resistenza ai farmaci. Da un'analisi di tutte queste osservazioni il nostro obiettivo è stato quello di chiarire se isolati clinici di *C. albicans* divenuti farmacologicamente resistenti presentino modificazioni strutturali della parete cellulare, alterazioni nella morfogenesi, nell'adesione e nella formazione di biofilm. Al fine di individuare il significato funzionale della resistenza ai farmaci antimicotici e studiare i meccanismi coinvolti nella virulenza. Mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali antimannoproteina e antiglicano è stata valutata la presenza di eventuali modificazioni strutturali della parete cellulare inoltre è stata valutata l'invasione in agar, l'aderenza su plastica e la formazione di biofilm mediante osservazione al microscopio e metodo colorimetrico basato sulla riduzione di un sale di tetrazolio XTT, per monitorare l'attività metabolica delle cellule all'interno del biofilm in ceppi resistenti di *C. albicans*. I risultati ottenuti hanno evidenziato modificazioni morfologiche con aumento delle dimensioni, alterazioni della formazione del setto e dell'organizzazione della parete cellulare con una diversa distribuzione sia della componente mannanica che glucanica dello strato più esterno della parete cellulare, un significativo aumento della filamentazione associato con un aumento dell'aderenza e un aumento della formazione di biofilm nei ceppi resistenti di *C. albicans*. I dati ottenuti dimostrano che ceppi di *C. albicans*, farmacologicamente resistenti possono essere caratterizzati da un significativo aumento di alcuni fattori di virulenza che possono svolgere un ruolo chiave nell'aumento della patogenesi.

Quinta sessione
Approcci terapeutici innovativi
alle infezioni delle alte vie respiratorie
sostenute da biofilm microbici:
evidenze microbiologiche e morfo-funzionali

Moderatori
Giovanni Fadda, Giuseppe Nicoletti

EFFICACIA DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA SEQUENZIALE NELLE INFEZIONI DELLE ALTE VIE RESPIRATORIE SOSTENUTE DA BIOFILM MICROBICI: EVIDENZE MICROBIOLOGICHE E MORFO-FUNZIONALI

Giovanni Fadda (a), Alberto Macchi (b), Gian Carlo Schito (c)

(a) Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

(b) Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

(c) Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Genova, Genova

È stata valutata l'efficacia di tiamfenicolo glicinato acetilcisteinato (Fluimucil antibiotico®) in terapia sequenziale (intramuscolare-aerosol) nell'eradicazione di infezioni ricorrenti delle alte vie aeree dovuti a presenza documentata di biofilm. In 10 pazienti con patologia cronica o riacutizzata delle alte vie aeree veniva eseguito tampone da sede patologica e inviato in terreno di trasporto all'Istituto di Microbiologia di Genova. È stato inoltre effettuato un prelievo biotico dalle strutture interessate e i campioni fissati in glutaraldeide 1-3% sono stati inviati all'Istituto di Microbiologia dell'Università Cattolica di Roma. I pazienti sono stati quindi sottoposti a terapia con Fluimucil antibiotico® da 500 mg 1 fiala per 2 i.m. il primo giorno e successivamente una fiala per 2 al di per aerosol, per un totale di dieci giorni. I soggetti arruolati sono stati ricontrollati dopo 15 giorni dall'inizio della terapia e dopo 6 mesi. Contestualmente è stato eseguito tampone per coltura, e, in presenza di persistente sintomatologia, ulteriore prelievo biotico. In tutti i casi l'analisi colturale ha evidenziato popolazioni microbiche miste o ha dato origine allo sviluppo di una sola specie patogena (*S. aureus*). L'attività *in vitro* di tiamfenicolo sui germi isolati è stata determinata utilizzando microdiluizioni in brodo Mueller-Hinton e tutti i batteri saggiati si sono rivelati squisitamente sensibili al farmaco. Lo screening per la ricerca della capacità di produrre biofilm *in vitro* è stato condotto utilizzando i vari ceppi considerati potenziali patogeni. La sintesi di glicocalice è stata evidenziata impiegando il metodo già descritto in precedenti lavori e tutti gli esperimenti sono stati ripetuti 5 volte. I ceppi di *S. pyogenes* disponibili e gli altri isolati non hanno mai dimostrato capacità di dar luogo a sintesi di biofilm nelle condizioni adottate. Al contrario 2 dei 5 ceppi di *S. aureus* studiati hanno sintetizzato importanti quantità di biofilm che sono stati evidenziati con facilità dalla tecnologia di colorazione utilizzata. Chiara evidenza di biofilm prodotti *in vivo* e illustrati da vasta iconografia microfotografica sono stati riscontrati nei preparati fissati delle biopsie provenienti da 3 pazienti (2 *S. aureus* e 1 *S. pyogenes*). L'analisi dei campioni ottenuti post-trattamento ha dimostrato che la terapia sequenziale con Fluimucil antibiotico ha condotto nella totalità dei casi studiati a completa eradicazione dei patogeni originariamente presenti evidenziando come tiamfenicolo in associazione con N-acetilcisteina sia in grado di eliminare gli agenti eziologici di infezioni delle alte vie respiratorie anche quando *in vivo* essi producono biofilm, condizione che aumenta la resistenza fenotipica dei patogeni in causa.

PRIMI RISULTATI CLINICI DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA SEQUENZIALE NELLE INFEZIONI DELLE ALTE VIE RESPIRATORIE ASSOCIATE A BIOFILM MICROBICI

Giovanni Fadda (a), Alberto Macchi (b), Gian Carlo Schito (c)
(a) Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
(b) Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese
(c) Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Genova, Genova

Scopo dello studio

Valutare l'efficacia e la tollerabilità del tiamfenicolo glicinato acetilcisteinato (TGA; Fluimucil antibiotico®), in terapia sequenziale, in pazienti affetti da infezioni batteriche ricorrenti delle alte vie respiratorie dovute a biofilm.

Pazienti e schema

10 pazienti di ambo i sessi, con diagnosi clinica e microbiologica di infezione batterica ricorrente acuta o subacuta delle alte vie respiratorie sono stati sottoposti ad una visita pre-trattamento. Per essere ammessi allo studio la diagnosi clinica doveva essere confermata dall'isolamento (tampone da sede patologica) di germi capaci di produrre biofilm e dall'evidenza fotografica (microscopio elettronico a scansione) della presenza di biofilm nel campione biotico.

I pazienti con le suddette caratteristiche, sono stati trattati con TGA in terapia sequenziale (1° giorno, 2 fiale da 500 mg i.m.; 2° giorno e successivi, 2 fiale da 500 mg per aerosol, per un totale di 10 giorni). Gli stessi sono stati sottoposti ad ulteriore controllo clinico e batteriologico, 15 giorni dopo l'inizio della terapia e dopo 6 mesi.

Risultati e conclusioni

3/10 pazienti, 2 affetti da faringotonsillite e un terzo affetto da adenoidite, selezionati sulla base dei criteri di inclusione sono stati ammessi al trattamento con TGA in terapia sequenziale i.m. e aerosol. Paziente n. 2: 18 anni, donna non fumatrice, affetta da anni da frequenti episodi di faringotonsillite acuta con iperpiressia. Paziente n. 3: 20 anni, maschio fumatore da anni con frequenti episodi di faringotonsillite acuta con odinofagia e iperpiressia. Paziente n. 5: 40 anni, maschio non fumatore affetto da frequenti episodi annuali di adenoidite acuta e rinosinusite mucopurulenta.

Alla fine del trattamento è stata rilevata la completa scomparsa dei segni e dei sintomi presenti all'arruolamento. Questa condizione si è mantenuta costante per tutto il follow-up (6 mesi). Agli stessi tempi, la guarigione clinica è stata confermata dall'eradicazione dei patogeni presenti. La tollerabilità del TGA è stata ottima.

La presente sperimentazione riveste grande importanza in ambito clinico poiché dimostra come tiamfenicolo in associazione con N-acetilcisteina sia in grado di eliminare gli agenti eziologici di infezioni cronicizzanti delle alte vie respiratorie anche quando, *in vivo*, essi producono biofilm. Tale capacità, anticipata da dati ottenuti *in vitro*, è stata ora confermata anche nella realtà clinica.

Sesta sessione

Prevenzione e disgregazione di biofilm batterici

Moderatori

Franco Paradisi, Rosalba Tufano

NUOVE STRATEGIE PER PREVENIRE LO SVILUPPO DI BIOFILM MICROBICI E OTTENERNE LA DISGREGAZIONE

Gianfranco Donelli (a), Iolanda Francolini (b), Emilio Guaglianone (a), Jeff B. Kaplan (c), Paul Stoodley (d)

(a) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Chimica, Università di Roma "La Sapienza", Roma

(c) Department of Oral Biology, New Jersey Dental School, Newark, New Jersey, USA

(d) Center for Genomic Sciences, Allegheny-Singer Research Institute, Pittsburgh, PA, USA

La definizione convenzionale di biofilm microbico è basata essenzialmente sulle caratteristiche strutturali di queste comunità di cellule procariotiche a crescita sessile che, a livello microscopico, risultano costituite da microcolonie microbiche incluse in una matrice polisaccaridica (*slime*) da esse stesse prodotta. Queste strutture non appaiono tuttavia compatte presentando all'interno numerosi spazi interstiziali che fungono da "microcanali" e che hanno lo scopo di favorire il passaggio di nutrienti, il rilascio di prodotti catabolici e la diffusione di molecole di segnale intercellulari, svolgendo un ruolo fondamentale nel controllo del processo di formazione dei biofilm. È stato ad esempio, dimostrato che *Pseudomonas aeruginosa*, per realizzare una appropriata struttura tridimensionale del biofilm, necessita del sistema *las* di *quorum sensing*, il quale controlla la sintesi della molecola segnale *N*-(3-oxododecanoyl)-L-omoserina lattone.

Allo scopo di prevenire lo sviluppo di biofilm microbici sono state adottate strategie innovative diverse, basate sia sull'utilizzo di farmaci antibiotici e composti antisettici che sull'impiego di agenti capaci di interferire con i sistemi di *quorum sensing*. Un altro interessante approccio è quello che prevede il ricorso a sostanze con attività enzimatica capaci di disgregare la matrice polisaccaridica prodotta dai microrganismi.

Per quanto riguarda il primo approccio, la molecola oggetto della nostra ricerca è stata l'acido usnico, un dibenzofurandione prodotto dai licheni, già noto per la sua attività contro batteri Gram-positivi, inclusi ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti. La valutazione dell'attività dell'acido usnico nel prevenire la formazione di biofilm ha previsto l'intrappolamento di tale composto in una matrice poliuretanicca basica da noi sintetizzata. Studi di adesione e crescita microbica sul polimero trattato hanno evidenziato che l'acido usnico inibiva la formazione di biofilm da parte di *Staphylococcus aureus* per un periodo pari ad almeno 6 giorni. Inoltre, il farmaco, pur permettendo la formazione di biofilm di *Pseudomonas aeruginosa*, ne influenza significativamente la morfologia (spessore e rugosità) indicando la sua capacità di interferire con i fenomeni di "quorum-sensing".

Come agente disperdente di biofilm stiamo sperimentando, nell'ambito di un accordo di collaborazione tra l'Istituto Superiore di Sanità e l'Università del New Jersey, l'enzima *N*-acetil glucosamminidasi (Dispersin B[®]), che ha già dimostrato un'elevata attività nei riguardi dei polisaccaridi dello *slime* di *Staphylococcus epidermidis*. La nostra ricerca prevede l'adsorbimento di tale agente, congiuntamente ad un opportuno antibiotico, su matrici polimeriche, quale promettente approccio per lo sviluppo di dispositivi medici anti-biofilm.

BIOMATERIALI A RILASCIO DI AGENTI ANTIMICROBICI PER LO SVILUPPO DI DISPOSITIVI MEDICI ANTI-BIOFILM

Iolanda Francolini (a), Antonella Piozzi (a), Valeria Ruggeri (a, b),
Mariangela Bellusci (a, b), Gianfranco Donelli (b)

(a) *Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Roma*

E-mail: iolanda.francolini@uniroma1.it

(b) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

I notevoli progressi nel campo dei dispositivi medici impiantabili concretizzati negli ultimi decenni sono in parte da attribuire al crescente sviluppo di nuovi più idonei materiali sintetici. Tuttavia, al loro impiego possono risultare ancora associate gravi complicanze infettive. Infatti, l'impianto temporaneo o permanente nell'organismo di dispositivi, quali cateteri vascolari e cateteri urinari, ne espone le superfici alla colonizzazione da parte di specie microbiche diverse, a seconda del distretto corporeo, con formazione di biofilm microbico. I biofilm sono responsabili di un'ampia varietà di infezioni nosocomiali in quanto i microrganismi che crescono in biofilm risultano maggiormente resistenti alle terapie antibiotiche cui i pazienti vengono sottoposti. Tra le diverse specie microbiche responsabili, le più comuni risultano essere batteri Gram positivi (stafilococchi) e lieviti (candide).

Al fine di sviluppare biomateriali polimerici capaci di inibire la colonizzazione microbica e la formazione di biofilm sono state messe appunto diverse strategie. L'adsorbimento su matrici polimeriche di una o più specie antimicrobiche (cefamandolo nafato, rifampicina, amoxicillina e vancomicina) o di specie antifungine (fluconazolo) sono stati alcuni approcci da noi perseguiti. In particolare, a polimeri con gruppi funzionali diversi (carbossilici, amminici, solfato e idrossilici) sono stati adsorbiti antibiotici opportunamente selezionati, allo scopo di instaurare interazioni chimico-fisiche specifiche tra matrice polimerica e farmaco. In questo modo è stato possibile ottimizzare sia le quantità di farmaco adsorbite dal polimero che quelle rilasciate nel tempo. Il miglior sistema sperimentale polimero-antibiotico da noi finora realizzato è costituito da un polimero basico (poliuretano) trattato con un antibiotico acido (rifampicina); tale sistema è risultato in grado di inibire per 8 mesi la colonizzazione di *Staphylococcus epidermidis*. Per quanto riguarda l'impiego dell'antifungino fluconazolo, dato il suo carattere idrofobico e la sua limitata solubilità in ambiente acquoso, esso è stato intrappolato in un poliuretano idrofobico insieme ad albumina quale agente porogeno. Tale approccio ha permesso la realizzazione di un biomateriale capace di inibire la formazione di biofilm di *Candida albicans* per 8 giorni.

Abbiamo infine sviluppato un approccio sperimentale che ha previsto la modifica superficiale di una matrice poliuretanicca, mediante salificazione di gruppi funzionali specifici con metalli pesanti (Ag^+ , Cr^{2+} , Fe^{3+}) avanti note proprietà antibatteriche, tra i quali l'argento è risultato il più attivo. Il successivo adsorbimento sulla matrice così modificata, dell'antibiotico ciprofloxacina, ha permesso di ottenere un biomateriale antibiofilm la cui attività bivalente può permettere di ovviare al possibile instaurarsi di antibiotico-resistenze.

PRODUZIONE DI BIOFILM BATTERICI SU SUBSTRATI IDROFOBICI E INIBIZIONE DELL'ADESIONE MEDIANTE RAMNOLIPIDI

Elena Di Mattia, Francesco Canganella

Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

La predilezione dei microrganismi a vivere in comunità sessili poste all'interfaccia solido-liquida è ricorrente nello studio dei microambienti. Le ricerche condotte hanno dimostrato che la crescita del biofilm può essere utile nelle biotecnologie ambientali, ma è spesso deleteria in ambito industriale alimentare e in campo medico. Nella ricerca applicata è quindi in crescente aumento l'interesse per gli studi sul controllo dell'adesione cellulare e della formazione dei biofilm su superfici substrato di tipo idrofobico e idrofilico sia di natura biotica che abiotica.

Diversi studi condotti avvalorano l'ipotesi che le interazioni idrofobiche possano giocare un ruolo centrale nel determinare l'entità delle interazioni adesive delle cellule con le diverse superfici-substrato dell'interfaccia, definita come una fase di confine tra due fasi di un sistema eterogeneo liquido-liquido o liquido-solido in cui le molecole organiche costituiscono spesso un film chimico condizionante.

I biosurfattanti, molecole con proprietà tensioattive prodotte dai microrganismi al fine di regolare proprio le interazioni delle cellule all'interfaccia, essendo talvolta rilasciati dalla cellula batterica nella fase acquosa, possono essere film condizionanti incontrando una superficie-substrato. I ramnolipidi, biosurfattanti costituiti da domini polari-idrofilici e parti apolari-idrofobiche determinano la formazione di film condizionanti con proprietà chimiche diverse, e orientandosi in base al carattere idrofobico e idrofilico della superficie-substrato, possono mediare l'adesione delle cellule batteriche favorendo, o meno, la formazione del biofilm.

In questo ambito di ricerca sono stati condotti alcuni esperimenti preliminari per valutare la produzione di biofilm da parte di ceppi batterici, di specie note di riferimento, su superfici-substrato idrofobiche diverse come l'acciaio, il polistirene e il lattice siliconizzato dei cateteri urinari. È stato inoltre condotto uno studio per indagare le possibilità di utilizzo di miscele ramnolipidiche come film condizionanti di rivestimento idonei a prevenire la formazione di biofilm inibendo l'adesione cellulare.

Il lavoro svolto, pur limitatamente a risultati preliminari può suggerire la possibilità di utilizzare biosurfattanti prodotti da *P. aeruginosa* per controllare l'adesione e la formazione di biofilm batterici da parte di *E. coli* sulla superficie idrofobica del lattice dei cateteri urinari di uso commerciale.

INFLUENZA DI N-ACETILCISTEINA SULLA PRODUZIONE DI BIOFILM E CORRELAZIONE CON L'ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN STAFILOCOCCI COAGULASI-NEGATIVI

Loretta Bastianini (a), Vincenzo Cuteri (b), Anna Rita Attili (b), Silvia Preziuso (b),
Maria Luisa Marenzoni (c), Camillo Pieramati (c), Carlo Valente (c)

(a) *Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Perugia*

(b) *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Camerino*

(c) *Dipartimento di Patologia Diagnostica e Clinica Veterinaria, Università di Perugia*

Molti stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) possono colonizzare materiali plastici formando biofilm pluristratificati e causando nuove infezioni chiamate “polymers linked to chronic infections”; essi costituiscono perciò un rischio significativo per pazienti che necessitano di protesi cardiache e vascolari, pacemaker e altri dispositivi medici invasivi. Tale rischio può essere contenuto mediante l'utilizzo di antibiotici, la cui efficacia non è però costante.

Scopo dello studio è stato valutare la correlazione tra produzione di biofilm e sviluppo di antibiotico-resistenza da parte di CNS e valutare l'effetto di N-acetilcisteina (NAC), sostanza mucolitica e antibatterica non antibiotica, sulla produzione di biofilm.

A tale scopo sono stati utilizzati 11 *Staphylococcus epidermidis*, 2 *S. xylosus* e 2 *S. homini*; come negativo è stato impiegato *Micrococcus varians*. NAC commerciale è stata applicata alle concentrazioni di 1 - 0,1 - 0,01 mg/ml in tre diversi momenti: contemporaneamente alla semina batterica (T0), a 6 ore (T1) e a 24 ore (T2) dalla semina. Prima e dopo il trattamento con NAC è stata inoltre valutata la sensibilità a 20 antibiotici secondo i metodi Kirby-Bauer e MIC. I ceppi sono stati suddivisi in non-aderenti, debolmente aderenti e fortemente aderenti sulla base della densità ottica del biofilm prodotto.

I risultati, analizzati mediante Fisher's exact test, hanno dimostrato che NAC può inibire significativamente ($P < 0,001$) la formazione di biofilm. Gli effetti di NAC sono dose-correlati, con percentuali di inibizione 47,0%, 35,6% e 27,9% alle dosi rispettivamente di 1, 0,1 e 0,01 mg/ml a T0. Gli effetti di NAC sono anche tempo-correlati, poiché sono risultati significativi a T0, piuttosto limitati a T1 e nulli a T2, quando il biofilm è completamente maturo. Nessuna correlazione è stata evidenziata tra produzione di *slime* e antibiotico-resistenza, eccetto che per il cloramfenicolo, verso cui ceppi produttori di *slime* apparivano più resistenti ($P \leq 0,05$). Non è stata osservata alcuna differenza di MIC anche tra ceppi con diversa produzione di *slime*, eccetto che per il cloramfenicolo, verso il quale i ceppi non-aderenti mostravano MIC maggiore ($P \leq 0,01$). Nessuna differenza è stata infine rilevata tra gruppi con diverse sensibilità e MIC per differenti antibiotici, eccetto che per la MIC di Trimethoprim/Sulfametoxazolo, in cui livelli intermedi di MIC mostravano valori più elevati ($P \leq 0,05$).

NAC ha quindi effetto sulla produzione di biofilm incompleti indipendentemente dalla sua concentrazione e solamente se applicata nelle prime 6 ore di crescita batterica; essa possiede attività anti-biofilm *in vitro* e potrebbe essere d'ausilio nella terapia combinata con agenti antimicrobici convenzionali nella prevenzione della produzione di biofilm.

Sessioni poster

P1 NUOVE STRATEGIE ANTI-BIOFILM BASATE SULLA APPLICAZIONE DI CAMPI ELETTRICI ED ELETTROMAGNETICI

Marco Artini (a), Federica Poggiali (a), Stefano Quadri (b), Vanessa Ripavecchia (a),
Laura Selan (a)

(a) *Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica “G. Sanarelli”, Università di Roma
“La Sapienza”, Roma*

(b) *Mon.tel S.p.A, Sale Marasino, Brescia*

La colonizzazione batterica da biofilm sulla superficie di materiali e biomateriali può essere una fonte diretta e indiretta di infezioni per l'uomo. Ad esempio la contaminazione batterica delle lenti a contatto può dare vita a cheratiti (infezione diretta), mentre la disseminazione di frammenti di biofilm formato sui filtri dei condizionatori di aria può determinare lo sviluppo di infezioni delle vie respiratorie (infezione indiretta). Lo scopo di questo studio è stato identificare un metodo fisico che elimini il biofilm formato sulla superficie di materiali artificiali. A tal fine abbiamo confrontato l'effetto di tre prototipi basati rispettivamente sulla formazione di un campo elettrico (1000V) (CE), di un campo magnetico permanente (CMP), e sulla formazione di un campo magnetico variabile (CMV).

Abbiamo analizzato l'effetto delle modificazioni dei parametri caratteristici di queste tre apparecchiature, come l'intensità del campo elettrico, la lunghezza e la frequenza degli impulsi, su biofilm formati da alcuni ceppi batterici forti produttori di biofilm: due isolati clinici di *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* RP62A e *S. aureus* (ATCC259271). A tale scopo abbiamo permesso la crescita del biofilm su palline di polistirene e di polipropilene (3,6mm) incubate rispettivamente per 4/5/6/7 giorni con 10^6 CFU/ml di ciascun ceppo a 37°C in BHI. Abbiamo studiato l'efficacia anti-biofilm dei tre sistemi variando il grado di maturazione del biofilm, l'intensità di campo e il tempo di esposizione (4/8/12/18/24h). Dai risultati si evince che i biofilm prodotti da *S. epidermidis* spp vengono eliminati attraverso il trattamento con CMP e CMV se sottoposti per più di 24h a 78mT-86Hz, mentre l'azione del CMV si verifica a 4h e 78mT-1500Hz di esposizione. CE determina soltanto la completa eliminazione del biofilm prodotto da *S. epidermidis*. Invece – in tutte le condizioni studiate – il biofilm prodotto da *P. aeruginosa* viene ridotto ma non completamente eliminato.

Questi dati preliminari dimostrano l'efficacia del CMP e CMV sul biofilm. Ulteriori esperimenti basati sull'incremento del tempo di esposizione e sulla modulazione dell'intensità del campo, o sulla combinazione di entrambi i parametri, potranno confermare l'utilità di apparecchiature basate sull'applicazione di campi elettrici ed elettromagnetici per eliminare il biofilm da dispositivi usati sull'uomo o nell'ambiente ove l'uomo opera.

P2 I BIOFILM FOTOTROFI AD ATTIVITÀ BIODETERIOGENA DEGLI IPOGEI ROMANI

Laura Bruno, Simona Bellezza, Patrizia Albertano
Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata", Roma
E-mail: albertano@uniroma2.it

Le comunità fototrofe che si sviluppano nelle catacombe cristiane di Roma sono dominate da cianobatteri sciafili che, insieme a batteri, diatomee, alghe verdi e muschi formano "biofilm" su tutti i substrati lapidei in prossimità di una fonte luminosa. La formazione del biofilm è un processo complesso, non ancora completamente chiarito, in cui un ruolo cruciale è svolto da sostanze esopolimeriche, dalle proprietà colloidali, rappresentate prevalentemente da polisaccaridi ma anche da proteine e acidi nucleici. Gli esopolisaccaridi prodotti dai cianobatteri a livello delle guaine e delle capsule e quelli rilasciati nell'ambiente esterno, presentano spesso cariche negative, importanti sia per l'adesione al substrato sia per l'adsorbimento di ioni di varia natura. Queste caratteristiche unite alle modificazioni locali indotte a livello del substrato dall'attività metabolica di tali microrganismi, rendono i biofilm a cianobatteri particolarmente biodeteriogeni per i siti ipogei di particolare valore artistico. Tra i cianobatteri componenti la comunità microbica del biofilm sono, inoltre, spesso presenti specie 'calcificanti' caratterizzate da cristalli di carbonato di calcio precipitati a livello della guaina esopolimerica con conseguente sottrazione di Ca^{2+} dal substrato calcareo.

Al fine di studiare la composizione in specie dei biofilm a cianobatteri e di caratterizzarne la struttura e gli esopolisaccaridi prodotti, sono state condotte osservazioni in microscopia ottica ed elettronica accoppiate a tecniche citochimiche e biochimiche. Queste hanno consentito di identificare, a livello di genere e in alcuni casi di specie, i *taxa* di cianobatteri presenti nei biofilm, descrivere la loro citomorfologia e analizzare la natura degli esopolisaccaridi prodotti dall'intera comunità microbica. Le stesse tecniche sono state applicate anche a cianobatteri isolati e soggetti a condizioni sperimentali in coltura ottenendo così risultati utili alla interpretazione dei dati ricavati dai biofilm in situ. Inoltre, per indagare la diversità genetica dei vari *taxa* di cianobatteri e studiarne la filogenesi, sono state condotte indagini molecolari su isolati mediante il sequenziamento dei geni 16S rRNA e ITS e mediante PCR-fingerprinting genomico. Infine, per valutare le interazioni esistenti tra organismi fototrofi ed eterotrofi sono state effettuate analisi molecolari della diversità dei batteri e osservazioni in microscopia che stanno evidenziando strette interrelazioni tra le due componenti microbiche. I dati così ottenuti su queste comunità, affiancati da studi sull'ambiente in cui i biofilm si sviluppano e sulla loro capacità di mobilizzare ioni dai substrati lapidei stanno contribuendo non solo alla conoscenza della microflora degli ipogei, ma allo sviluppo di metodi di prevenzione e controllo del danno da essi prodotto.

Questo lavoro è stato svolto con il contributo della Unione Europea nell'ambito del Progetto CATS, contratto n. EVK4-CT2000-00028, e del MIUR, Progetto PRIN 2003.

P3 STUDIO DEI FATTORI CHE INFLUENZANO LA DINAMICA DI ADESIONE AD UNA SUPERFICIE DI ACCIAIO DI CEPPI DI *B. CEREUS* TERMOTOLLERANTI E PSICROTROFI ISOLATI DA ALIMENTI

Andrea Gianotti, Melania Vallicelli, Maria Elisabetta Guerzoni
Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Università di Bologna
E-mail: guerzoni@foodsci.unibo.it

Bacillus cereus è tra le maggiori cause di tossinfezioni o perdita di qualità organolettiche nei prodotti lattiero caseari e in prodotti trattati termicamente e refrigerati. L'evoluzione di strategie e di meccanismi in grado di consentire il superamento di stress legati ad ambienti ostili è cruciale alla sopravvivenza di questi microrganismi. Inoltre le spore di *B. cereus* sono note per possedere un'elevata capacità di aderire alle superfici di acciaio. Le cellule una volta adese alla superficie possono acquisire una maggior resistenza ai sanitizzanti.

Su due gruppi di ceppi di *B. cereus* (3 ceppi termotolleranti e 3 ceppi psicrotrofi) isolati da habitat alimentari e caratterizzati da diversi profili termici, è stata studiata sia l'affinità per superfici idrofobiche che la loro dinamica di adesione a "coupon" d'acciaio tramite microscopia elettronica.

I tre ceppi termotolleranti presi in considerazione si sono dimostrati capaci di crescere ad una temperatura che va dai 10 ai 60°C mentre per i ceppi psicrotrofi si può osservare un range di temperature di crescita che va dai 4 ai 42°C. Per quanto riguarda la capacità della specie di aderire alle superfici, uno dei fattori più importanti è l'idrofobicità di cellule o spore. A tale proposito è stato valutato l'effetto delle variabili pH, temperatura, attività dell'acqua (*A_w*) e concentrazione salina sull'idrofobicità delle spore dei sei ceppi. Indipendentemente dalle diverse caratteristiche di termotolleranza individuali l'idrofobicità aumenta con lo stress osmotico e acido e presenta due massimi alle temperature sovraottimali e subottimali (45° e 12°C). Infine, dallo studio della capacità di aderire alla superficie di un coupon di acciaio del ceppo CT30 (termotollerante) e il CP51 (psicrotrofo) è risultato che sia in soluzione tampone che in soluzione iperosmotica sono state rilevate poche spore adese al coupon e solo nelle fasi iniziali (24, 48, 72 ore). Tali spore inizialmente adese erano comunque incapaci di formare microcolonie cioè potenziali nuclei di aggregazione per la successiva formazione e sviluppo di biofilm. Diversamente, in condizioni ottimali (terreno nutritivo) si è evidenziata un'elevata concentrazione di spore adese. I ceppi considerati, pur essendo entrambi in grado di produrre appendici, hanno denotato una diversa dinamica di adesione ai coupon d'acciaio specialmente in un mezzo privo di nutrienti. Sono necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo che appendici di diversa morfologia rivestono nella dinamica di adesione di spore di *B. cereus*.

P4 STUDIO DELLA DINAMICA DI ADESIONE DI *E. COLI-GFP* AD UNA SUPERFICIE DI MATERIALE DA IMBALLAGGIO PER ALIMENTI IN FUNZIONE DI ALCUNI STRESS CHIMICO-FISICI

Andrea Gianotti (a), Fabrizio Cappa (b), Pier Sandro Cocconcelli (b),
Maria Elisabetta Guerzoni (b)

(a) *Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Università di Bologna*

E-mail: guerzoni@foodsci.unibo.it

(b) *Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

Mentre alcuni autori riportano che *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* K-12 e *Vibrio cholerae* formano biofilm solo nelle condizioni che consentono lo sviluppo altri, in parziale disaccordo, hanno mostrato come nel caso di *E. coli* O157:H7 il biofilm si forma solo in mezzi poveri di nutrienti.

Lo scopo di questo studio è quello di mettere a punto uno strumento analitico, basato sulla microscopia a fluorescenza, per lo studio della dinamica delle modificazioni morfologiche e della distribuzione di cellule tra fasi liquide e solide. In particolare l'impiego combinato di due ceppi di *E. coli-gfp* in grado di esprimere proteine fluorescenti con diversa emissione, ha mostrato buone potenzialità per lo studio delle interazioni tra microorganismi e superfici anche in rapporto all'esposizione a stress. Cellule soggette ad uno stress acido sub-letale danno origine in un tempo relativamente breve (< 8 ore) ad un biofilm in materiale da imballaggio per alimenti composto da policarbonato. Tale biofilm costituisce un sito di attrazione o superficie di ancoraggio per cellule di *E. coli* non stressate con una conseguente formazione di un'aggregazione compatta tra i due ceppi modificati e lo studio dell'immagine mostra l'esistenza di una matrice in grado di inglobare le cellule. La formazione di biofilm è favorita anche quando lo stress è costituito da un trattamento termico sub-letale (10 minuti a 55°C). Anche in queste condizioni si viene a determinare un'aggregazione compatta immersa in una visibile matrice probabilmente di natura polisaccaridica. L'adesione dei microrganismi alle superfici può costituire una contromisura ad eventi negativi come la mancanza di nutrienti o la presenza di sostanze antimicrobiche. È noto che all'interno del biofilm si selezionano fenotipi resistenti a sostanze antimicrobiche. Lo studio della dinamica di adesione ha permesso di ipotizzare un altro possibile meccanismo di selezione che potrebbe stare alla base della resistenza dei microrganismi agli stress in quanto cellule di *E. coli* trattate con nisina+EDTA, formano microcolonie compatte all'interno di un biofilm, già durante la fase di adesione. Questo presumibilmente rappresenta un'ulteriore possibilità di sopravvivenza per popolazioni che hanno subito uno stress. Il sistema, sembra essere sufficientemente sensibile per lo studio dei fenomeni di adesione, di cambiamenti morfologici in risposta a stress o a stimoli ambientali. Esso può costituire un supporto fondamentale per l'interpretazione della dinamica di risposta, della sopravvivenza e delle interazioni cellula-cellula in condizioni di limitazione di nutrienti e in seguito ad esposizione a stress che danno origine alla formazione di biofilm.

P5 INFLUENZA DEI NUTRIENTI E DELLE SUPERFICI ABIOTICHE NELLA FORMAZIONE DEL BIOFILM DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Angela Gioffrè, Manuela Caratozzolo, Santina Carnazza, Salvatore Guglielmino
Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Genetiche e Molecolari,
Università degli Studi di Messina, Messina
E-mail: sguglielm@unime.it

In risposta a determinati segnali ambientali, i batteri possono differenziare da una forma di vita planctonica all'esistenza in comunità adese ad una superficie, comunemente definite biofilm. In condizioni di disponibilità di nutrienti, le comunità microbiche formano complesse strutture tridimensionali in seguito alla produzione di una matrice esopolimerica.

I biofilm microbici rivestono una particolare importanza in campo sanitario; infatti, l'adesione sui biomateriali rappresenta una fase importante nel processo di infezione. In particolare, per la sua spiccata capacità di adesione ad un gran numero di superfici abiotiche, *Pseudomonas aeruginosa* è uno dei principali contaminanti di impianti biomedici. Malgrado siano stati chiariti molti aspetti della formazione di biofilm da parte di *P. aeruginosa*, poco è stato ancora investigato circa l'influenza della disponibilità di nutrienti e delle caratteristiche chimico-fisiche delle superfici abiotiche sull'adesione e l'induzione di geni specifici. Studi recenti hanno dimostrato che alcune proteine sono soggette ad *upregulation* o *downregulation* a seguito dell'adesione, suggerendo l'esistenza di un regulone attivabile dall'interazione con la superficie. Inoltre, su substrati polimerici chimicamente modificati la formazione di strutture simili a biofilm da parte di *P. aeruginosa* è drasticamente accelerata rispetto ai tipici processi di adesione batterica.

Obiettivo del presente lavoro è quello di investigare la capacità di formare biofilm di *P. aeruginosa* in condizioni di limitazione di nutrienti e in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche della superficie.

Dai nostri dati emerge che la carenza di fosfato conduce ad una significativa perdita di vitalità non compatibile con la formazione di biofilm. Anche in carenza di carbonio, le cellule non producono biofilm, malgrado siano vitali. Al contrario, è formato biofilm in carenza di azoto. Le prove effettuate su diverse superfici abiotiche rivelano che in carenza di carbonio non è formato biofilm su PVC e polistirene, mentre su PHMS irradiato, anche in assenza di nutrienti, si osservano in sole due ore strutture simili ai biofilm prodotti in condizioni ottimali dopo 1-3 giorni.

Dai risultati ottenuti è evidente che il contatto cellulare con alcuni tipi di superfici gioca un ruolo fondamentale nella formazione di biofilm, e, poiché questo si verifica in assenza di nutrienti, è supportata l'ipotesi di una possibile regolazione precoce superficie-dipendente. Si può concludere che per la formazione di biofilm in *P. aeruginosa* non sono strettamente necessari tutti i fattori nutrizionali, mentre appare indispensabile un surplus energetico. Inoltre, i dati riportati suggeriscono un verosimile ruolo attivo delle caratteristiche chimico-fisiche della superficie sull'espressione di geni precocemente coinvolti nello sviluppo di biofilm strutturati.

P6 BIOFILM FOTOTROFI IN AMBIENTI ACQUATICI: BIODIVERSITÀ ED ECOFISIOLOGIA

Antonella Guzzon, Francesca Di Pippo, Roberta Congestri, Patrizia Albertano
Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata", Roma
E-mail: albertano@uniroma2.it

I biofilm fototrofi che si sviluppano nell'impianto di depurazione delle acque reflue dell'aeroporto di Roma "Leonardo da Vinci" (Fiumicino, Italia) vengono studiati nell'ambito di un progetto europeo, allo scopo di sviluppare un modello unitario della loro struttura e funzionamento. A tal fine, i biofilm vengono campionati periodicamente dalle pareti della vasca di sedimentazione dell'impianto e messi in coltura in un prototipo di incubatore a quattro irradianze e a due temperature e velocità di flusso del mezzo di coltura. I biofilm sono analizzati a diversi stadi di sviluppo per la determinazione della composizione in specie dei fototrofi mediante osservazioni al microscopio ottico ed elettronico, la caratterizzazione chimica degli esopolisaccaridi di matrice mediante dicroismo circolare e HPLC, lo studio del processo di fotoacclimatazione mediante la registrazione di curve di Electron Transport Rate *versus* Irradianza e quantificazione dei pigmenti fotosintetici, e la valutazione della capacità di sottrazione di macronutrienti dal mezzo di coltura mediante Electron Spectroscopic Imaging e determinazioni spettrofotometriche di N e P.

L'analisi di queste comunità perifitiche sviluppatesi *in situ* mostrava una diversità elevata in cianobatteri e diatomee, mentre l'abbondanza relativa delle altre microalghe variava stagionalmente. In coltura, le osservazioni in microscopia hanno evidenziato una riduzione della diversità degli organismi fototrofi e variazioni composizionali indipendenti dalla composizione iniziale. Le analisi al dicroismo circolare hanno rilevato la presenza di acidi uronici nelle frazioni capsulari estratte dai biofilm allo stadio maturo, come confermato dai risultati dell'HPLC, suggerendo che la struttura polimerica dei polisaccaridi capsulari era disordinata. I biofilm in coltura erano in grado di acclimatarsi alle diverse irradianze sperimentali con i più alti valori di tasso di trasporto elettronico ottenuti nelle comunità allo stadio attivo e maturo di sviluppo alle intensità luminose più alte. Le caratteristiche fotosintetiche variavano, inoltre, con le diverse temperature e velocità di flusso del terreno sperimentate dai biofilm. La concentrazione dei pigmenti fotosintetici e fotoprotettivi veniva modulata in accordo con il processo di fotoacclimatazione e con lo sviluppo della biomassa fotosintetica. Concentrazioni significative di N e P venivano sottratte del mezzo di coltura e in parte accumulate intracellularmente. L'insieme dei dati ottenuti *in situ* e in coltura consentirà di valutare le potenzialità applicative dei biofilm stessi e di alcuni *taxa* di fototrofi nell'abbattimento di azoto e fosforo e come indicatori della qualità degli effluenti.

Si ringrazia l'Agenzia di Protezione Ambientale degli "Aeroporti di Roma", Fiumicino, per la fattiva collaborazione e l'accesso agli impianti. Questo lavoro è stato svolto con il contributo della Unione Europea, Programma 'Quality of Life', nell'ambito del progetto PHOBIA (PHOtotrophic Biofilm Application), contratto n. QLK3-CT2002-01938.

P7 ENVIRONMENTAL SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (ESEM): UTILIZZO E LIMITI NELLO STUDIO DEI BIOFILM

Riccardo Tombolino (a, c), Elodia Musu (b), Raffaello Pompei (a, c)

(a) *Sezione di Microbiologia Applicata, Università di Cagliari*

(b) *Dipartimento di Scienze della Terra, Università di Cagliari*

(c) *Consorzio Biotecne, Cagliari*

La microscopia elettronica ha rappresentato un potente strumento per lo studio delle strutture subcellulari e microbiche. Tuttavia, nell'applicazione di questa tecnica occorre considerare sempre la possibilità che la preparazione del campione possa introdurre variazioni nelle strutture cellulari e quindi artefatti. I campioni, infatti, devono essere fissati, disidratati, inclusi in resine, sezionati e 'colorati' con un film di materiale conduttivo.

Il problema degli artefatti può essere ovviato con l'utilizzo dell'ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscopy*) uno strumento che permette l'osservazione di campioni umidi in pressione variabile da 1Torr a 20Torr e in condizioni di umidità e temperatura controllata.

Nell'ESEM la camera porta campione è separata dalla colonna da un sistema multiplo di aperture che limitano la pressione (PLAs, *Pressure Limiting Apertures*): nella colonna permane il vuoto elevato mentre la camera è in grado di sopportare pressioni che possono raggiungere anche valori di 20 Torr. Gli elettroni secondari vengono rilevati da un rivelatore particolare che prende il nome di *Environmental Secondary Detector* (ESD).

La generazione più recente degli ESD, il *Gaseous Secondary Electron Detector* (GSED), fornisce un miglior discriminante contro i segnali degli elettroni parassitici.

L'ESEM viene utilizzato sempre di più in diversi campi della scienza dei materiali, ma il suo uso da parte dei biologi per esaminare cellule e tessuti nel loro stato idratato è ancora sporadico.

Sulla base delle esperienze reperibili in letteratura e di nostre prove con batteri e campioni ambientali, in questa relazione intendiamo riassumere i vantaggi e le limitazioni nell'utilizzo di questa tecnica avanzata nello studio dei biofilm microbici.

P8 EFFICIENZA DI ADESIONE E INVASIONE DI DIFFERENTI FORME MORFOLOGICHE DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *BURKHOLDERIA CENOCEPACIA* FERRO-MODULATE

Francesca Berlutti (a), Clara Morea (a), Andrea Battistoni (b), Serena Sarli (a),
Paola Cipriani (a), Fabiana Superti (c), Maria Grazia Ammendolia (c), Piera Valenti (d)
(a) Dipartimento Scienze di Sanità Pubblica, Università di Roma "La Sapienza", Roma
(b) Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata", Roma
(c) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(d) Dipartimento di Medicina Sperimentale, II Università di Napoli, Napoli

Pseudomonas aeruginosa e *Burkholderia cenocepacia* causano infezioni ad alta morbilità e mortalità in pazienti affetti da fibrosi cistica. È stato dimostrato che in questa patologia il contenuto di ferro disponibile nelle secrezioni mucose del tratto respiratorio è pari a 63×10^{-6} M, rispetto a 10^{-18} M rivelabile in condizioni fisiologiche.

L'elevata concentrazione di ferro nelle secrezioni mucose polmonari aggrava il quadro clinico, già compromesso, in questi pazienti affetti da fibrosi cistica, aumentando la virulenza microbica.

In questo studio si dimostra *in vitro* come una bassa concentrazione di ioni ferrici (1 μ M) inibisca in *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia* l'aggregazione e induca la mobilità. Viceversa, un'elevata concentrazione di ioni ferrici (10 e 100 μ M) induce l'aggregazione batterica e la formazione del biofilm già in fase fluida. L'eccesso di ferro, pertanto, è un segnale importante al quale *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia* rispondono aggregandosi e formando biofilm.

Inoltre, differenti forme morfologiche (libere, aggregate e biofilm) ferro-modulate, di *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia* mostrano differenti efficienze di adesione e invasione testate in una linea cellulare derivante da carcinoma dell'epitelio bronchiale (A549). Rispetto alle capacità adesive e invasive delle forme microbiche libere, gli aggregati e il biofilm di *P. aeruginosa* pur aderendo maggiormente alle cellule mostrano una diminuita efficienza di invasione, mentre quelli di *B. cenocepacia* invadono maggiormente le cellule dell'ospite senza mostrare una maggiore capacità adesiva.

Questi dati possono contribuire a spiegare come l'eccesso di ferro libero nelle secrezioni mucose dei pazienti affetti da fibrosi cistica, riducendo la mobilità dei batteri, induca l'aggregazione e la formazione di biofilm, rendendo l'infezione da *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia* persistente e di difficile eradicazione.

P9 FORMAZIONE DI BIOFILM E ANTIBIOTICO- RESISTENZA IN CEPPI DI *VIBRIO* spp. ISOLATI DA PRODOTTI ITTICI

Antonella Deriu, Giovanna Felis, Francesca Murineddu, Leonardo A. Sechi,
Stefania Zanetti

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sassari

La capacità dei batteri di aggregarsi e formare biofilm è strettamente correlata alla capacità di produrre una matrice extracellulare il cui principale componente è di natura mucopolisaccaridica e consiste di glicosaminoglicano. La formazione di biofilm rappresenta un importante fattore di virulenza in diversi microrganismi di interesse clinico, la nostra indagine, tuttavia, si è rivolta a valutare la capacità di formare biofilm in vibrioni di isolamento ambientale. Sono stati analizzati 55 ceppi di vibrioni (10 *Vibrio harveyi*, 3 *Vibrio vulnificus* B2, 9 *Vibrio parahaemolyticus*, 2 *Vibrio fluvialis*, 2 *Vibrio nereis*, 29 *Vibrio alginolyticus*) isolati da prodotti ittici freschi (cozze, vongole, seppie, alici, sgombri). Oltre il 18% dei vibrioni formavano biofilm su piastre di Congo Red, con differenze notevoli da specie a specie (0% *Vibrio alginolyticus*, 50% di *Vibrio harveyi*, 67% *Vibrio vulnificus*, 100% *Vibrio nereis*), è inoltre emersa stretta correlazione tra formazione di biofilm e antibiotico-resistenza, con il 60% dei ceppi resistenti a più farmaci contemporaneamente. L'elevata frequenza di antibiotico-resistenza multipla soprattutto in fauna edule bentonica (cozze e vongole) suggerisce una forte pressione selettiva esercitata da agenti antimicrobici di uso umano e animale, eliminati in modo sconsiderato nell'ambiente e aventi come ultimo recapito il mare. Nei biofilm i microrganismi si scambiano molto velocemente informazioni genetiche e questo accelera il trasferimento dei geni che codificano per la resistenza agli antibiotici, con conseguente diffusione a livello ambientale di potenziali patogeni e compromissione della qualità delle acque costiere a scapito della fruibilità dell'ambiente costiero per la balneazione e l'aleutica.

P10 FORMAZIONE DI BIOFILM E RESISTENZA ALLA VANCOMICINA IN *STAPHYLOCOCCUS* *EPIDERMIDIS* CNBL7032 ISOLATO DA ALIMENTI

Simona Gazzola (b), Pier Sandro Cocconcelli (a, b)

(a) Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

E-mail: pier.cocconcelli@unicatt.it

(b) Centro Ricerche Biotecnologiche, Cremona

La resistenza alla vancomicina nel genere *Staphylococcus* è un rilevante problema per le infezioni causate da *Staphylococcus aureus* o da altri stafilococchi coagulasi negativi (CNS) coinvolti nelle infezioni nosocomiali. Diversi studi hanno dimostrato come alterazioni nel metabolismo della parete cellulare e la formazione del biofilm siano coinvolte nei meccanismi di resistenza ai glicopeptidi. Inoltre, in *Staphylococcus epidermidis*, la formazione di biofilm è considerato un importante meccanismo di virulenza. La capacità di questi batteri di colonizzare una superficie polimerica con biofilm coinvolge diversi geni codificanti proteine associate alla parete cellulare e ad alcune autolisine.

Durante questo lavoro di ricerca si è studiato il microrganismo *Staphylococcus epidermidis* CNBL 7032, isolato da pancetta. Questo ceppo risulta essere eteroresistente, presentando una sub-popolazione in grado di crescere in presenza di 32 µg/ml di vancomicina. *S. epidermidis* CNBL 7032, che non possiede i geni per la resistenza alla vancomicina propri degli enterococchi (*vanA* e *vanB*), produce l'enterotossina C, appartiene al secondo gruppo *agr* della specie *S. epidermidis*; ed esprime la proteina Fbe, coinvolta nel legame al fibrinogeno e nella formazione di biofilm.

L'osservazione che lo sviluppo ad alte concentrazioni di vancomicina (>16 µg/ml) avvenga solo in terreno solido e non in liquido, ha stimolato studi sul meccanismo di resistenza. L'analisi delle cellule al microscopio a trasmissione rivela che la subpopolazione resistente presenta un ispessimento della parete cellulare, proporzionale alla concentrazione di vancomicina presente nel terreno di crescita. L'analisi al microscopio elettronico a scansione ha permesso di evidenziare una struttura simile al biofilm tra le cellule di *S. epidermidis* CNBL 7032 cresciute in presenza dell'antibiotico. Inoltre la ricerca di geni coinvolti nella formazione del biofilm, tramite PCR, ha permesso di evidenziare la presenza del gene *atlE*, che codifica per un autolisina con proprietà adesive e coinvolta nella prima fase di formazione del biofilm. Lo studio dell'attività trascrizionale del gene *atlE*, di cellule sviluppate in terreno solido e in fase stazionaria di crescita, ha sottolineato una maggiore espressione del gene ad alti livelli di vancomicina (24 µg/ml e 32 µg/ml) suggerendo una interazione tra l'espressione del gene *atlE* e la resistenza ai glicopeptidi.

P11 RUOLO DEL BIOFILM MICROBICO MULTISPECIE NELL'OCCLUSIONE DEGLI STENT BILIARI

Emilio Guaglianone (a), Perla Filippini (a), Rita Cardines (b), Roberta Di Rosa (c),
Adriano Penni (c), Antonio Basoli (d), Fausto Fiocca (d), Paola Mastrantonio (b),
Gianfranco Donelli (a)

(a) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore
di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento di Medicina Clinica, Università di Roma "La Sapienza", Roma*

(d) *Dipartimento di Chirurgia, Università di Roma "La Sapienza", Roma*

L'impianto per via endoscopica di stent biliari costituisce un approccio terapeutico cui si fa sempre più spesso ricorso per il trattamento di patologie che interessano le vie biliari. Esso rappresenta, infatti, un'efficace sistema di decompressione biliare che contribuisce alla regressione della sintomatologia dei pazienti determinando un sensibile miglioramento della loro qualità di vita. Le maggiori complicanze associate all'impianto di tali dispositivi sono principalmente rappresentate dalla necessità di ripetuti interventi di estrazione e reimpianto dovuti all'occlusione degli stent stessi, con conseguente rischio di traumatismi a livello dell'ampolla di Vater e della via biliare principale, e alla elevata incidenza di infezioni delle vie biliari. Il materiale occludente è costituito dall'accumularsi di cellule batteriche e loro prodotti che, insieme a cristalli di bilirubinato di calcio, di palmitato e di colesterolo, causano progressivamente l'occlusione dello stent. I batteri infatti possono facilmente accedere al sistema biliare, risalendo dall'intestino, e crescere come microcolonie incluse in una matrice polisaccaridica formando un biofilm multispecie. La progressiva riduzione della fluidità della matrice, dovuta anche all'accumulo di precipitati biliari, costituisce una barriera protettiva per i microrganismi che vivono all'interno del biofilm, rendendo vani eventuali trattamenti antibiotici. Scopo di questa ricerca è quello di isolare e identificare le specie microbiche coinvolte nell'occlusione degli stent biliari, di caratterizzarle in base alle loro proprietà di adesione e colonizzazione e di individuare possibili fattori promoventi o inibenti la formazione di biofilm. Verranno riportati i dati relativi allo studio di un primo gruppo di dieci stent biliari rimossi da pazienti e analizzati dal punto di vista microbiologico allo scopo di individuare le specie più frequentemente coinvolte nel processo di occlusione. Le indagini microbiologiche finora condotte hanno evidenziato la crescita sia di specie fungine (*Candida* spp.), che di specie batteriche aerobie e anaerobie (*E. coli*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp.); osservazioni in microscopia elettronica a scansione hanno d'altronde confermato la presenza sia di forme batteriche coccoidi e bacillari che di forme fungine in crescita sessile.

P12 PRODUZIONE DI VIOLACEINA E SVILUPPO DI BIOFILM IN *JANTHINOBACTERIUM LIVIDUM*

Fabrizio Pantanella, Francesca Berlutti, Claudio Passariello, Serena Schippa
Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università di Roma "La Sapienza", Roma

Janthinobacterium lividum è un microrganismo Gram-negativo, mobile, aerobio, comunemente presente nel suolo, in ambienti fluviali o rive lacustri. Nonostante il suo habitat naturale lo studio di *Janthinobacterium lividum* riveste un interesse di carattere medico in seguito alla recente segnalazione di alcuni casi di setticemia ad esito letale sostenute da questo microrganismo, e in quanto produttore di metallo- β -lattamasi.

Janthinobacterium lividum produce un pigmento viola noto come violaceina.

Fra le specie batteriche produttrici di violaceina *Chromobacterium violaceum* è quella più studiata e la maggior parte delle conoscenze sulla violaceina provengono da studi eseguiti su questo batterio. Tali studi sono tutti focalizzati sulle proprietà chimiche e farmacologiche del pigmento.

Questa molecola con un peso molecolare di 343.33 ($C_{20}H_{13}N_3O_3$), viene prodotta come molecola accessoria e permette di resistere in condizioni ambientali sfavorevoli (resistenza agli UV). Inoltre diversi studi hanno mostrato che la violaceina ha un'attività antibatterica, antivirale e antitumorale e recentemente è stata utilizzata per colorare fibre sintetiche o naturali.

Al fine di comprendere la funzione fisiologica della violaceina in *Janthinobacterium lividum*, abbiamo seguito la sua produzione in diverse condizioni di crescita. I nostri risultati indicano che la produzione del pigmento violaceina dipende dalla fonte di carbonio e dalle condizioni di agitazione della coltura. In aggiunta un evidente aumento nella produzione di polisaccaride extracellulare, legato alla capacità di aderire a substrati inerti in biofilm, è costantemente evidenziabile in concomitanza con la produzione di pigmento.

La produzione della violaceina potrebbe avvantaggiare *Janthinobacterium lividum* in condizioni di crescita sessili, correlate all'adesione al substrato. Le nostre osservazioni suggeriscono che il pigmento violaceina potrebbe essere coinvolto direttamente o indirettamente in diverse strategie tutte associate ad un fine comune: la sopravvivenza in condizioni ambientali critiche.

P13 STUDIO IN VIVO DELL'EFFICACIA DI DIFFERENTI PROTOCOLLI DI PREVENZIONE FARMACOLOGICA CONTRO L'INFEZIONE PRECOCE DI CATETERI VASCOLARI

Federica Poggiali (a), Vanessa Ripavecchia (a), Claudio Passariello (a), Marco Artini (a),
Luigi Rizzo (b), Laura Selan (a)

(a) *Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica "G. Sanarelli", Università di Roma
"La Sapienza", Roma*

(b) *Unità operativa di chirurgia vascolare, Ospedale Sant'Andrea, Roma*

È in atto da tempo un'ingente sforzo di ricerca industriale per l'identificazione di biomateriali innovativi utilizzabili per la messa a punto di dispositivi medici impiantabili refrattari alla colonizzazione batterica da biofilm. I cateteri vascolari – i più impiegati – vengono realizzati in materiali polimerici dotati di elevata biocompatibilità. La complicanza principale associata all'uso dei dispositivi medici impiantabili è l'insorgenza di infezioni batteriche, anche entro tempi brevissimi dall'atto chirurgico del posizionamento; a queste segue il fallimento dell'impianto e la necessità di rimozione del dispositivo. Nei cateteri venosi centrali circa il 60% delle infezioni è causato da *Staphylococcus epidermidis*, da altri stafilococchi coagulasi-negativi e da *Staphylococcus aureus*. Sono stati sviluppati per questo scopo diversi tipi di cateteri vascolari realizzati tramite ricoperture antiadesive o trattamenti con sostanze antibatteriche.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di verificare le proprietà antimicrobiche di due diverse tipi di protesi attualmente disponibili in commercio: una protesi Dacron Knitted impregnata di Sali d'argento (Silver Intergard® Intervascular, La Ciotat, France) e una protesi di Dacron Knitted (Vascutek) impregnata con Rifampicina. Ciascuna protesi, del diametro di 8 mm, è stata impiantata in condizioni di sterilità in ratti adulti maschi di razza Wistar (quattro gruppi di 10 ratti). Subito dopo – nella zona dell'impianto – in ogni ratto del gruppo I e II sono stati inoculati 0,2 ml di SF contenente 5×10^7 ufc di *S. aureus*; e in ogni ratto dei gruppi III e IV sono stati inoculati 0,2 ml di SF contenente 5×10^5 ufc di *S. aureus*. I ratti dei gruppi I e III sono stati trattati con nevofloxacina per 7 gg; dopo 3 settimane sono stati sacrificati e le protesi – espianate sterilmente – sono state analizzate mediante conta batterica in piastra.

I risultati hanno dimostrato che soltanto le protesi imbevute di Rifampicina espianate dai ratti trattati con nevofloxacina erano sterili. Tutte le altre protesi, sia quelle imbevute con sali d'argento (gruppo di ratti trattato con l'antibiotico per via generale e gruppo non trattato) sia imbevute con la rifampicina (gruppo di ratti non sottoposti a trattamento antibiotico) erano colonizzate da alte cariche di batteri. In conclusione possiamo affermare che il solo trattamento antibiotico sia per via generale che per via topica non è in grado di prevenire l'adesione dei batteri alle protesi né la formazione di biofilm. Inoltre l'impregnazione delle protesi con i sali d'argento non è mai efficace, neanche con il supporto di un trattamento antibiotico generale adeguato.

P14 STUDIO DELL'EFFICACIA DI UN NUOVO BIOMATERIALE PER RIDURRE LA FORMAZIONE DI BIOFILM DI P. AERUGINOSA SU LENTI A CONTATTO

Federica Poggiali (a), Richard Weeh (b), Betsey Pitts (b), Fabrizio Pantanella (a), Stefano Palma (c), Marco Artini (a), Laura Selan (a)

(a) *Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica "G. Sanarelli", Università di Roma "La Sapienza", Roma*

(b) *Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, MT, USA*

(c) *Dipartimento di Oftalmologia, Università di Roma "Tor Vergata", Roma*

L'ampio uso delle lenti a contatto ha spinto la ricerca industriale e medica verso l'identificazione di nuovi biomateriali caratterizzati da una migliore tollerabilità. Una problematica medica legata all'uso delle lenti a contatto deriva dalla loro suscettibilità all'adesione e alla colonizzazione di batteri formanti biofilm.

Le caratteristiche fisico-chimiche dei biomateriali utilizzati per le lenti possono influenzare la formazione di biofilm. In questo studio abbiamo valutato se esistono differenze di colonizzazione batterica fra due tipi di lenti: uno realizzato con un biomateriale contenente fosforilcolina (Proclear; CooperVision, Inc. Irvine, California), e uno contenente Balafilcon A (Pure Vision; Bausch & Lomb Rochester NY). Questi biomateriali sono stati brevettati per la loro capacità di ridurre l'adesione di cellule eucariote alle lenti.

La fosforilcolina è un prodotto di sintesi che imita un fosfolipide della membrana cellulare dei globuli rossi che conferisce alla lente alta resistenza alla disidratazione perché trattiene acqua sia all'interno che sulla superficie. Il Balafilcon A è un polimero costituito da silicone e da un componente hydrogel chiamato NCP, questa combinazione consente di ottenere un'elevata trasmissione di ossigeno e un buon trasporto di fluidi attraverso la lente.

I due tipi di lenti sono stati colonizzati con tempi di incubazione crescenti con il ceppo PAO1 di *Pseudomonas aeruginosa*. Sulle lenti colonizzate sono stati eseguiti test di MIC e di MBC utilizzando un pannello di antibiotici attivi sul ceppo PAO1 in forma planctonica.

Il ceppo PAO1 (gentilmente fornito dal Prof. Mark Shirtliff) trasformato per esprimere costitutivamente GFP è stato utilizzato per colonizzare entrambi i tipi di lenti nelle stesse condizioni colturali. Le lenti colonizzate sono state osservate al microscopio confocale e con tecnica FISH.

I dati ottenuti dai test di MIC e MBC hanno dimostrato una sensibilità agli antibiotici molto maggiore nei batteri che avevano colonizzato le lenti contenenti fosforilcolina. Tale dato è stato ampiamente confermato in microscopia; infatti sia in microscopia confocale che in FISH sulla superficie delle Proclear sono state osservate poche cellule batteriche scarsamente aderenti.

Questi risultati indicano che le lenti con fosforilcolina possono ridurre il rischio di cheratiti batteriche sostenute da *P. aeruginosa*.

P15 RILASCIO DI UNA COMBINAZIONE DI ANTIBIOTICI DA MATRICI POLIURETANICHE PER PREVENIRE LA FORMAZIONE DI BIOFILM MICROBICI E CONTRASTARE L'INSORGENZA DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Valeria Ruggeri (a, b), Iolanda Francolini (a), Mariangela Bellusci (a, b), Antonella Piozzi (a), Gianfranco Donelli (b)

(a) Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza", Roma

(b) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Una grave complicanza associata all'impiego di dispositivi medici impiantabili è ancora oggi rappresentata dal frequente instaurarsi di processi infettivi resistenti alle terapie antibiotiche. Obiettivo di questa ricerca è stato lo sviluppo di matrici poliuretaniche a rilascio di una combinazione di due farmaci antibatterici, sia per prevenire le infezioni associate all'impianto di dispositivi medici che per contrastare la possibile insorgenza di antibiotico-resistenza. La presenza di due antibiotici, infatti, dovrebbe garantire l'efficacia antibatterica del dispositivo anche qualora insorgesse resistenza nei confronti di uno dei due agenti antimicrobici. Sono stati quindi agganciati a due differenti matrici poliuretaniche (PEUADED e PEUAS) ottenute a partire dal polietereuretano-acido (PEUA), il cefamandolo nafato (CEF) e la rifampicina (RIF), selezionati per il diverso meccanismo d'azione e i loro specifici gruppi chimici; in particolare entrambi gli antibiotici possiedono un gruppo acido nella loro formula di struttura. Il PEUA è stato ammidato con la 2 (dietilammino)-etilammina (DED) e con Serinolo (2 ammino 1,3 propandiolo, S), introducendo, rispettivamente, gruppi amminici terziari (PEUADED) e gruppi ossidrilici (PEUAS) in catena laterale. Lo studio dei sistemi sviluppati ci ha permesso di stabilire una relazione tra le interazioni polimero-antibiotico e antibiotico-antibiotico e la quantità di farmaco adsorbita e rilasciata nel tempo. Gli antibiotici sono stati prima adsorbiti singolarmente alle matrici, quindi sequenzialmente (RIF+CEF) per valutarne l'effetto combinato; e il loro adsorbimento sequenziale sembra consentirne un rilascio controllato. Le matrici poliuretaniche ottenute sono state saggiate mediante test di Kirby-Bauer, impiegando quali microrganismi di riferimento lo *Staphylococcus epidermidis* e lo *Staphylococcus aureus*. Le matrici, saggiate per più giorni fin quando veniva osservato un alone di inibizione significativo, hanno mostrato attività di durata diversa e i risultati migliori sono stati ottenuti con la matrice PEUADED. Anche grazie agli studi sulla cinetica di rilascio è stato verificato che i due antibiotici lavorano simultaneamente e che l'attività antibatterica del cefamandolo risulta potenziata in termini di durata dalla presenza della rifampicina. Al fine di aumentare la quantità rilasciata, gli antibiotici sono stati inglobati nelle matrici insieme ad un agente formante pori, il polietilenglicole (PEG), che è stato sperimentato a diversi pesi molecolari. Tale procedura ha portato ad un incremento della capacità antibatterica delle matrici, con un soddisfacente rilascio controllato del farmaco ad opera della matrice contenente PEG di peso molecolare intermedio (10000 dalton).

P16 AZIONE INIBENTE DI N-ACETILCISTEINA SULLA FORMAZIONE DI BIOFILM DA PARTE DI UN CEPPO DI *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Stefania Zanetti (a), Antonio Pinna (a), Giovanni Pecorini (b), Donatella Usai (c),
Paola Molicotti (a), Leonardo A. Sechi (a)

(a) Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica dell'Università degli Studi di Sassari

(b) Clinica Oculistica dell'Università degli Studi di Sassari

(c) Istituto di Microbiologia "Agostino Gemelli", Roma

Il biofilm è una comunità complessa di cellule batteriche racchiuse in una matrice mucopolisaccaridica, prodotta dai batteri stessi, coinvolto nella adesione ai biomateriali, nella resistenza agli antibiotici e ai comuni meccanismi di difesa immunitari. Secondo un modello base, i batteri formano microcolonie legate fra di loro da una matrice mucopolisaccaridica e circondate da canali acquosi che forniscono nutrienti e consentono l'eliminazione di rifiuti e sostanze tossiche.

Diversi studi sperimentali hanno dimostrato che il biofilm batterico è assai meno sensibile agli antibiotici rispetto alla corrispondente forma planctonica monocellulare.

L'N-acetilcisteina è un noto agente mucolitico con proprietà batteriostatiche.

L'effetto dell'N-acetilcisteina sui batteri e sul biofilm è tuttora relativamente poco noto. Studi recenti hanno dimostrato che N-acetilcisteina può inibire la crescita e la capacità di produrre biofilm di alcune specie batteriche. Del tutto recentemente abbiamo dimostrato che N-acetilcisteina ha un effetto inibitorio dose-dipendente non solo sulla formazione del biofilm, ma anche sul biofilm preformato prodotto da un ceppo corneale di *Klebsiella pneumoniae*. Il nostro studio *in vitro* suggerisce che N-acetilcisteina può essere un interessante candidato da utilizzare come inibitore della formazione di biofilm prodotto da batteri Gram-negativi. La presenza di N-acetilcisteina può scompaginare la struttura del biofilm e rendere i microorganismi più sensibili agli antibiotici.

INDICE DEGLI AUTORI

Albertano, P.; 17; 42; 46
Ammendolia, M. G.; 48
Angiolella, L.; 28
Artini, M.; 6; 26; 41; 53; 54
Attili, A. R.; 38
Aulenta, F.; 19
Baldassarri, L.; 9
Basoli, A.; 51
Bastianini, L.; 38
Battistoni, A.; 48
Beccari, M.; 19
Bellezza, S.; 42
Bellusci, M.; 36; 55
Berlutti, F.; 48; 52
Bernardi, A.; 18
Bonito, A.; 28
Bowden, M. G.; 12
Bruno, L.; 42
Canganella, F.; 37
Cappa, F.; 20; 44
Caratozzolo, M.; 45
Cardines, R.; 51
Carnazza, S.; 45
Castaldo, C.; 13
Cellini, L.; 27
Chiani, P.; 28
Ciocci, A.; 28
Cipriani, P.; 48
Cocconcelli, P. S.; 20; 44; 50
Congestri, R.; 46
Costerton, J. W.; 3; 6
Cuteri, V.; 38
de Alteriis, E.; 18
Deriu, A.; 49
Di Bartolomeo, S.; 27
Di Bonaventura, G.; 25
Di Campli, E.; 27
Di Lorenzo, A.; 18
Di Mattia, E.; 37
Di Pippo, F.; 46
Di Rosa, R.; 51
Donelli, G.; 35; 36; 51; 55
Fadda, G.; 31; 32
Felis, G.; 49
Filippini, P.; 51
Fiocca, F.; 51
Foster, T.; 12
Francolini, I.; 35; 36; 55
Gazzola, S.; 50
Gianotti, A.; 43; 44
Gioffrè, A.; 45
Grande, R.; 27
Guaglianone, E.; 35; 51
Guerzoni, M. E.; 43; 44
Guglielmino, S.; 45
Guzzon, A.; 46
Kaplan, J. B.; 35
Macchi, A.; 31; 32
Majone, M.; 19
Marasco, R.; 13
Marenzoni, M. L.; 38
Marino, C.; 13
Mastrantonio, P.; 51
Molicotti, P.; 56
Morea, C.; 48
Murineddu, F.; 49
Muscariello, L.; 13
Musu, E.; 47
Oggioni, M. R.; 4
Palamara, A. T.; 28
Palma, S.; 54
Pantanella, F.; 52; 54
Parascandola, P.; 18
Passariello, C.; 6; 52; 53
Pecorini, G.; 56
Penni, A.; 51
Petrangeli Papini, M.; 19
Pezzali, I.; 12
Picciani, C.; 25
Piccolomini, R.; 25
Pieramati, C.; 38
Pinna, A.; 56
Piozzi, A.; 36; 55
Pitts, B.; 54

Poggiali, F.; 6; 26; 41; 53; 54
Pompei, R.; 47
Pozzi, G.; 4
Prezioso, S.; 38
Quadri, S.; 41
Ripa, S.; 24
Ripavecchia, V.; 6; 26; 41; 53
Rizzo, L.; 26; 53
Rossolini, G. M.; 23
Ruggeri, V.; 36; 55
Saceddu, P.; 18
Sacco, M.; 13
Sarli, S.; 48
Schipa, S.; 52
Schito, G. C.; 31; 32
Sechi, L. A.; 49; 56
Selan, L.; 6; 26; 41; 53; 54
Sisto, R.; 18
Spedicato, I.; 25
Speziale, P.; 12
Stefani, S; 10
Stoodley, P.; 35
Stringaro, A. R.; 28
Superti, F.; 48
Testa, C.; 28
Toccaceli, L.; 28
Tombolino, R.; 47
Torosantucci, A.; 28
Traini, T.; 27
Trappetti, C.; 4
Usai, D.; 56
Valente, C.; 38
Valenti, P.; 11; 48
Vallicelli, M.; 43
Varcamonti, M; 18
Venturi, V.; 5
Vignola, R.; 18
Visa, L.; 12
Weeh, R.; 54
Zampaloni, C.; 24
Zanetti, S.; 49; 56

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@jss.it.*

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, giugno 2005 (n. 2) 1° Suppl.