



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento di Scienze della Vita

Corso di Laurea Magistrale in Bioscienze

Valutazione del danno in vitro su cellule epiteliali bronchiali da parte di *Pseudomonas aeruginosa* isolato da un paziente affetto da polmonite

Relatore:

Prof.ssa Carla Sabia

Laureando:

Mosè Faruolo

Correlatore:

Dott. Piero Aloisi

Correlatore:

Dott. Francesco Lipani

Anno Accademico 2024/2025



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento di Scienze della Vita

Corso di Laurea Magistrale in Bioscienze

Valutazione del danno in vitro su cellule epiteliali bronchiali da parte di *Pseudomonas aeruginosa* isolato da un paziente affetto da polmonite

Relatore:

Prof.ssa Carla Sabia

Laureando:

Mosè Faruolo

Correlatore:

Dott. Piero Aloisi

Correlatore:

Dott. Francesco Lipani

Anno Accademico 2024/2025

Sommario

1.	INTRODUZIONE	1
1.1.	POLMONITI COMUNITARIE	1
1.2.	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	2
1.2.1.	FATTORI DI VIRULENZA	3
1.2.2.	ANTIBIOTICO RESISTENZA	8
1.1.1.	INFEZIONI POLMONARI: ACUTE E CRONICHE	10
2.	SCOPO TESI.....	11
3.	MATERIALI E METODI.....	12
3.1.	CEPPI BATTERICI.....	12
3.1.1.	TERRENI DI COLTURA.....	12
3.2.	IDENTIFICAZIONE E ANTIBIOGRAMMA AL VITEK.....	13
3.3.	COLTURE CELLULARI.....	15
3.3.1.	MANTENIMENTO.....	15
3.3.2.	PIASTRE PER INFEZIONE.....	17
3.4.	INFEZIONE	19
3.5.	TEST PER LDH	20
3.6.	CINETICA DI CRESCITA	22
3.7.	BIOFILM.....	22
3.8.	ESTRAZIONE RNA	23
3.8.1.	NANODROP	24
4.	RISULTATI.....	25
4.1.	BRONCOASPIRATI HESPERIA HOSPITAL	25
4.2.	IDENTIFICAZIONE E ANTIBIOGRAMMA.....	26
4.3.	TEST PER LDH	29
4.4.	CONTA CFU	33
4.5.	CINETICA DI CRESCITA	35
4.6.	BIOFILM.....	36
4.7.	ESTRAZIONE RNA	37
5.	CONCLUSIONI.....	38
6.	BIBLIOGRAFIA	39

1. INTRODUZIONE

Il rischio derivante dalla diffusione di microrganismi patogeni in ambito ospedaliero rappresenta una grande sfida per le strutture sanitarie, oltre al rischio per la salute del paziente la diffusione di tali microrganismi comporta un maggior tempo di degenza, creando una vera e propria situazione epidemiologica locale. Inoltre essendo in un ambiente ospedaliero è molto facile che questi microrganismi sviluppino antibiotico-resistenze significative che rendono ancora più difficile la loro eliminazione.

Per evitare la diffusione di tali ceppi sono state create delle linee guida dall'Istituto Superiore di Sanità basate sull'approccio al rischio dettato dalla normativa ISO 9001:2015, alcune di queste linee guida includono: un monitoraggio e registrazione meticolosa della situazione epidemiologica all'interno dei reparti, una diagnostica microbiologica affidabile, l'adozione di procedure appropriate e sistemi completi utilizzati dal Team di Controllo delle Infezioni Ospedaliere con l'obiettivo di ridurre al minimo il numero di microrganismi resistenti ai farmaci, un sistema di monitoraggio degli antibiotici utilizzati nelle cure ambulatoriali e ospedaliere.

Per facilitare la diagnosi microbiologica delle infezioni l'AMCLI (Associazione Microbiologi Clinici Italiani) ha creato delle linee guida per diverse tipologie di infezioni, fornendo un valido supporto alla diagnostica clinica, le quali vengono costantemente aggiornate per assicurare una diagnosi precisa e più veloce possibile, in modo tale aumentare la qualità del servizio diagnostico.

1.1.POLMONITI COMUNITARIE

Le polmoniti comunitarie rappresentano un rilevante problema sanitario in quanto costituiscono una delle maggiori cause di ospedalizzazione e di decessi al mondo, rappresentando circa il 13% dei decessi dopo i 55 anni [1]. Essendo ubiquitarie colpiscono soggetti di qualsiasi età e possono presentarsi più volte nell'arco della vita, inoltre in pazienti più fragili come bambini, anziani e individui immunodepressi, possono causare gravi complicanze aumentando il tempo della degenza ospedaliera e la mortalità. Tali infezioni si presentano con la comparsa di febbre associata a diversi sintomi respiratori come tosse, espettorazione e dispnea, che possono essere variabili a seconda della gravità ed evoluzione del quadro clinico; infatti vi possono essere complicanze gravi come sepsi, insufficienze organiche multiple e riacutizzazioni di preesistenti comorbidità.

In linea generale l'aria inalata contiene una certa percentuale di microrganismi, ma i polmoni di un individuo sano rimangono generalmente immuni da infezioni grazie all'azione dell'immunità innata. Nella difesa immunologica delle vie aeree la prima linea di difesa è rappresentata dall'epitelio, in seguito si attivano diversi tipi di cellule come cellule dendritiche, linfociti T, macrofagi e neutrofilo; perciò la prevenzione della colonizzazione batterica e l'eliminazione di questi dalle vie aeree richiede uno sforzo coordinato di molti tipi di cellule, per tale motivo i sintomi e gli esiti dell'infezione dipendono sia dalla risposta dell'ospite che dai fattori di virulenza dell'agente patogeno.

Le vie aeree sono rivestite da un epitelio pseudostratificato composto da diversi tipi di cellule morfologicamente distinte che svolgono diverse funzioni, rivestendo la parete interna sono il primo sito di contatto per le particelle inalate e agenti patogeni, perciò fungono da barriera fisica contro l'infezione e allertano il sistema immunitario [2]. L'epitelio è rivestito principalmente da cellule ciliate, le quali sulla superficie apicale a contatto con il lume esterno hanno strutture a forma di peli chiamate "ciglia": tali strutture si muovono in modo ritmico e unidirezionale per spingere le particelle e microrganismi verso l'alto e fuori dal polmone [3]. Sono presenti anche cellule secretorie che producono e secernono glicolipidi mucinici, si tratta di macromolecole glicosilate ad alto peso molecolare che intrappolano efficacemente le particelle estranee; infatti una conseguenza nella mutazione del gene CFTR causa un'anomalia nelle mucine ostacolando il legame con le particelle esterne e rendendole più inclini ad ancorarsi alle cellule, impedendone la fuoriuscita dalle vie aeree [4].

Le infezioni delle vie respiratorie sono dovute al passaggio di un certo numero di agenti patogeni all'interno dell'apparato respiratorio che causano una risposta immunologica nel paziente, oppure a causa di malattie immunologiche che colpiscono la capacità dell'organismo a difendersi [5]; in base all'età e alla condizione del paziente possiamo trovare diversi organismi.

Dal punto di vista epidemiologico i microrganismi più coinvolti in infezioni polmonari in età adulta sono: *Streptococcus pneumoniae* seguito da *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma pneumoniae*, in frequenze minori si osservano anche *Chlamydothila pneumoniae* e *Legionella pneumophila*; negli ultimi anni si sta notando una crescente presenza di *Staphylococcus aureus*. Invece tali infezioni in età geriatrica sono spesso causate da Gram negativi (67% dei casi) come *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa*, e in misura minore (33%) si trovano Gram positivi come *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Mentre l'epidemiologia delle polmoniti in soggetti con altre patologie che causano una insufficienza respiratoria, la quale facilita la crescita batterica in forma di biofilm, vede al primo posto *Pseudomonas aeruginosa* con il 59% dei casi isolati, seguito da *Haemophilus influenzae* (31,72%) e *Staphylococcus aureus* (7,8%).

1.2.PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa è un Gram negativo (Fig.1) a forma di bastoncello appartenente alla famiglia delle *Pseudomonadaceae* [6], aerobio facoltativo e catabolizza un vasto range di molecole organiche come nutrienti rendendolo metabolicamente versatile e quindi facilmente presente in diversi ambienti non solo ospedalieri [7]. Si tratta di un patogeno opportunisto che causa infezioni acute e croniche di diversa natura: ulcere diabetiche, ustioni da bruciatura e ferite chirurgiche, caratterizzate da una intensa risposta da parte dei neutrofili causando un danno significativo a livello dei tessuti; ha una mortalità elevata (40%) causata da batteriemia e sepsi, specialmente in pazienti con altre patologie che causano immunodeficienza come la fibrosi cistica e pazienti oncologici [8].

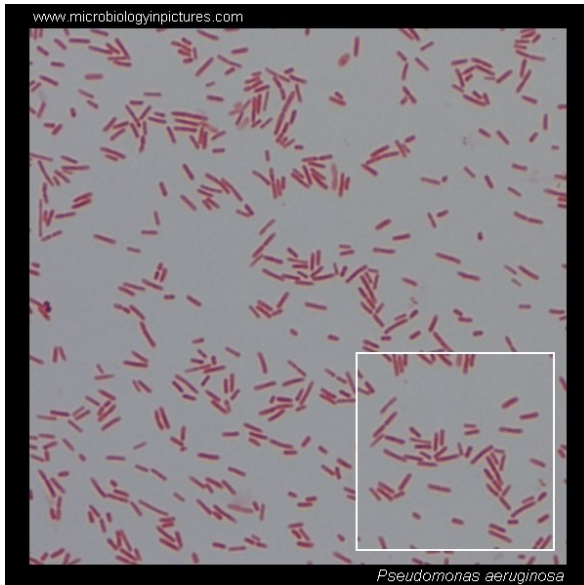


Figura 1: Colorazione Gram di *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1. FATTORI DI VIRULENZA

I fattori di virulenza (Fig.2) sono tutta una serie di meccanismi che permettono all'agente patogeno di causare l'infezione o di facilitarne il processo, alcuni esempi sono: la capacità di aderire sulle superfici in modo da invadere la cellula ospite, presenza di enzimi con funzione inattivante sugli antibiotici per aggirare le difese immunitarie, produzione di tossine per causare un danno, produzione di biofilm per aumentare la resistenza e patogenicità.

Nel caso specifico di *Pseudomonas aeruginosa* si è notato che il fenotipo dei microrganismi isolati da infezioni acute differiscono dal fenotipo dei microrganismi isolati da infezioni croniche [9], specialmente riguardo i fattori di virulenza: gli isolati da infezioni acute esprimono una vasta gamma di fattori di virulenza, mentre gli isolati da infezioni croniche sono privi di alcune delle caratteristiche batteriche più infiammatorie, come flagelli e pili, e riducono altri meccanismi di virulenza [10], ma formano più biofilm.

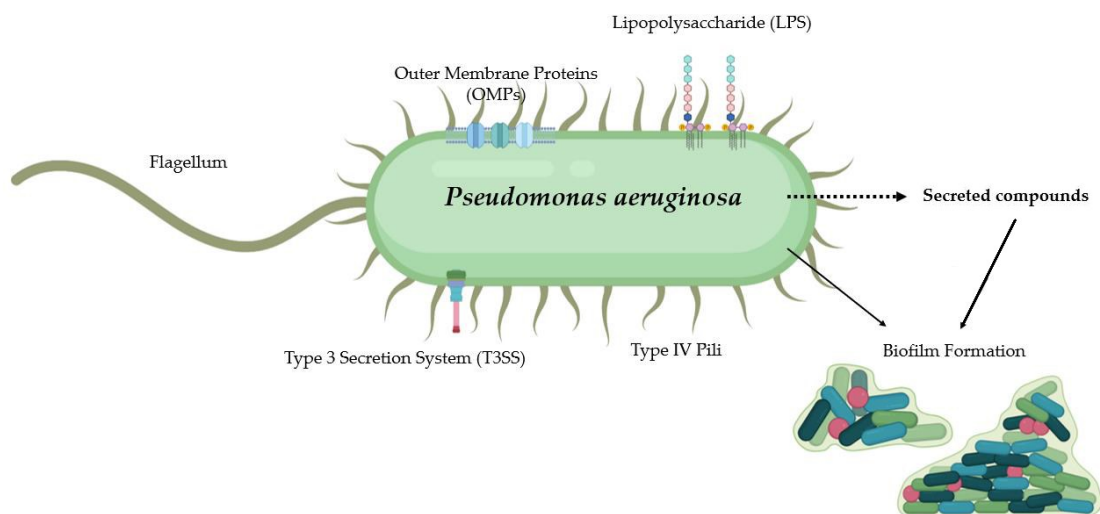


Figura 2: Schema fattori virulenza *Pseudomonas aeruginosa* [11]

Tra i principali fattori di virulenza di *Pseudomonas aeruginosa* abbiamo:

1.2.1.1. PILI E FLAGELLI

Ogni batterio di *Pseudomonas aeruginosa* possiede un flagello polare, che dona la motilità al batterio, e diversi pili di tipo 4 (più corti) e anch'essi localizzati a un polo che fungono da adesine.

Il flagello fornisce motilità natatoria attraverso un movimento rotatorio a “cavatappi” ed è essenziale per la chemiotassi batterica: le fasi di nuoto rettilineo sono interrotte da rotazioni del batterio, in cui la rotazione del flagello viene transitoriamente invertita e la motilità viene interrotta per consentire al batterio di riorientarsi. Inoltre durante l'infezione il flagello si lega alle cellule epiteliali dell'ospite attraverso il legame con glicolipide asialato “asialoGM1”, suscitando una forte risposta infiammatoria [12]. In un'ampia percentuale di isolati da infezioni croniche mostra una minor presenza di questi flagelli (aflagellati) o una minor motilità di questi [13].

I pili di tipo 4 sono le adesine principali in *Pseudomonas aeruginosa* e oltre alla funzione adesiva sono coinvolti nella formazione del biofilm e nella motilità a “contrazione”: un processo nel quale i pili si estendono e si ritraggono come una sorta di “uncini” per trascinare la cellula lungo superfici solide [14]; assieme ai flagelli i pili facilitano la motilità a “sciame”, una forma di motilità per superfici semisolide [15]. I pili inducono l'aggregazione di più batteri facilitando formazione di microcolonie nei tessuti bersaglio, limitando la penetrazione dell'antibiotico nella colonia [16]. Anche in questo caso sono stati trovati alcuni isolati clinici di infezioni croniche con mutazioni/deficit dei pili, riducendo la virulenza del ceppo. [6]

Dato che la mancanza dei pili e/o flagelli causa una minor virulenza del ceppo, si è pensato di utilizzarli come bersagli per una terapia antibiotica, ma al momento non hanno ottenuto risultati significanti [14,17].

1.2.1.2. SISTEMA SECREZIONE TIPO 3 (T3SS)

Sono dei sistemi tipici dei Gram negativi patogeni per iniettare le tossine direttamente nella cellula ospite, per cui hanno un ruolo importante nella virulenza di *Pseudomonas aeruginosa*, la loro espressione è stata associata a infezioni invasive acute ed è stata collegata a un aumento della mortalità nei pazienti [18]. Si tratta di una appendice che consente la traslocazione di proteine effettrici dal batterio alla cellula ospite attraverso un poro formato nella membrana cellulare, ne sono stati identificati 4 tipi: ExoY, ExoS, ExoT ed ExoU che sono espresse in modo variabile in diversi ceppi e isolati [19]. Per quanto riguarda le loro funzioni: ExoS è bifunzionale, avendo sia l'attività proteica attivante la GTPasi N-terminale che l'attività ADPribosiltransferasi C-terminale (ADPRT), queste hanno un effetto sull'organizzazione del citoscheletro di actina; ExoU è una fosfolipasi, 100 volte più citotossica di ExoS ed è in grado di causare una rapida morte delle cellule eucariotiche dell'ospite a causa della perdita di integrità della membrana plasmatica causandone la necrosi [19]. Non è ancora ben chiaro il contributo di ciascuna delle tossine alla patogenesi, ma si ritiene che tale sistema consente a *Pseudomonas aeruginosa* di sfruttare le breccie nella barriera epiteliale promuovendo il danno cellulare, portando ai sintomi della polmonite batterica [19].

1.2.1.3. QUORUM SENSING

Si tratta di un meccanismo che consente un adattamento coordinato della popolazione batterica ai cambiamenti ambientali, è mediato da piccole molecole diffusibili attraverso la membrana chiamate “auto induttori” che vengono prodotte da ciascun batterio e agiscono come cofattori di specifici regolatori trascrizionali quando raggiungono concentrazioni sufficientemente elevate: la concentrazione degli auto induttori è direttamente proporzionale alla concentrazione dei batteri, in modo tale da attivare specifici geni a valle solo quando si ha una sufficiente popolazione batterica. Si stima che il 10% del genoma e 20% del proteoma batterico sia regolato dal quorum sensing [20].

Nello specifico *Pseudomonas aeruginosa* produce 3 auto induttori [21]: il 3-oxo-dodecanoil omo-serina lattone (3-oxo-C12HSL), il butirril omo-serina lattone (C4HSL) e il 2-eptil-3-idrossi-4-chinolone, denominato “segnale chinolonico”. Questi induttori stimolano diversi sistemi che controllano la sopravvivenza cellulare, formazione di biofilm e virulenza, perciò se un ceppo è carente di uno o più auto induttori avrà una patogenicità ridotta [14].

1.2.1.4. BIOFILM

Un fattore della virulenza molto importante è la produzione di biofilm, che mantiene il batterio nella zona dell’infezione portando a cronicizzazione e protegge la colonia batterica impedendo l’ingresso dell’antibiotico nel patogeno. La matrice del biofilm è composta da sostanze polimeriche extracellulari (EPS) come polisaccaridi, acidi nucleici, lipidi e proteine e costituisce la maggior parte (50-90%) del volume, conferendo robustezza fisica resistendo alle forze meccaniche, e robustezza chimica riducendo la penetrazione di sostanze chimiche tossiche [22]. I batteri all’interno del biofilm differiscono sostanzialmente rispetto ai batteri circolanti dato che cambia il microambiente in cui si trovano: la minor concentrazione di ossigeno e nutrienti contribuisce alla lenta modalità di crescita all’interno del biofilm; inoltre queste differenze dell’ambiente comportano un diverso profilo trascrizionale del batterio [23] che può portare a un aumento di resistenza agli antibiotici, rappresentando un importante problema medico.

La produzione del biofilm è mediata dal quorum sensing [24], dove si ha la transizione di *Pseudomonas aeruginosa* dallo stato mobile a quello sessile e viceversa. La formazione viene divisa in diverse fasi (Fig.3):

- Attacco alla superficie: i singoli batteri si attaccano alla superficie con interazioni non specifiche come legami ionici stabili mediati dai lipopolisaccaridi presenti sulla superficie dei pili batterici.
- Adesione: il contatto dei pili tipo 4 e dai flagelli con la superficie attiva il patogeno a rafforzare i suoi legami reversibili con il substrato e a sintetizzare e rilasciare componenti della matrice extracellulare (EPS).
- Micro-colonia: le cellule attaccate iniziano a produrre EPS, che stabilizza la struttura del biofilm e fornisce protezione agli agenti patogeni. In particolare vengono prodotti tre polisaccaridi: l’alginato viene prodotto specialmente da ceppi mucoidi, si ritiene che protegga i batteri dalla risposta dell’ospite [25]; il polisaccaride Pel è prodotto dalla maggior parte dei ceppi, mentre il polisaccaride Psl non è completamente codificato in tutti i ceppi.

- **Maturazione:** la maggiore produzione di EPS comporta la formazione di una complessa struttura tridimensionale: si trovano zone di densità cellulare alta, dove i batteri producono e rilasciano molecole di segnalazione (auto induttori) consentendo una comunicazione e un comportamento coordinati; e zone di canali ripieni di liquido che consentono lo scambio di nutrienti e prodotti di scarto [26].
- **Dispersione:** in risposta a stimoli ambientali, i batteri escono dal biofilm andando a colonizzare nuove superfici, iniziando la produzione di un nuovo biofilm. Il passaggio tra lo stato sessile e mobile avviene secondo diversi processi regolatori che regolano reciprocamente la formazione del biofilm (stato sessile) e la motilità [15].

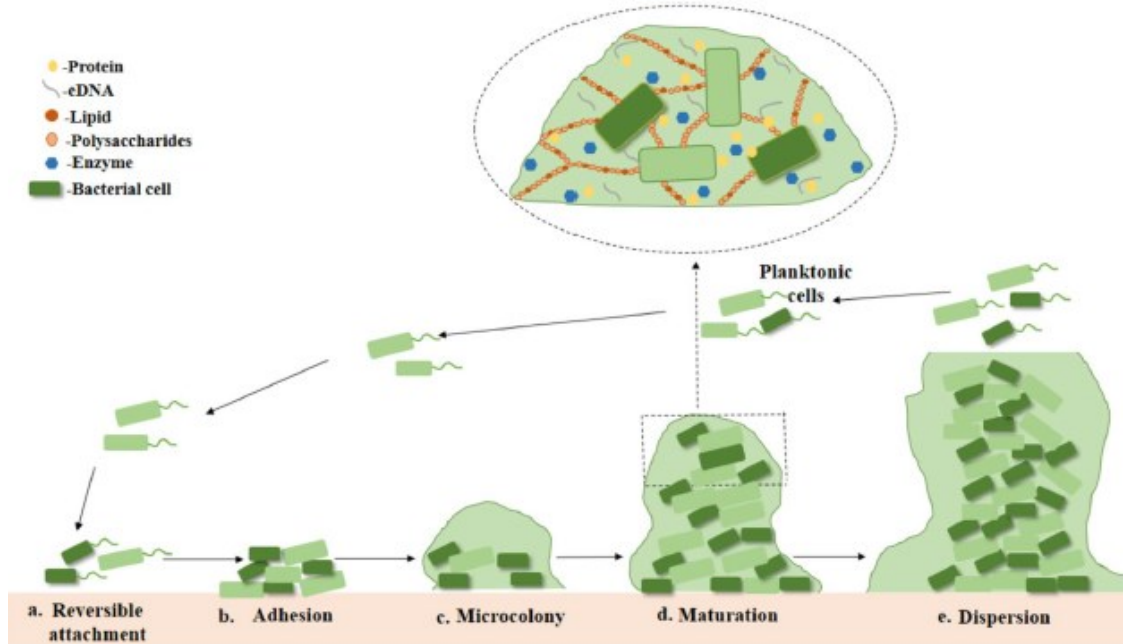


Figura 3: Schema formazione del Biofilm[27]

1.2.1.5. PROTEASI

Pseudomonas aeruginosa produce diversi tipi di proteasi, principalmente hanno un ruolo ben riconosciuto nella sepsi e nelle infezioni polmonari dove contribuiscono al danno tissutale [14]. Vedendo alcuni esempi:

- **Proteasi alcalina:** si tratta di una metallo proteasi di zinco che degrada le proteine del complemento e la fibronectina dell'ospite [28], inoltre degrada la flagellina eludendo la risposta immunitaria [29].
- **Proteasi IV:** è una serina proteasi in grado di degradare le proteine del complemento, le immunoglobuline e il fibrinogeno, inoltre la sua azione inibisce l'associazione del batterio con i macrofagi alveolari, permettendo la sopravvivenza del batterio durante l'infezione [30].
- **Elastasi LasB:** è regolata dal quorum sensing e degrada le proteine opsonizzanti del surfattante polmonare [31].

1.2.1.6. LIPOPOLISACCARIDI

Sono dei glicolipidi espressi sulla membrana esterna del batterio e svolgono un ruolo nell'antigenicità, risposta infiammatoria e interazione con gli antibiotici [32]. Nello specifico *Pseudomonas aeruginosa* produce un lipopolisaccaride costituito da tre domini: un lipide A ancorato alla membrana, una regione centrale polisaccaridica e un polisaccaride O-specifico altamente variabile (antigene O). Il lipide A e l'antigene O contribuiscono maggiormente alle infezioni, nel dettaglio:

- **Lipide A:** ancora il lipopolisaccaride alla membrana esterna, composto da uno scheletro di diglucosamina bifosfato con acidi grassi primari e secondari legati in O e N. Essendo il "lato attivo" del lipopolisaccaride può essere legato sequenzialmente dai corecettori MD2 e CD14 della cellula ospite, innescando la produzione di citochine pro-infiammatorie, infiammazione e infine shock endotossico [33].
Ci possono essere delle modifiche al lipide A, come la presenza di un acido decanoico in posizione 3 che determina la forma pentacilata o esacilata, tali forme possono alterare la suscettibilità del batterio alle polimixine e ai peptidi antimicrobici cationici, modificando le proprietà infiammatorie: infatti in isolati clinici di infezioni acute sono predominanti (75%) le forme pentacilate [32]; mentre negli isolati da infezioni croniche si trovano le forme esacilate o addirittura eptacilate con maggiori proprietà infiammatorie, l'entità di queste modifiche sembra aumentare con la gravità della malattia [34]. Tali alterazioni del lipide A sono regolate e possono essere indotte in risposta a un cambiamento ambientale.
- **Antigene O:** il dominio lipidico A è legato a un nucleo oligosaccaridico ramificato, che può essere sostituito da un O-polisaccaride (antigene O), del quale ne esistono due tipologie strutturalmente distinte che si possono trovare simultaneamente nel batterio: Il polisaccaride a banda A è un omopolimero di D-ramnosio lungo circa 70 zuccheri e che suscita una debole risposta anticorpale; il polisaccaride a banda B è un eteropolimero variabile a seconda del ceppo sia per lunghezza della catena che per natura degli zuccheri, e provoca una forte risposta anticorpale [32].
È stato notato che in molti isolati clinici cronici si perde l'espressione del polisaccaride della banda B che viene sostituito dal polisaccaride della banda A [35], questo potrebbe essere causato dalla pressione selettiva sui batteri affinché eludano le risposte immunitarie adattative dell'ospite sopprimendo il polisaccaride O più antigenico [32].

1.2.2. ANTIBIOTICO RESISTENZA

Essendo un batterio versatile e resistente a diversi ceppi è molto difficile da eradicare, presenta diverse resistenze intrinseche ed è possibile che sviluppi altre resistenze tramite mutazioni, passaggio di materiale genetico tra microrganismi e variazioni ambientali.

1.2.2.1. RESISTENZE INTRINSECHE

Tra le resistenze intrinseche tipiche di *Pseudomonas aeruginosa* abbiamo: cefalosporine, carbapenemi, penicilline e aminoglicosidi [27], tali resistenze sono codificate dal genoma dell'organismo e dovute a diversi meccanismi d'azione come:

- Bassa permeabilità della membrana: la penetrazione di un antibiotico può essere ridotta da cambiamenti strutturali della membrana che ne riducono la permeabilità a diverse sostanze. In *Pseudomonas aeruginosa* la composizione della membrana limita l'assorbimento di piccole molecole idrofile come gli antibiotici β -lattamici, carbapenemi e aminoglicosidi, data la minore presenza dei canali proteici composti da porine (OprF, OprB, OprD) [36] che ne permettono l'ingresso nel batterio; infatti paragonandola a *Escherichia coli*, la membrana di *Pseudomonas aeruginosa* è da 10 a 100 volte meno permeabile. [6]
- Espressione sulla membrana di pompe di efflusso (Mex): queste pompe impediscono all'antibiotico di raggiungere una concentrazione intracitoplasmatica tale da svolgere la sua funzione inibitrice. Nello specifico in *Pseudomonas aeruginosa* sono state trovate diverse pompe di efflusso come MexAB–OprM e MexXY–OprM [37] che effluiscono diversi farmaci come β -lattamici, cefalosporine, carbapenemi, aminoglicosidi e tetracicline. [38]
- Presenza naturale di una β -lattamasi: si tratta di un meccanismo tipico dei Gram negativi, questi enzimi idrolizzano l'anello beta-lattamico dei beta-lattamici come Penicilline, Cefalosporine e Carbapenemi; tali antibiotici vanno a inibire la sintesi della parete cellulare, nello specifico a livello dell'inserimento dei precursori nella parete cellulare, andando a legarsi agli enzimi PBP (penicillin-binding-proteins) che catalizzano la reazione di transpeptidazione (legame crociato) tra i pentaptidi e nei ponti pentaglicinici, inibendo la formazione della membrana. In particolare *Pseudomonas aeruginosa* produce la β -lattamasi AmpC, è localizzata nel periplasma e idrolizza efficacemente diversi antibiotici β -lattamici come penicilline e cefalosporine.

La resistenza intrinseca data dalle pompe di efflusso e da AmpC è strettamente connessa alla ridotta permeabilità della membrana esterna, dato che la concentrazione di β -lattamici nel periplasma dipende dall'efficienza e dalla velocità con cui vengono trasportati attraverso le porine della membrana esterna. [39]

1.2.2.2 RESISTENZE ACQUISITE

Le resistenze acquisite possono essere il risultato del trasferimento di materiale genetico tra microrganismi, oppure sono il risultato di mutazioni nei geni bersaglio o nei geni regolatori dei meccanismi di resistenza intrinseca. Nello specifico vengono suddivise in:

- Cromosomiche (costitutive) rappresentano il 10-15% dei casi, sono dovute a mutazioni spontanee che alterano la permeabilità cellulare all'antibiotico o il sito bersaglio di esso, la trasmissione avviene solo alle cellule figlie per trasmissione verticale. Questa selezione è mediata dall'azione selettiva dell'antibiotico che seleziona i mutanti resistenti inibendo le cellule sensibili. Portando ad una stabilizzazione o potenziamento dei meccanismi di resistenza intrinseca.

Nello specifico in *Pseudomonas aeruginosa* una mutazione del gene *mexZ*, che funge da inibitore di *mexXY*, comporta una sovraespressione della pompa di efflusso *MexXY* [40]. In realtà questo tipo di mutazioni quando alterano il bersaglio di un antibiotico possono conferire nuove resistenze, ad esempio una mutazione nella DNA girasi riduce l'affinità di legame dell'enzima per i fluorochinoloni [36].

- Extracromosomiche (trasmissibile) rappresentano il 90% dei casi, sono dovute al trasferimento di materiale genetico come plasmidi e trasposoni, tra microrganismi anche diversi tra di loro, tramite coniugazione, trasformazione o trasduzione, quindi è trasmissibile a specie diverse mediante trasmissione orizzontale. Possono sia rinforzare le resistenze intrinseche, ma possono conferire una nuova resistenza a uno o più antibiotici contemporaneamente, dando dei fenomeni di resistenza multipla.

In particolare in *Pseudomonas aeruginosa* si è notato il trasferimento di una seconda β -lattamasi [6]: questa se è diversa rispetto a quelle intrinseche va ad ampliare lo spettro di resistenza ai β -lattamici, oppure se è simile a quelle intrinseche va a aumentare la resistenza contro quella β -lattamasi specifica.

1.1.1.1. RESISTENZE ADATTATIVE

La resistenza adattativa si verifica quando variano le condizioni ambientali che aumentano lo stress sul microrganismo, per esempio quando si ha l'esposizione a concentrazioni di antibiotici subinibitorie, oppure durante l'associazione con le superfici epiteliali e la formazione del biofilm, tutte queste condizioni causano un cambiamento nell'espressione genica che determina una sovraregolazione dei geni che possono conferire resistenza [36]. In *Pseudomonas aeruginosa* si è notato un meccanismo di resistenza adattativa nei confronti di peptidi antimicrobici cationici [41]: in specifiche condizioni di stress dovute alla carenza di Mg^{2+} , esposizione a peptidi e interazione con le cellule epiteliali, una varietà di chinasi sensore SK (*PhoQ*, *PmrB*, *ParS*, *CprS* e *CbrA*), aumentano indipendentemente l'espressione dell'operone *arnBCADTEF-udg*, che causa la sintesi e l'aggiunta di amminoarabinosio al lipide A, comportando una riduzione delle interazioni tra i peptidi cationici e la membrana esterna, riducendo la carica negativa del lipopolisaccaride; tale effetto è transitorio/reversibile, perché quando le specifiche condizioni di induzione vengono invertite la suscettibilità ritorna.

1.1.1. INFEZIONI POLMONARI: ACUTE E CRONICHE

Per quanto riguarda le infezioni *Pseudomonas aeruginosa* colpisce principalmente i bronchi, nello specifico le infezioni acute sono il risultato di un danno a livello dell'epitelio bronchiale e quando tale condizione persiste, come nel caso di pazienti immunodepressi, l'infezione può diventare cronica.

L'alta incidenza di *Pseudomonas aeruginosa* negli ospedali è dovuta al basso stato di salute dei pazienti e all'elevata presenza di ceppi antibiotico resistenti negli ospedali [42]; la mortalità maggiore (30%) si nota nei pazienti sotto ventilazione meccanica assistita (VAP), dato che l'inserzione del tubo endotracheale comporta un danno all'epitelio bronchiale, inoltre ci può essere una trasmissione dell'infezione da paziente a paziente data la presenza del biofilm sulla plastica del tubo, tali biofilm sono molto difficili da rimuovere perché proteggono il batterio all'interno rendendo inefficaci antibiotici e disinfettanti utilizzati nel processo di pulizia [43]. Le infezioni acute possono sfociare anche in soggetti immunodepressi a causa: dell'età avanzata, pazienti ospedalizzati per altre ragioni che entrano in contatto con l'agente patogeno stesso in ospedale e pazienti sottoposti a chemioterapia.

Se non viene eradicata subito, l'infezione da acuta può diventare cronica dato l'adattamento all'ambiente di *Pseudomonas aeruginosa* con la produzione di biofilm, come nei pazienti affetti da fibrosi cistica dove l'infezione polmonare dura anche 20 anni [8]; oppure anche in pazienti affetti da bronchiectasia cronica, data dalla distruzione del tessuto muscolare ed elastico che rivestono il bronco per causa di gravi infezioni respiratorie passate, causando una dilatazione irreversibile dei bronchi ma confinata in una zona specifica [43]; un altro esempio è dato dai pazienti affetti da broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), malattia che si presenta soprattutto in soggetti anziani e fumatori, causata da una infezione cronica del tessuto polmonare che causa un restringimento dei bronchi diminuendo, e nei casi più gravi bloccando, il passaggio di aria [43].

2. SCOPO TESI

Pseudomonas aeruginosa è un batterio ubiquitario dalle grandi capacità adattative grazie alla presenza di diversi tipi di fattori di virulenza come: pili, flagelli, sistema di secrezione di tossine, quorum sensing, formazione di biofilm, produzione di proteasi, presenza di lipopolisaccaridi e resistenze intrinseche, acquisite e adattative; che lo rendono capace di causare infezioni di diverso tipo e grado, in base alle condizioni iniziali del paziente.

In particolare negli ultimi anni si è evidenziato un aumento degli isolamenti di *Pseudomonas aeruginosa* in pazienti affetti da infezioni polmonari acute e croniche, in alcuni casi anche mortali causate da batteriemia e sepsi, riscontrate specialmente in pazienti con immunodeficienze; di conseguenza si è notata anche un'alta persistenza di *Pseudomonas aeruginosa* all'interno dell'Hesperia Hospital di Modena data l'elevata presenza di ceppi antibiotico resistenti. Confrontando i dati nazionali [1] con i broncoaspirati dei pazienti in rianimazione dell'Hesperia negli ultimi anni, questi coincidono per la gran parte con i dati nazionali, visto che in rianimazione arrivano spesso pazienti in età geriatrica con patologie pregresse.

Perciò vista l'elevata presenza e pericolosità delle infezioni polmonari causate da *Pseudomonas aeruginosa* all'interno dell'ambiente ospedaliero, è importante capire i meccanismi che portano all'instaurazione dell'infezione e alla sua cronicizzazione. Per verificare tali capacità patogene si sono eseguiti una serie di test in vitro su cellule di epitelio bronchiale umano BEAS-2B infettate con un ceppo di *Pseudomonas aeruginosa* isolato da un paziente affetto da polmonite, la quale patogenicità è stata confrontata con quella di un ceppo ATCC di controllo non patogeno.

3. MATERIALI E METODI

3.1.CEPII BATTERICI

Abbiamo utilizzato un ceppo clinico di *Pseudomonas aeruginosa* (SPIC) isolato dall'espettorato di un paziente affetto da polmonite, bisogna tenere conto che il soggetto è affetto anche da Miastenia Gravis: una malattia autoimmune dovuta alla presenza di anticorpi specifici che riconoscono come non-self diversi componenti postsinaptici della giunzione neuromuscolare, nello specifico si tratta dei recettori ionotropici nicotidici per l'acetilcolina [44], causando debolezza muscolare; tale malattia è spesso associata a Timoma tipo B2, una neoplasia epiteliale del timo caratterizzata da elevata prevalenza di linfociti. Il paziente al momento della diagnosi di polmonite era sotto chemioterapia per delle metastasi a livello polmonare.

I ceppi ATCC sono microrganismi di riferimento certificati dalla ISO 17034 utilizzati per il controllo di qualità in diverse tipologie di laboratori; nello specifico è stato utilizzato *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (SPAT) creato dall'azienda MicroQuant™ isolato da una infezione dell'orecchio esterno, categorizzato come BSL-2.

3.1.1. TERRENI DI COLTURA

Entrambi i ceppi sono stati mantenuti in laboratorio tramite crescita in brodo TSB e terreni TSA, mantenuti alla temperatura di 37 °C in incubatore. Nello specifico:

Il brodo TSB (Tryptic Soy Broth) viene utilizzato per la replicazione dei ceppi batterici in sospensione, il brodo comprende digestati enzimatici di farina di soia e caseina, peptoni che forniscono aminoacidi e composti azotati, Inoltre contiene cloruro di sodio per mantenere l'equilibrio osmotico e destrosio che fornisce carboidrati ed energia, è presente anche idrogeno fosfato dipotassico come agente tampone per mantenere l'equilibrio del pH. La colonia viene posta all'interno di falcon da 15ml contenente TSB con tappo leggermente svitato, per garantire l'ambiente aerobio e posto in incubatore a 37°C per 24 ore.

Le piastre TSA (Tryptone Soy Agar) vengono utilizzate per la crescita e conta delle colonie e vengono poste sempre in incubatore a 37°C per circa 24 ore. Si tratta di terreno nutritivo aspecifico che permette la crescita di un'ampia gamma di batteri, contiene caseina e peptoni di soia, che forniscono i composti azotati essenziali (aminoacidi e peptidi) necessari per la crescita batterica.

3.2. IDENTIFICAZIONE E ANTIBIOGRAMMA AL VITEK

L'identificazione e la determinazione della MIC dei ceppi batterici sono state eseguite mediante il sistema automatico VITEK-2 bioMerieux (Fig.4): si tratta di uno strumento automatico per l'identificazione e l'antibiogramma dei ceppi microbici, permettendo un maggior grado di efficienza e standardizzazione dei risultati.



Figura 4: Sistema automatico VITKE-2 bioMerieux

L'esecuzione dei test di antibiotico-sensibilità si basano sul rilievo strumentale della torbidità dei terreni con diverse concentrazioni di specifici antibiotici presenti nelle VITEK CARDS (Fig.5), in cui viene inculato la sospensione batterica preparata in precedenza. Le rilevazioni della torbidità nel VITEK vengono effettuate ogni 15 minuti, la crescita del germe sarà inversamente proporzionale alla quantità di luce in grado di passare le cellette contenenti i brodi di coltura; quindi la variazione tra la lettura iniziale e quelle successive è espressa come percentuale di variazione della luce trasmessa, la quale viene calcolata per ogni pozzetto e comparata ad un valore soglia specifico per singolo pozzetto: se la percentuale della variazione è \geq al valore soglia il test viene dichiarato positivo, mentre se la percentuale di variazione è $<$ al valore soglia il test viene dichiarato negativo.



Figura 5: Card VITEK2

Per quanto riguarda le card per l'identificazione dipendono dal tipo di microrganismo: per i Gram negativi si utilizza la GN, mentre i Gram positivi la GP; stesso ragionamento per le card per gli antibiogrammi: 438 e 439 per i Gram negativi e 658 e 659 per i Gram positivi. La differenza in queste card è che in quelle per l'identificazione nelle celle sono presenti diversi terreni con sostanze/metaboliti diversi che vengono utilizzati dai batteri, mentre in quelle per l'antibiogramma nelle celle sono presenti antibiotici a concentrazioni diverse, dando come risultato uno schema di antibiotico resistenza e antibiotico sensibilità rappresentato con la MIC, che viene convertito nelle categorie S (sensibile) I (intermedio) e R (resistente) secondo i breakpoints stabiliti da EUCAST. La preparazione delle card segue un flusso ben specifico:

- Si versano 1.8 ml di soluzione fisiologica all'interno di provette nelle quali si fa sciogliere le colonie batteriche (tramite vortex) fino ad ottenere un varole densitometrico pari a 0,5 Mc Farland (per Gram).
- Si posizionano le card con il tubicino di aspirazione all'interno della provetta (Fig.6), il tutto su un supporto specifico che viene posto all'interno della camera di aspirazione del VITEK, dove la soluzione verrà inoculata nei 45 pozzetti delle card.
- Tramite un sistema di canalicoli, una volta effettuata l'aspirazione le cards vengono sigillate e caricate sul rotore di lettura del VITEK.

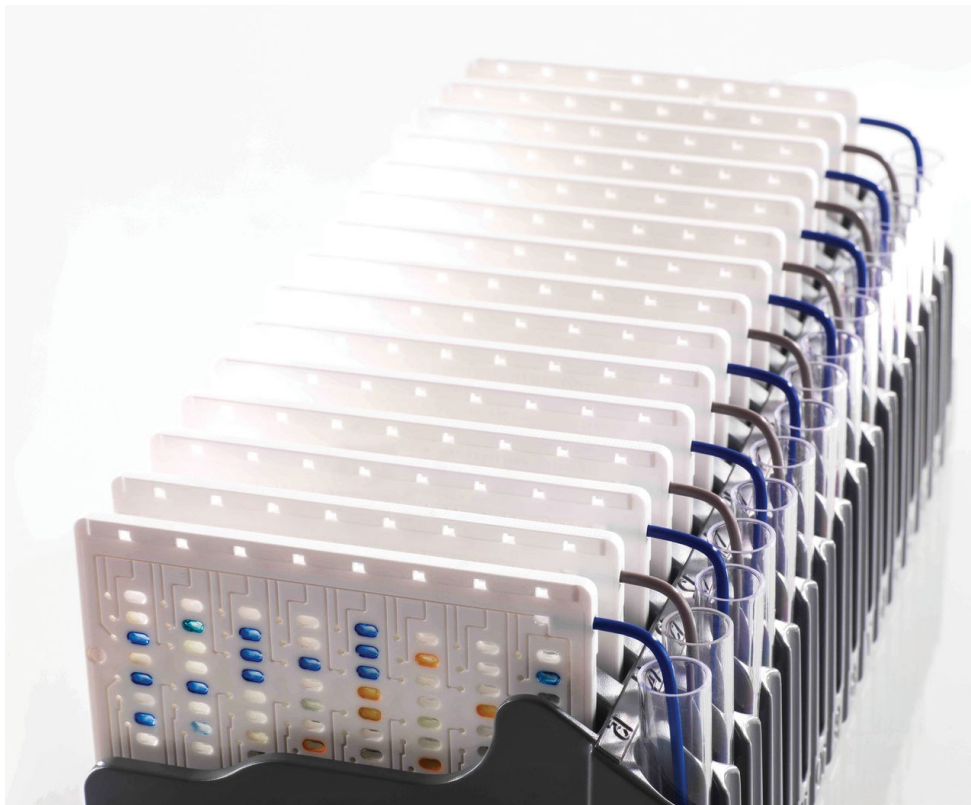


Figura 6: VITEK CARD poste sul supporto per il caricamento nel VITEK-2

3.3. COLTURE CELLULARI

Si tratta di cellule BEAS-2B: derivano dall'epitelio bronchiale sano, sono immortalizzate tramite infezione virale con adenovirus 12-SV40, conferendo alle cellule una durata di vita prolungata mantenendo inalterate molte caratteristiche morfologiche e funzionali tipiche delle cellule epiteliali bronchiali primarie. Rispondono in modo prevedibile alle citochine, stress ossidativo e altri stimoli tipici dell'esposizione al tratto respiratorio agli agenti patogeni e ambientali; rendendole un ottimo modello per lo studio dei meccanismi di infiammazione e stress ossidativo nelle cellule polmonari (Fig.7).

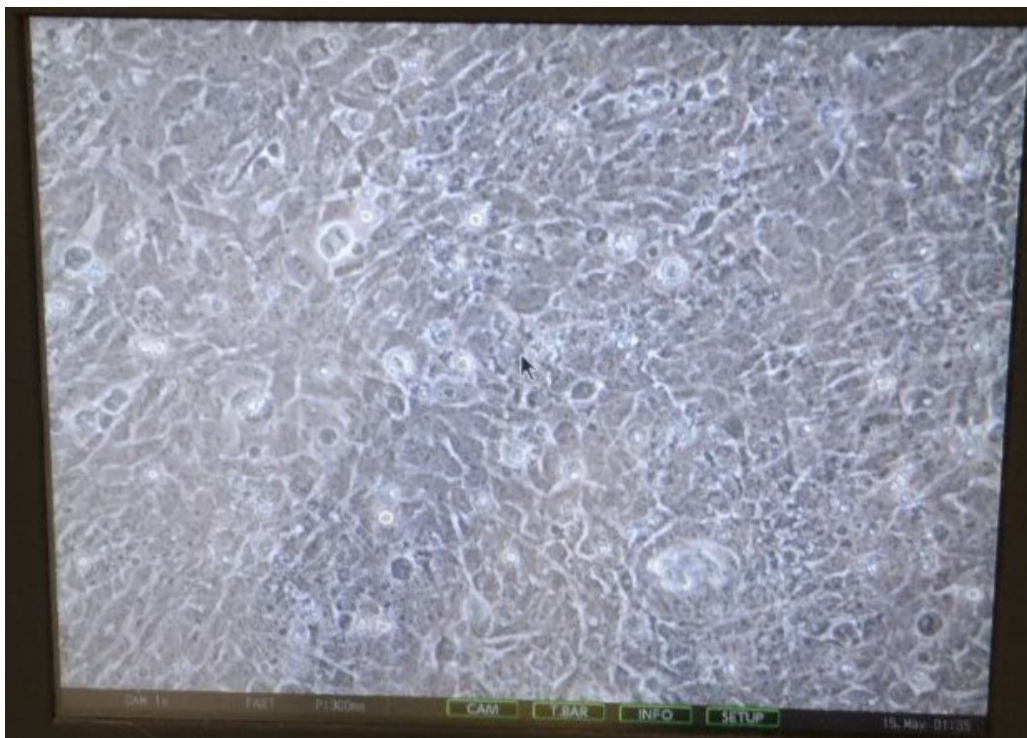


Figura 7: monostrato formato dalle BEAS-2B al microscopio

3.3.1. MANTENIMENTO

Queste cellule sono state mantenute in laboratorio con terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Fig.8), un medium composto da: glucosio in alte concentrazioni, piruvato di sodio e bicarbonato di sodio che servono per la crescita delle cellule, contiene anche il colorante rosso fenolo che funge da indicatore del pH della coltura, dato che in condizioni neutre/basiche ha un colore rosso mentre vira verso il giallo quando il pH diventa acido. A tale terreno base sono stati aggiunti antibiotici come Penicillina e Streptomicina, e altre componenti per migliorare la crescita cellulare come glutammato e FBS (Fetal Bovine Serum).



Figura 8: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

La soluzione cellulare viene posta in flask da 6ml di plastica trattate per permettere l'adesione alle cellule e vengono poste in incubatore a 37°C, il tappo contiene un filtro in modo tale da permettere il passaggio di CO₂ all'interno della flask.

Per il mantenimento della linea cellulare, una volta che le cellule arrivano a confluenza o quando il terreno vira verso il giallo (acidificazione terreno), vengono splittate con rapporti diversi in base all'esigenza: rapporti bassi (1:9) per il mantenimento della linea, oppure rapporti alti (1:4) in modo tale da avere un numero sufficientemente alto di cellule per la formazione di un monostrato sul fondo dei pozzetti delle piastre multiwell per eseguire l'infezione; tale processo viene eseguito rigorosamente sotto cappa per evitare una contaminazione e prevede:

- Rimozione del DMEM con pipetta automatica e primo lavaggio con 2ml di tripsina per 10 secondi, nel mentre si inclina leggermente la flask per distribuire in maniera omogenea la tripsina.
- Rimozione tripsina e aggiunta di 1ml di tripsina per circa 2 minuti in incubatore per facilitare il distacco delle cellule dal fondo della flask.
- Una volta che le cellule sono staccate si aggiungono 3ml di DMEM completo 10%FBS e si eseguono delle "spipettature" per permettere il distacco delle cellule l'una dalle altre. Dopo diverse spipettature si controllano le cellule al microscopio ottico inverso, cercando di ottenere singole cellule (Fig.9) in modo tale che le cellule crescano formando un monostrato uniforme in tutta la flask.
- In base al rapporto desiderato si conserva una parte di questa sospensione cellulare, facendo un paio di esempi dei rapporti più utilizzati:

$$1 : 4 = x : 6 \text{ (ml, volume flask)} \Rightarrow x = 1,5 \text{ mL di sospensione cellulare}$$

$$1 : 12 = x : 6 \Rightarrow x = 0,5 \text{ mL}$$

Al volume di x si aggiunge il DMEM completo 10%FBS per portare a volume la flask.

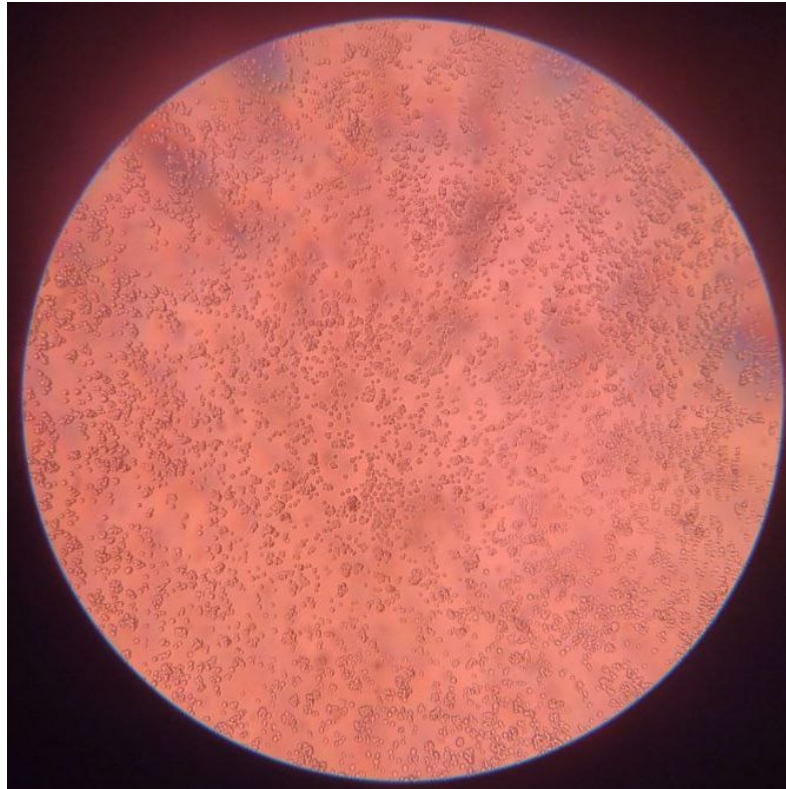


Figura 9: Visione al microscopio ottico di BEAS-2B separate

3.3.2. PIASTRE PER INFEZIONE

Per quanto riguarda la preparazione delle piastre multipozzetto per le infezioni il procedimento è lo stesso solo che bisogna utilizzare il DMEM senza l'aggiunta di antibiotici, in modo tale da non ostacolare la crescita dei ceppi batterici, ma con l'aggiunta del FBS per permettere la replicazione delle cellule all'interno dei pozzetti. Inoltre per avere la giusta densità cellulare nei pozzetti bisogna contare le cellule con la camera di Burker in modo tale da avere un numero di cellule sufficienti per la concentrazione scalare decisa l'infezione. Nello specifico la conta con la camera di Burker avviene:

- Dopo aver effettuato lo split cellulare, ottenendo una sospensione con cellule ben dissociate tra loro, si prelevano circa 500 μ L della sospensione e si trasferiscono in una provetta Eppendorf. Si prelevano 20 μ L dalla sospensione cellulare e vengono posti in una Eppendorf contenente 80 μ L di Trypan blue, un colorante blu che serve per distinguere le cellule vive da quelle morte (o dal fondo della camera), nello specifico il colorante non entra nelle cellule vive dato che la membrana è intatta, mentre nelle cellule morte riesce ad entrare dato il danno alla membrana. Questo permette di distinguere le cellule vive (chiare) dal fondo della camera, permettendo di contarle.

- Dopo aver miscelato delicatamente la sospensione cellulare, si prelevano 20 μL e si caricano nella camera di Bürker (Fig.10). Quest'ultima è costituita da un vetrino con due spallette laterali rialzate; nella zona centrale è incisa una griglia che consente il conteggio delle cellule. Posizionando il puntale della micropipetta sul bordo del coprivetrino che ricopre la camera, la sospensione viene richiamata all'interno per capillarità, riempiendo uniformemente lo spazio di conteggi. Al microscopio si nota che la griglia composta da 9 quadrati delimitati da 3 righe, ciascuno di questi quadrati è formato a sua volta da 16 quadrati più piccoli delimitati da 2 righe, formando un volume di 1mm^3 che equivale a $0.1\mu\text{L}$. Si contano le cellule in 3 di questi quadrati più grandi facendo una media delle cellule presenti, La media viene ottenuta viene moltiplicata per 5×10^4 , dato che è il fattore di conversione assieme al numero di cellule che vogliamo per pozzetto. il valore ottenuto viene utilizzato come denominatore di 150×10^5 , ottenendo i mL da prelevare dalla sospensione cellulare iniziale (quella da dove sono stati presi i $500\mu\text{L}$), i quali si porteranno a soluzione (in base a quanti pozzetti abbiamo) con il DMEM senza antibiotici.

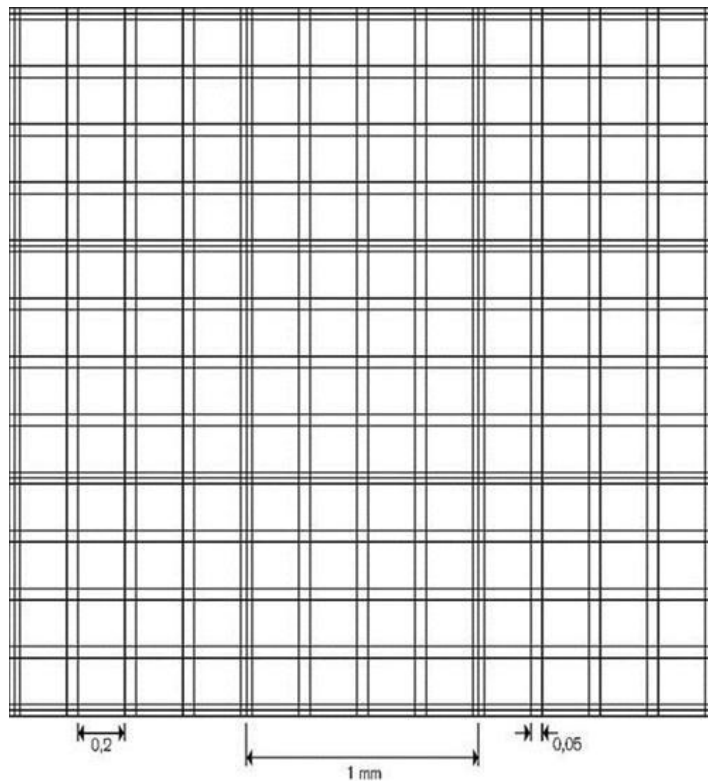


Figura 10: Camera di Bürker

Una volta che la sospensione cellulare è stata posta nei pozzetti della piastra, questa viene posta nell'incubatore a $37\text{ }^\circ\text{C}$, in modo tale che dopo circa 24 ore si avrà un monostrato uniforme di cellule BEAS-2B sul fondo di ciascun pozzetto pronte per l'infezione.

3.4. INFEZIONE

Per prima cosa bisogna decidere la concentrazione scalare (MOI) dei batteri con cui fare l'infezione, nella maggior parte degli esperimenti è stata utilizzata una MOI 100: vuol dire che per ogni cellula troveremo 100 batteri, quindi se in ogni pozzetto della piastra con le cellule preparate il giorno prima abbiamo 5×10^5 cellule, vuol dire che per ogni pozzetto dovremmo aggiungere all'incirca 5×10^7 batteri, in modo tale da avere la MOI 100.

Quindi per prima cosa bisogna calcolare quanti batteri sono presenti nella falcon madre: in una piastra multipozzetto da 96 con fondo piatto si inseriscono 100uL di sospensione batterica di SPIC e SPAT in pozzetti separati, nel terzo pozzetto si inseriscono 100uL di TSB utilizzato per la crescita dei batteri che funge da "bianco". La piastra viene inserita nello spettrofotometro e si esegue una lettura OD a 595nm, ai valori di SPIC e SPAT vanno sottratti i valori del TSB (bianco), ottenendo i valori reali delle letture; questi valori (nell'equazione sono "x") vanno inseriti nell'equazione della retta di crescita dei batteri per ottenere la concentrazione iniziale:

$$\text{SPIC } y = 5E+09x + 2E+07$$

$$\text{SPAT } y = 7E+09x - 5E+07$$

Utilizzando la legge delle diluizioni $C_i \times V_i = C_f \times V_f$ si trova il volume di soluzione batterica da prelevare dalla madre per ottenere la nostra MOI 100, tale valore verrà aggiunto alla soluzione di DMEM necessaria per infettare tutti i pozzetti (1000uL per pozzetto). (Fig.11)



Figura 11: Piastra infezione dopo 6 ore

Per controllare che la MOI utilizzata sia effettivamente 100 si esegue un controllo tramite la conta delle CFU in TSA della soluzione utilizzata per infettare, previo diluizioni in modo tale da avere un numero di colonie contabili (all'incirca 50); da contare il giorno seguente all'infezione dopo 24 ore in cella calda a 37°C.

3.5. TEST PER LDH

La Lattato deidrogenasi è un enzima che si trova all'interno del citoplasma intracellulare, quindi in caso di danno viene riversato nell'ambiente extracellulare: per cui viene utilizzato come indice di danno nei saggi di citotossicità. L'unico difetto di questa tecnica è che nell'ambiente extracellulare possono trovarsi proteasi batteriche che vanno a degradare la lattato deidrogenasi, di conseguenza si sottostima il valore reale, e in caso di danno elevato ci possono essere delle interferenze con la lettura degli OD allo spettrofotometro.

Il protocollo prevede il prelievo del surnatante dai pozzetti in cui sono state poste le cellule infettate con il batterio, a una certa concentrazione scalare MOI e a intervalli di tempo diversi. In seguito si prepara una piastra multipozzetto da 96 pozzetti trasparenti con fondo piatto per la lettura OD, dove in ciascun pozzetto si mettono 100uL del campione. Conviene fare 3 replicati per campione, in più ad un controllo negativo con solo cellule, che ci dirà la lettura OD senza danno, e un controllo positivo con cellule lisate per la lettura OD del massimo danno. (Fig. 12 e 13)

Il kit LDH contiene due reagenti: il catalizzatore (b1) e il colorante (b2), che nel kit utilizzato sono rispettivamente: una miscela di diaforasi/NAD⁺ e cloruro di iodotetrazolio (INT)/lattato di sodio. La LDH ossida il lattato a piruvato che reagisce poi con il sale di tetrazolio INT a formazanata. Si procede con la creazione della "Reaction Mix" utilizzando i reagenti seguendo la formula:

$2,5\mu\text{L (b1)} + 112,5\mu\text{L (b2)} = \text{quantità di Reaction Mix per un pozzetto}$

Avendo un numero "n" di pozzetti la formula diventa:

$(n \times 2,5\mu\text{L}) + (n \times 112,5\mu\text{L}) = \text{quantità Reaction Mix per n pozzetti}$

Una volta creata la Reaction Mix per n pozzetti si prelevano 100uL da mettere in ciascun pozzetto; Quindi il volume totale in ciascun pozzetto sarà di 200uL: 100 di campione + 100 di Reaction Mix. Il tutto viene tenuto al buio per 30 minuti a temperatura ambiente per permettere la reazione di b1 e b2.

Allo scadere dei 30 minuti si esegue la lettura degli OD allo spettrofotometro, si eseguono 2 letture: una a 492nm e l'altra a 620nm. Ottenendo 2 valori per ciascun replicato, per ottenere un OD pulito/reale del replicato bisogna eseguire:

$(\text{OD } 492 \text{ replicato X}) - (\text{OD } 620 \text{ replicato X}) = \text{OD pulito/reale del replicato X}$

Ottenendo TUTTI valori OD pulito/reale si può calcolare la % danno in ogni condizione tramite la formula:

$((\text{OD replicato X reale} - \text{OD controllo negativo reale}) / (\text{OD controllo positivo reale} - \text{OD controllo negativo reale})) \times 100$

Avendo 4 replicati per campione otteniamo 3 valori di OD reali per campione, con i quali si calcola la media di % danno in ogni condizione.

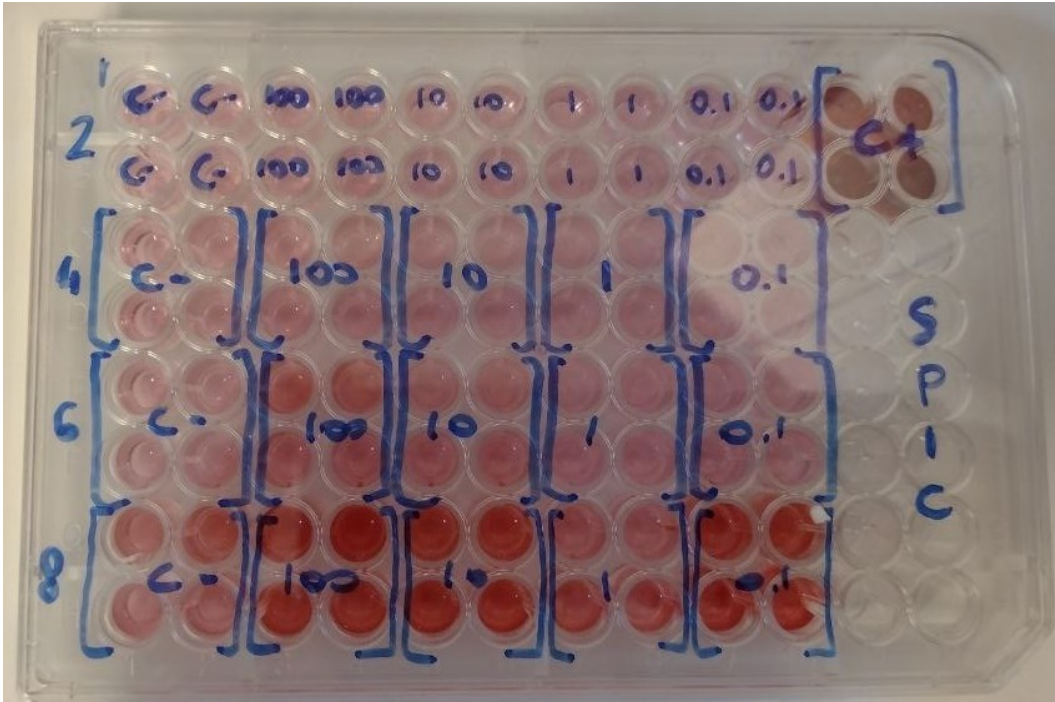


Figura 12: piastra LDH SPIC

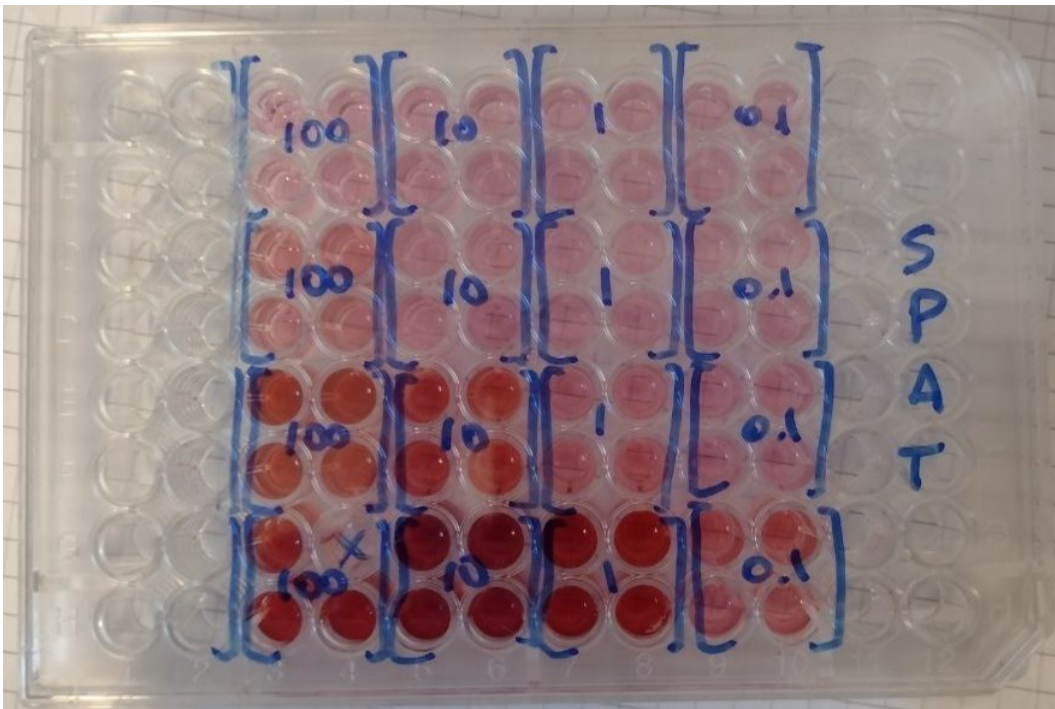


Figura 13: piastra LDH SPAT

3.6.CINETICA DI CRESCITA

La piastra dell'infezione viene posta all'interno dello spettrofotometro per 24 ore, ogni ora lo strumento farà una lettura a OD 595nm il cui valore sarà direttamente proporzionale alla crescita batterica. Facendo una media dei replicati per ogni ora è possibile costruire una curva di crescita dove si nota una fase iniziale di crescita, picco di replicazione seguita da una fase stabile e fase di plateau.

3.7.BIOFILM

Per valutare la formazione del biofilm da parte dei ceppi è stata presa una piastra multipozzetto nella quale sono stati inseriti solo i batteri, la formazione del biofilm in presenza di cellule non è stata calcolata dato il trattamento con la tripsina nel protocollo di colorazione del biofilm, la piastra in seguito all'infezione di diverse ore viene trattata seguendo il protocollo:

- Si elimina il surnatante e si eseguono 3 lavaggi con 200uL di PBS x1 per ogni pozzetto, si lascia asciugare per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Si aggiungono 200uL di Tryton, segue lavaggio con 200uL PBS.
- Il biofilm viene fissato mediante trattamento con 200uL di Metanolo 99%, viene lasciato agire per 15 minuti e in seguito viene rimosso, la piastra viene lasciata asciugare per 10 minuti.
- Il biofilm viene colorato con 200uL di cristalvioletto 2% e lasciato agire per 5 minuti
- Si elimina il surnatante e si effettuano diversi lavaggi con acqua distillata per eliminare l'eccesso di cristalvioletto.
- La piastra viene lasciata asciugare e tamponata per eliminare ogni residuo d'acqua.

La piastra una volta trattata viene posta nello spettrofotometro per la lettura OD 595nm, anche in questo caso la formazione di biofilm è direttamente proporzionale alla lettura OD, nello specifico per valutare la produzione di biofilm si utilizza uno schema nel quale si sceglie un valore di OD che funge da cut-off (OD pozzetti trattati ma vuoti) e viene paragonato con le lettura OD dei campioni:

$OD \text{ campione} \leq OD \text{ cut-off} = \text{non produce biofilm}$

$OD \text{ cut-off} < OD \text{ campione} \leq 2x \text{ OD cut-off} = \text{produzione bassa/debole biofilm}$

$2x \text{ OD cut-off} < OD \text{ campione} \leq 4x \text{ OD cut-off} = \text{produzione moderata di biofilm}$

$OD \text{ campione} > 4x \text{ OD cut-off} = \text{produzione alta/forte di biofilm}$

3.8. ESTRAZIONE RNA

L'estrazione di RNA dai due ceppi dopo l'infezione consente di fare in seguito delle analisi sulla trascrittomica, che possono spiegare eventuali differenze sulla patogenicità dei ceppi. Nello specifico a seguito dell'infezione eseguita su una piastra multiwell da 24 pozzetti, si rimuove il terreno e si effettua un lavaggio con 500uL di PBS, una volta tolto il PBS si aggiungono 200uL di tripsina e la piastra viene lasciata 5 minuti in incubatore a 37°C per garantire il distacco delle cellule dal pozzetto. In seguito il contenuto di ogni singolo pozzetto viene spostato in una eppendorf specifica per quella condizione (solo BEAS, BEAS+SPIC, BEAS+SPAT, solo SPIC, solo SPAT), le eppendorf vengono poste in centrifuga a 1000 rpm per circa due minuti in modo tale da separare le cellule/batteri dal surnatante, che viene scartato; in seguito si procede con l'estrazione dell'RNA dal pellet ottenuto seguendo il protocollo specifico della Quick-RNA™ Fungal/Bacterial Microprep, il quale è diviso in due parti: la prima prevede la formazione della soluzione Buffer aggiungendo 96ml di 100% etanolo (o 104ml di 95% etanolo) a 25ml della RNA Wash Buffer; successivamente si procede con l'estrazione dell'RNA:

- Il pellet viene risospeso in 800uL di RNA Lysis Buffer tramite vortex e il tutto viene trasferito nella ZR Bashing Bead Lysis Tube, la quale viene a sua volta inserita in una provetta che serve per raccogliere l'eluato. Le provette vengono centrifugate a 3000rpm per un minuto.
- L'eluato ottenuto nella provetta viene trasferito in Zymo-Spin™ IIICG Column, la quale viene sempre inserita in una provetta e centrifugata a 3000rpm per trenta secondi.
- Si aggiungere un pari volume di etanolo (95% o 100%) all'eluato ottenuto, il tutto viene trasferito nella Zymo-Spin™ IC Column, la quale viene inserita in una provetta e centrifugata a 3000rpm per trenta secondi.
- In questo caso si elimina l'eluato e si continua a lavorare sulla Zymo-Spin™ IC Column, nella quale si aggiunge 400uL di RNA Prep Buffer e si centrifuga a 3000rpm per trenta secondi.
- Anche in questo caso si elimina l'eluato e vengono aggiunti 700µl di RNA Wash Buffer alla Zymo-Spin™ IC Column, che viene centrifugata a 3000rpm per trenta secondi.
- Si elimina l'eluato e si aggiungono 400uL di RNA Wash Buffer, la provetta viene centrifugata a 3000rpm per circa un minuto in modo tale da rimuovere completamente il Wash Buffer.
- La Zymo-Spin™ IC Column viene trasferita in una provetta trattata priva di nucleasi, per evitare la degradazione dell'RNA, si aggiungono 15uL di DNase/RNase-Free Water e si centrifuga a 3000rpm per trenta secondi.
- L'eluato ottenuto contiene l'RNA, il quale può essere conservato a -80°C o utilizzato.

3.8.1. NANODROP

Prima di utilizzare l'RNA estratto bisogna valutarne la purezza al Nanodrop, uno spettrofotometro compatto (UV 190-850nm) progettato per l'analisi di microvolumi, consentendo la misurazione della concentrazione di RNA nel campione, e l'eventuale contaminazione da DNA e fenoli. Prima di utilizzare lo strumento (Fig.14) si effettua un lavaggio con acqua distillata e in seguito si setta il bianco inserendo nello strumento 1-2 μ L di DNase/RNase-Free Water, successivamente si può procedere con la lettura dei campioni (1 μ L) dove il nanodrop esegue 3 letture per campione:

- 260nm: da indicazioni sulla quantità di RNA estratto, un valore per essere definito buono deve essere superiore di 200mg/uL.
- 280nm: da indicazioni sulla contaminazione da parte del DNA, nello specifico lo strumento esegue un rapporto della quantità di RNA rispetto a quella di DNA (260nm/280nm) se il risultato è minore di 2 allora è presente una contaminazione di DNA nel campione.
- 230nm: da indicazioni sulla contaminazione da parte dei fenoli, seguendo lo stesso ragionamento del DNA, lo strumento esegue un rapporto della quantità di RNA rispetto a quella dei fenoli (260nm/230nm) se il risultato è minore di 2 allora è presente una contaminazione di fenoli nel campione.



Figura 14: utilizzo del Nanodrop

4. RISULTATI

4.1. BRONCOASPIRATI HESPERIA HOSPITAL

Analizzando gli isolati dei broncoaspirati del reparto di rianimazione dell'Hesperia Hospital si nota che nel 2023 (Grafico 1) e 2024 (Grafico 2) *Pseudomonas aeruginosa* è l'agente patogeno più presente con una percentuale sul totale pari al 26,9% nel 2023, e 31,6% nel 2024.

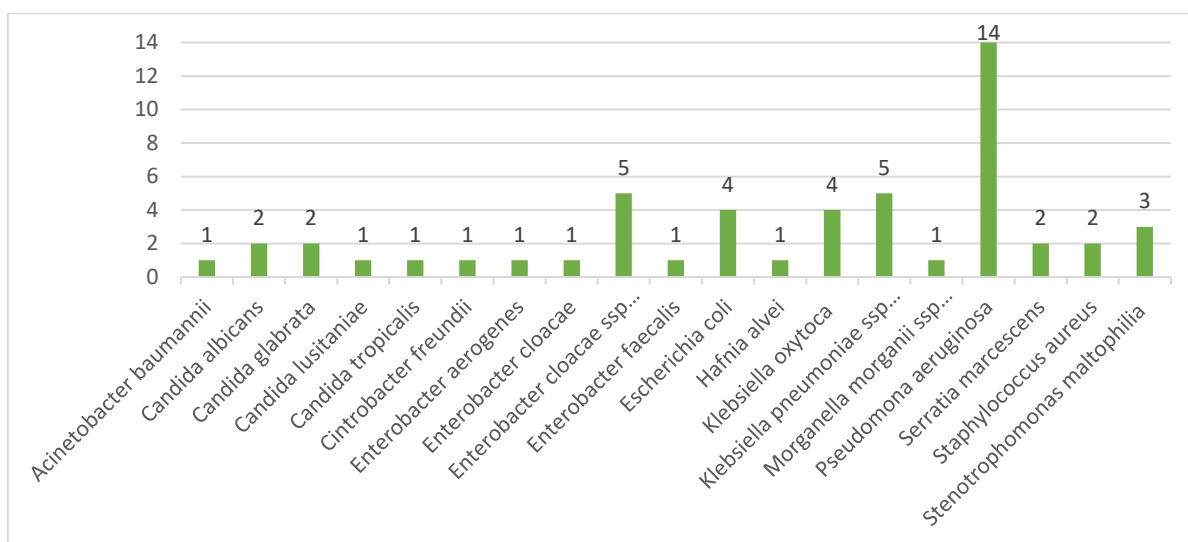


Grafico 1: Isolati da broncoaspirati rianimazione Hesperia Hospital 2023

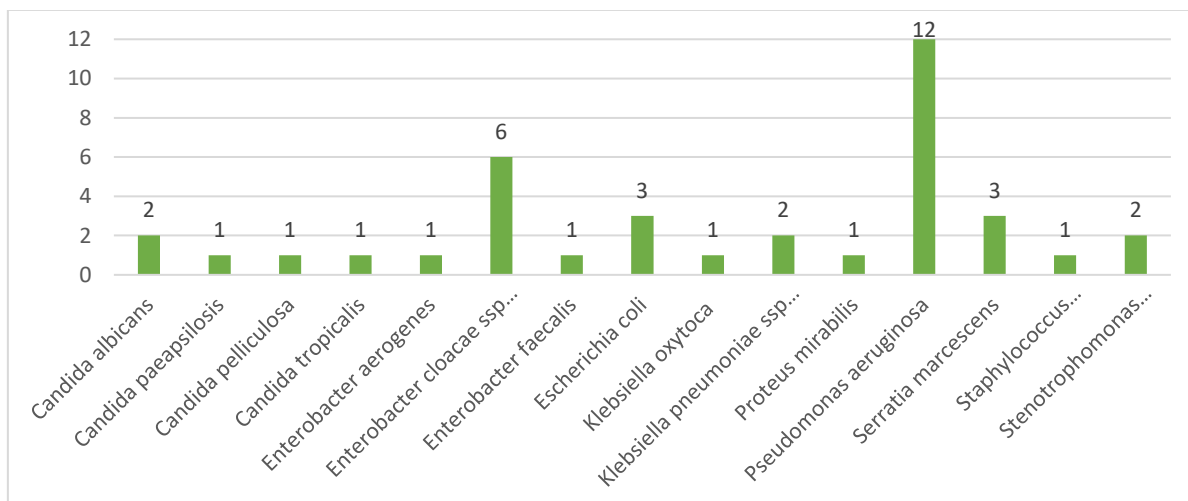


Grafico 2: Isolati da broncoaspirati rianimazione Hesperia Hospital 2024

Invece nel 2025 (Grafico 3) si è visto un calo significativo della presenza di *Pseudomonas aeruginosa* (9,5% degli isolati) dovuta ad una nuova politica ospedaliera sull'utilizzo di antibiotici in maniera ciclica per evitare una pressione selettiva che porterebbe allo sviluppo di ceppi con resistenze multiple, come per esempio il Meropenem/Varbobactam il quale si tratta di una nuova molecola messa a punto per aggirare la resistenza di alcuni agenti patogeni al Meropenem, aggiungendo una molecola che protegge l'anello beta-lattamico dall'azione delle carbapenemasi batteriche.

Inoltre la minor presenza di *Pseudomonas aeruginosa* è data anche dal calo generale degli isolamenti dalla rianimazione, dovuto alla maggiore presenza di pazienti lungodegenti nel reparto.

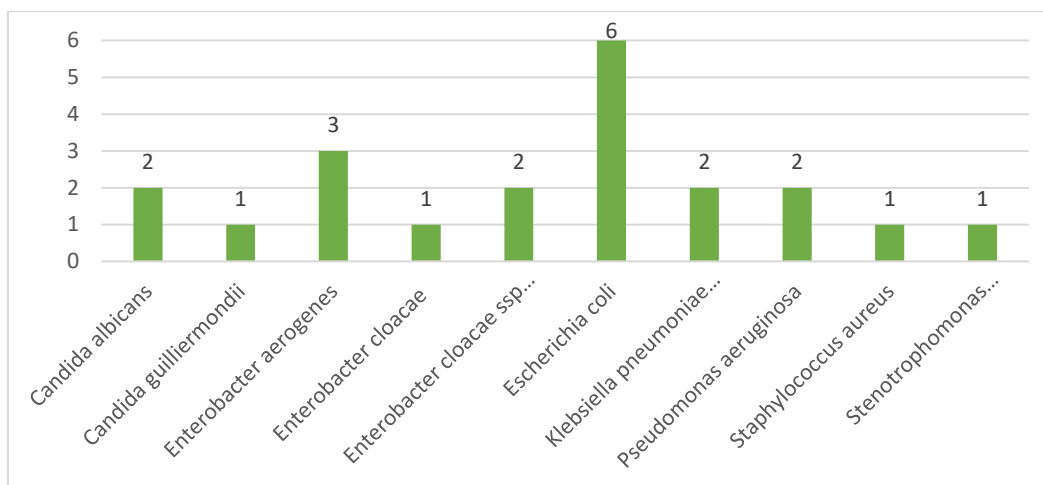


Grafico 3: Isolati da broncoaspirati rianimazione Hesperia Hospital 2025

4.2. IDENTIFICAZIONE E ANTIBIOGRAMMA

L'identificazione dei ceppi e la determinazione dell'antibiogramma sono stati effettuati mediante il sistema automatico VITEK-2 (bioMérieux), che ha confermato entrambi i ceppi come *Pseudomonas aeruginosa*. L'antibiogramma (Fig.15 e Fig.16) mostra profili di sensibilità complessivamente simili; tuttavia, la differenza principale riguarda il ceppo SPIC, che presenta una MIC più elevata e una resistenza alla Piperacillina/Tazobactam. Tale osservazione è coerente con l'origine dei ceppi: SPIC, di origine ospedaliera, è stato probabilmente esposto a diversi antibiotici, mentre SPAT, proveniente da un contesto aziendale, non ha avuto contatti con trattamenti farmacologici.

Inoltre confrontando SPIC con altri antibiogrammi provenienti da isolati clinici di broncoaspirati del reparto di rianimazione dell'Hesperia Hospital (Fig.17 e Fig.18) si nota che hanno un profilo molto simile tra di loro: per esempio sono resistenti alla Piperacillina/Tazobactam, una penicillina ad ampio spettro comunemente impiegata nel trattamento delle infezioni delle basse vie respiratorie; e possono sviluppare facilmente una resistenza ad antibiotici cefalosporinici di terza (Ceftazidima) e quarta generazione (Cefepime), si tratta di antibiotici ad ampio spettro utilizzati nel trattamento delle infezioni delle basse vie respiratorie.

Informazioni sull'identificazione	Card: GN	Numero di lotto: 2413179603	Scade: 10-ago-2026 13:00 CEST		
	Stato: Finale	Tempo di analisi: 5,05 ore	Completato: 14-gen-2026 20:59 CET		
Origine dell'organismo VITEK 2					
Microrganismo selezionato	Probabilità 99% Pseudomonas aeruginosa				
	Bionumero: 0003053100400000 Affidabilità: Identificazione eccellente				
Microrganismi di analisi e test da separare:					
Messaggi di analisi: I seguenti antibiotici sono stati soppressi dall'analisi: Colistina, Il seguente antibiotico(i) non è richiesto: Amoxicillina/acido clavulanico,					
In contraddizione con il tipico profilo/i biochim.					
Informazioni sull'antibiogramma	Card: AST-N439	Numero di lotto: 0723048404	Scade: 1-apr-2026 13:00 CEST		
	Stato: Finale	Tempo di analisi: 18,00 ore	Completato: 15-gen-2026 09:56 CET		
Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione
Amoxicillina/acido clavulanico			Meropenem/Vaborbactam	<= 0,5	S
Piperacillina/tazobactam	<= 4	I	Amikacina	4	S
Ceftazidime	I	I	Gentamicina	<= 1	IE
Ceftazidime/Avibactam	<= 0,25	S	Ciprofloxacina	<= 0,06	I
Ceftolozane/Tazobactam	<= 0,25	S	Tigeciclina	(-)	(-)
Cefepime	<= 0,12	I	Fosfomicina	> 128	
Meropenem	<= 0,25	S	Colistina		
Imipenem/Relebactam	<= 0,25	S			
(-)= Test di sensibilità non raccomandato, la specie è un cattivo bersaglio per la terapia IE= Insufficiente Evidenza che la specie è buon obiettivo per la terapia; Le MIC possono essere segnalate senza interpretazione					
Conclusioni AES:	Ultima modifica:	27-feb-2024 11:52 CET	Set di parametri:	2023_9.03.3_EUCAST_DAS scissione BPaltro.ok	
Livello di affidabilità:	Coerente				

Figura 15: Antibiogramma SPAT

Informazioni sull'identificazione	Card: GN	Numero di lotto: 2413179603	Scade: 10-ago-2026 13:00 CEST		
	Stato: Finale	Tempo di analisi: 6,78 ore	Completato: 14-gen-2026 22:44 CET		
Origine dell'organismo VITEK 2					
Microrganismo selezionato	Probabilità 99% Pseudomonas aeruginosa				
	Bionumero: 0003451103500252 Affidabilità: Identificazione eccellente				
Microrganismi di analisi e test da separare:					
Messaggi di analisi: I seguenti antibiotici sono stati soppressi dall'analisi: Colistina, Il seguente antibiotico(i) non è richiesto: Amoxicillina/acido clavulanico,					
In contraddizione con il tipico profilo/i biochim.					
Informazioni sull'antibiogramma	Card: AST-N439	Numero di lotto: 0723048404	Scade: 1-apr-2026 13:00 CEST		
	Stato: Finale	Tempo di analisi: 12,88 ore	Completato: 15-gen-2026 04:49 CET		
Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione
Amoxicillina/acido clavulanico			Meropenem/Vaborbactam	<= 0,5	S
Piperacillina/tazobactam	64	R	Amikacina	4	S
Ceftazidime	2	I	Gentamicina	<= 1	IE
Ceftazidime/Avibactam	2	S	Ciprofloxacina	0,25	I
Ceftolozane/Tazobactam	1	S	Tigeciclina	(-)	(-)
Cefepime	2	I	Fosfomicina	<= 16	S
Meropenem	<= 0,25	S	Colistina		
Imipenem/Relebactam	0,5	S			
(-)= Test di sensibilità non raccomandato, la specie è un cattivo bersaglio per la terapia IE= Insufficiente Evidenza che la specie è buon obiettivo per la terapia; Le MIC possono essere segnalate senza interpretazione					
Conclusioni AES:	Ultima modifica:	27-feb-2024 11:52 CET	Set di parametri:	2023_9.03.3_EUCAST_DAS scissione BPaltro.ok	
Livello di affidabilità:	Coerente				

Figura 16: antibiogramma SPIC

Informazioni sull'identificazione					
Origine dell'organismo		Operatore			
Microrganismo selezionato		Pseudomonas aeruginosa			
		Imnesso: 18-feb-2026 11:22 CET		Da: piero	
Messaggi di analisi: I seguenti antibiotici sono stati soppressi dall'analisi: Colistina, Il seguente antibiotico(i) non è richiesto: Amoxicillina/acido clavulanico,					
Informazioni sull'antibiogramma		Card: AST-N439	Numero di lotto: 0723192104	Scade: 23-ago-2026 13:00 CEST	
		Stato: Finale	Tempo di analisi: 12,42 ore	Completato: 18-feb-2026 00:16 CET	
Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione
Amoxicillina/acido clavulanico			Meropenem/Vaborbactam	<= 0,5	S
Piperacillina/tazobactam	32	R	Amikacina	4	S
Ceftazidime	2	I	Gentamicina	<= 1	IE
Ceftazidime/Avibactam	2	S	Ciprofloxacina	0,12	I
Ceftolozane/Tazobactam	0,5	S	Tigeciclina	(-)	(-)
Cefepime	4	I	Fosfomicina	128	S
Meropenem	0,5	S	Colistina		
Imipenem/Relebactam	0,5	S			
(-)= Test di sensibilità non raccomandato, la specie è un cattivo bersaglio per la terapia IE= Insufficiente Evidenza che la specie è buon obiettivo per la terapia; Le MIC possono essere segnalate senza interpretazione					
Conclusioni AES:		Ultima modifica: 27-feb-2024 11:52 CET	Set di parametri:	2023_9.03.3_EUCAST_DAS scissione BPaltro.ok	
Livello di affidabilità:		Coerente			

Figura 17: antibiogramma Hesperia Hospital 1

Informazioni sull'identificazione		Card: GN	Numero di lotto: 2413193403	Scade: 24-ago-2026 13:00 CEST	
		Stato: Finale	Tempo di analisi: 6,80 ore	Completato: 24-feb-2026 18:47 CET	
Origine dell'organismo		VITEK 2			
Microrganismo selezionato		Probabilità 99% Pseudomonas aeruginosa		Bionumero: 0043051003500252 Affidabilità: Identificazione eccellente	
Microrganismi di analisi e test da separare:					
Messaggi di analisi: I seguenti antibiotici sono stati soppressi dall'analisi: Colistina, Il seguente antibiotico(i) non è richiesto: Amoxicillina/acido clavulanico,					
In contraddizione con il tipico profilo/i biochim.					
Informazioni sull'antibiogramma		Card: AST-N439	Numero di lotto: 0723237504	Scade: 7-ott-2026 13:00 CEST	
		Stato: Finale	Tempo di analisi: 16,08 ore	Completato: 25-feb-2026 04:04 CET	
Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione
Amoxicillina/acido clavulanico			Meropenem/Vaborbactam	1	S
Piperacillina/tazobactam	32	R	Amikacina	2	S
Ceftazidime	2	I	Gentamicina	<= 1	IE
Ceftazidime/Avibactam	8	S	Ciprofloxacina	> 2	R
Ceftolozane/Tazobactam	1	S	Tigeciclina	(-)	(-)
Cefepime	8	I	Fosfomicina	64	S
Meropenem	4	I	Colistina		
Imipenem/Relebactam	0,5	S			
(-)= Test di sensibilità non raccomandato, la specie è un cattivo bersaglio per la terapia IE= Insufficiente Evidenza che la specie è buon obiettivo per la terapia; Le MIC possono essere segnalate senza interpretazione					
Conclusioni AES:		Ultima modifica: 27-feb-2024 11:52 CET	Set di parametri:	2023_9.03.3_EUCAST_DAS scissione BPaltro.ok	
Livello di affidabilità:		Coerente			

Figura 18: antibiogramma Hesperia Hospital 2

4.3. TEST PER LDH

Il test della lattato deidrogenasi è stato utilizzato come saggio di citotossicità per quantificare il danno a carico delle cellule BEAS-2B da parte dei ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* SPIC e SPAT. Inoltre il test LDH è stato utilizzato per trovare la concentrazione di batteri e l'intervallo di tempo in cui l'infezione causa un danno cellulare ben quantificabile e stabile, in modo tale da utilizzare questi parametri per le successive analisi.

Per il test LDH sono state utilizzate concentrazioni scalari MOI 100, 10, 1 e 0,1 a intervalli di tempo di 2, 4, 6 e 8 ore per l'infezione, effettuando 4 replicati per condizione; analizzando i dati restituiti dallo spettrofotometro e calcolando il danno percentuale si sono ottenuti i dati della tabella (Tabella 1), i quali sono stati tutti raggruppati nel Grafico 4.

	B+SPIC	B+SPAT
2h MOI 100	0,3	1,0
2h MOI 10	0	0,3
2h MOI 1	0,0	0,3
2h MOI 0,1	0	0,4
4h MOI 100	0,9	5,8
4h MOI 10	0,1	1
4h MOI 1	0,0	0,5
4h MOI 0,1	0	0,5
6h MOI 100	5,2	46,4
6h MOI 10	2,1	18,4
6h MOI 1	0,0	3,7
6h MOI 0,1	0,1	0,6
8h MOI 100	27,4	58,2
8h MOI 10	17,5	87,4
8h MOI 1	16,2	68,2
8h MOI 0,1	16,7	2,3

Tabella 1: percentuale danno medio replicati LDH

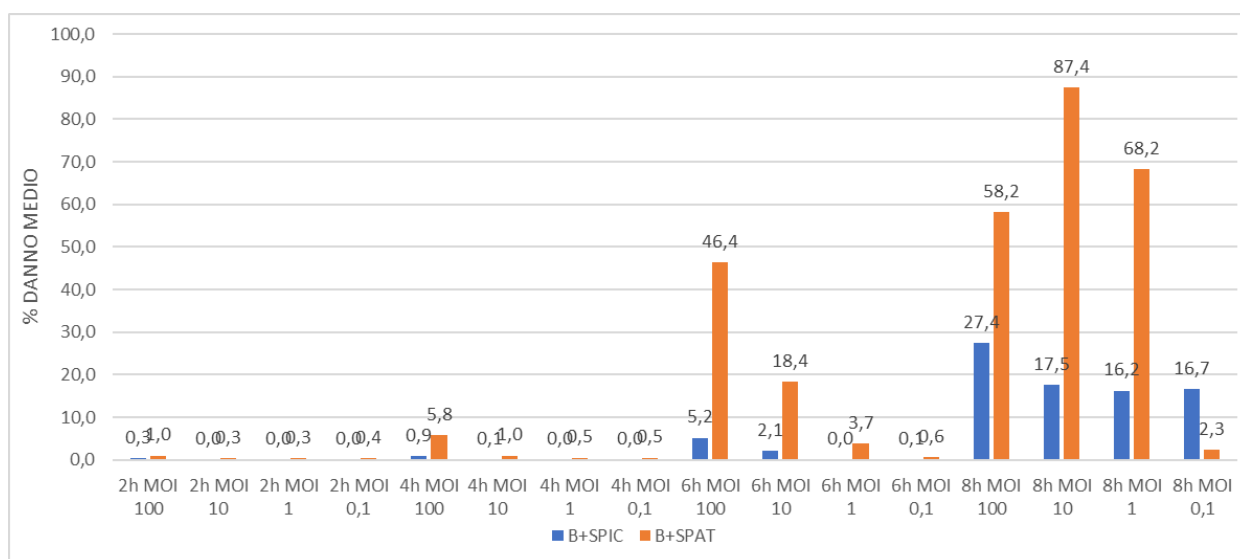


Grafico 4: percentuale danno medio in tutte le condizioni

In teoria con l'aumento del tempo di infezione dovremmo avere una percentuale di danno maggiore e il danno a sua volta dovrebbe essere proporzionale alla concentrazione, analizzando i dati in base alle ore si nota:

- Infezione di 2 ore: assenza di danno cellulare. (Grafico 5)

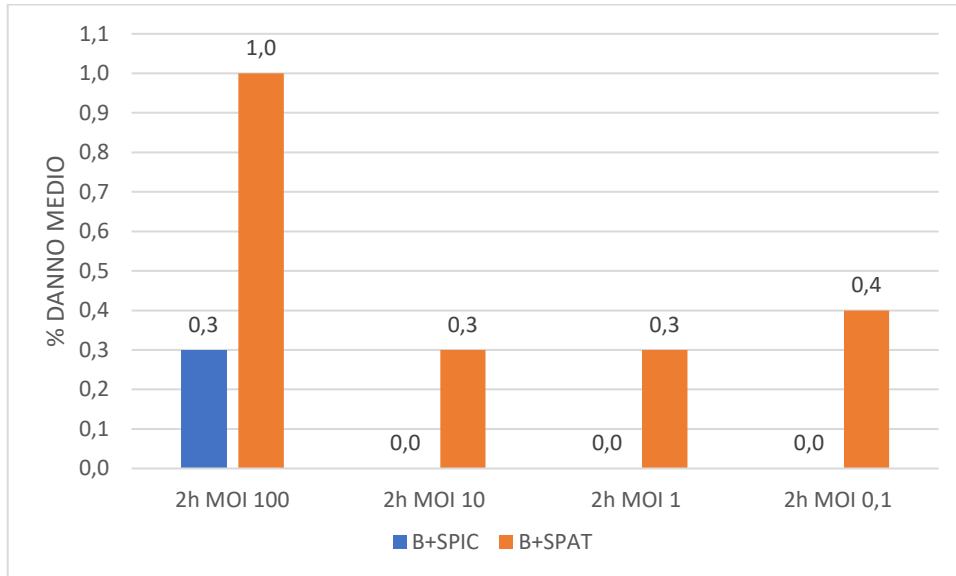


Grafico 5: risultati infezione di 2 ore

- Infezione di 4 ore: assenza di danno cellulare prevalente, leggero danno presente solo per SPAT MOI 100. (Grafico 6)

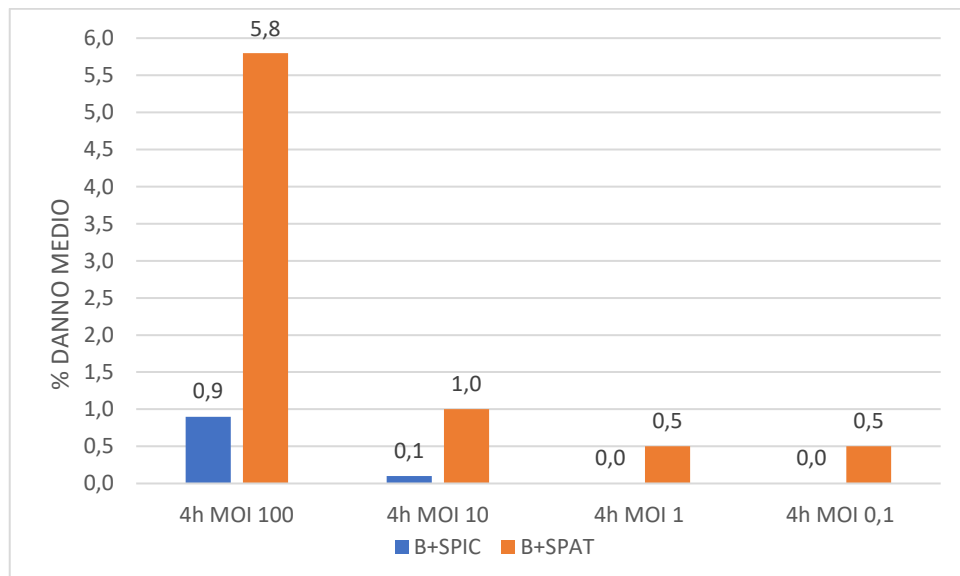


Grafico 6: risultati infezione di 4 ore

- Infezione di 6 ore: presenza di danno cellulare con tendenza proporzionale con la MOI, ma SPAT causa molto più danno rispetto a SPIC. (Grafico 7)

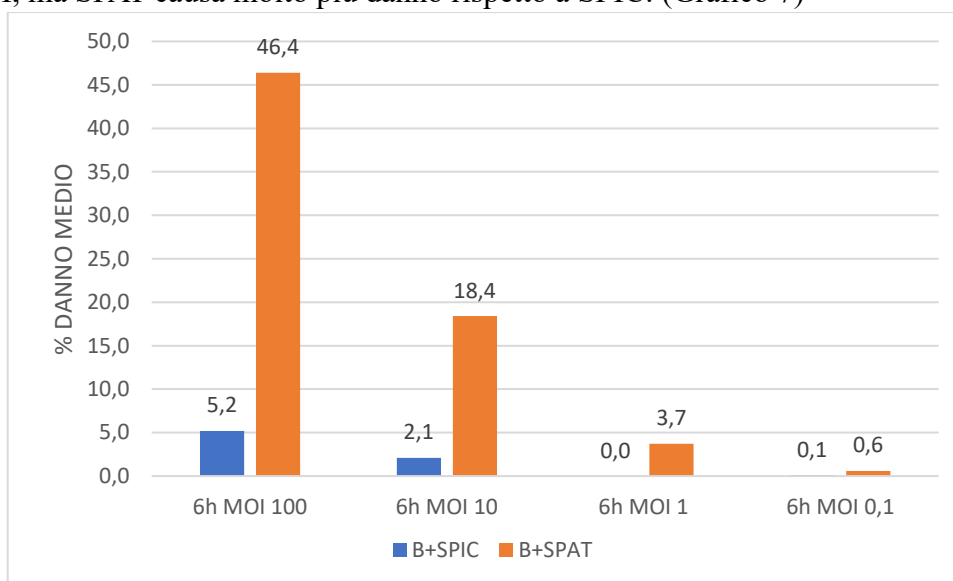


Grafico 7: risultati infezione di 6 ore

- Infezione di 8 ore: presenza di danno cellulare in entrambi i ceppi, sempre in misura maggiore per SPAT dove si nota un andamento irregolare rispetto alla MOI, tale andamento irregolare è presente anche in SPIC ma in misura meno randomica. (Grafico 8)

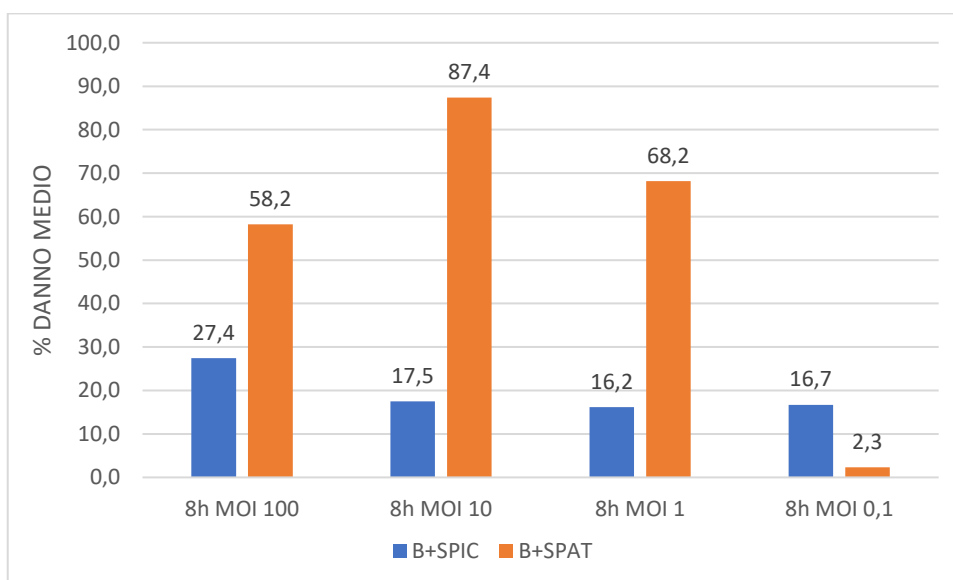


Grafico 8: risultati infezione di 8 ore

Questa irregolarità è dovuta al fatto che nell'ambiente extracellulare possono essere presenti proteasi che vanno a degradare la lattato deidrogenasi, sottostimando il valore reale. Inoltre elevati livelli di danno possono interferire la lettura degli OD allo spettrofotometro, registrando dei valori discordanti.

Per dimostrare tale irregolarità si è eseguito un saggio di citotossicità LDH utilizzando concentrazioni batteriche scalari (MOI 100, 10, 1 e 0,1) per un tempo di infezione di 24 ore, ottenendo i risultati in tabella (Tabella 2).

	B+SPIC	B+SPAT
24h MOI 100	18,3	3,2
24h MOI 10	10,1	5,3
24h MOI 1	9,1	4,1
24h MOI 0,1	9,7	13,7

Tabella 2: percentuale danno medio replicati LDH a 24 ore

Come si nota dal grafico (Grafico 9) dopo 24 ore di infezione il danno di SPIC è dipendente dalla MOI, mentre si nota un andamento inverso per SPAT, dato dal fatto che un maggiore danno cellulare comporta un maggior rilascio di proteasi nell'ambiente extracellulare che causano la degradazione della lattato deidrogenasi, comportando una minore rivelazione del danno da parte del kit LDH.

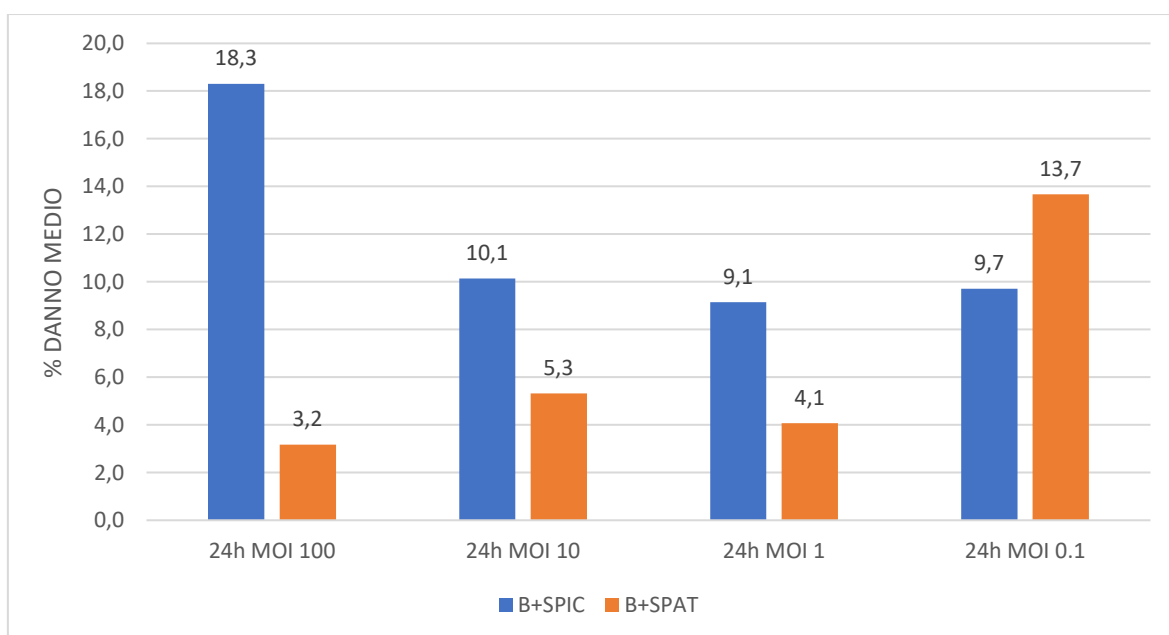


Grafico 9: risultati infezione di 24 ore

Per questo motivo si è scelto di utilizzare come tempo e concentrazione batterica “standard” per le successive analisi quella di 6 ore a 100 MOI, dato in cui che si nota una dipendenza del danno in base alla concentrazione; anche se SPAT causa un danno maggiore rispetto a SPIC. Tali dati sono stati confermati da un ulteriore test LDH a 6 ore con le diverse MOI.

4.4. CONTA CFU

Per la conta delle CFU è stata eseguita l'infezione da 6 ore con MOI 100 su una piastra multiwell da 96 pozzetti, utilizzando 4 tipologie di campioni: BEAS+SPIC, BEAS+SPAT, solo SPIC e solo SPAT, con 2 pozzetti (a,b) ciascuno, in modo tale da vedere la differenza di crescita dei ceppi e se l'infezione nelle cellule aumenta il numero delle colonie prodotte; ovviamente si è partito da un numero di batteri di 5×10^9 , tale valore è stato confermato dal Ko per assicurare che la MOI 100 sia stata rispettata.

Dopo 6 ore di infezione si è prelevato 100uL dal surnatante dei pozzetti e sono stati eseguiti diverse diluizioni in base al ceppo, visti i risultati dei precedenti esperimenti si è notato un maggior danno da parte di SPAT rispetto a SPIC per cui: per SPIC visto che fa meno danno sono state utilizzate due diluizioni 1:100, mentre per SPAT sono state utilizzate 3 diluizioni 1:100 in modo tale da permetterne la conta, dato che cresce più rapidamente formando delle colonie di grandi dimensioni. Sono stati piastrati due replicati per campione e in ciascuna piastra TSA sono stati piastrati 100uL della diluizione finale e tenuti in incubatore a 37°C per 24 ore.

Il giorno seguente si sono contate le colonie (Tabella 3) tramite la suddivisione in quarti della piastra (si contano le colonie in un quarto e il risultato viene moltiplicato x4), una volta fatta la media per le single tipologie di campioni si moltiplicano i valori dei CFU diluiti per i rispettivi fattori di diluizione (10^7 per SPIC e 10^9 per SPAT), ottenendo i valori dei CFU finali (Tabella 4).

CAMPIONE	REPLICATO 1	REPLICATO 2
SPIC a	472	456
SPIC b	468	480
B+SPIC a	664	720
B+SPIC b	720	744
SPAT a	156	212
SPAT b	204	188
B+SPAT a	436	496
B+SPAT b	444	344

Tabella 3: Conta CFU

Campione	Media CFU diluiti	Fattori diluizione	CFU
SPIC	469	10^7	46900000
B+SPIC	712	10^7	71200000
SPAT	190	10^9	1900000000
B+SPAT	430	10^9	4300000000

Tabella 4: CFU finali

Analizzando i risultati si nota che anche in questo caso la crescita di SPAT è molto più accentuata rispetto a quella di SPIC.

Per quanto riguarda l'influenza delle cellule sulla crescita batterica si nota che sia per SPIC (Grafico 10) che per SPAT (Grafico 11), la presenza delle cellule implica una maggiore replicazione dei batteri, indipendentemente dal ceppo analizzato.

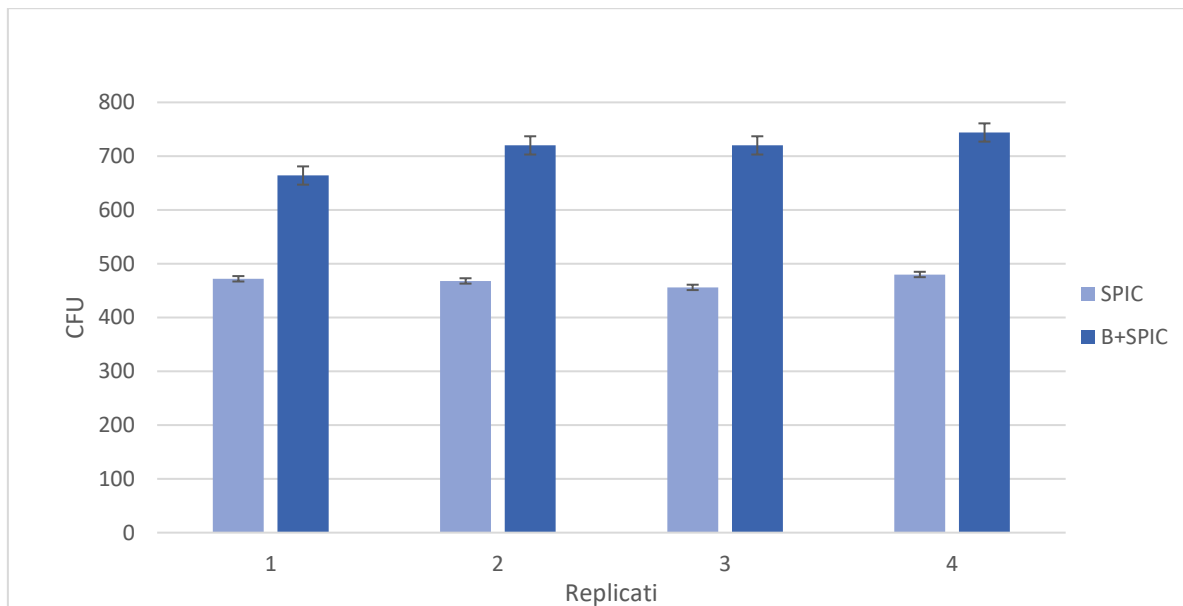


Grafico 10: CFU DILUITI SPIC e B+SPIC

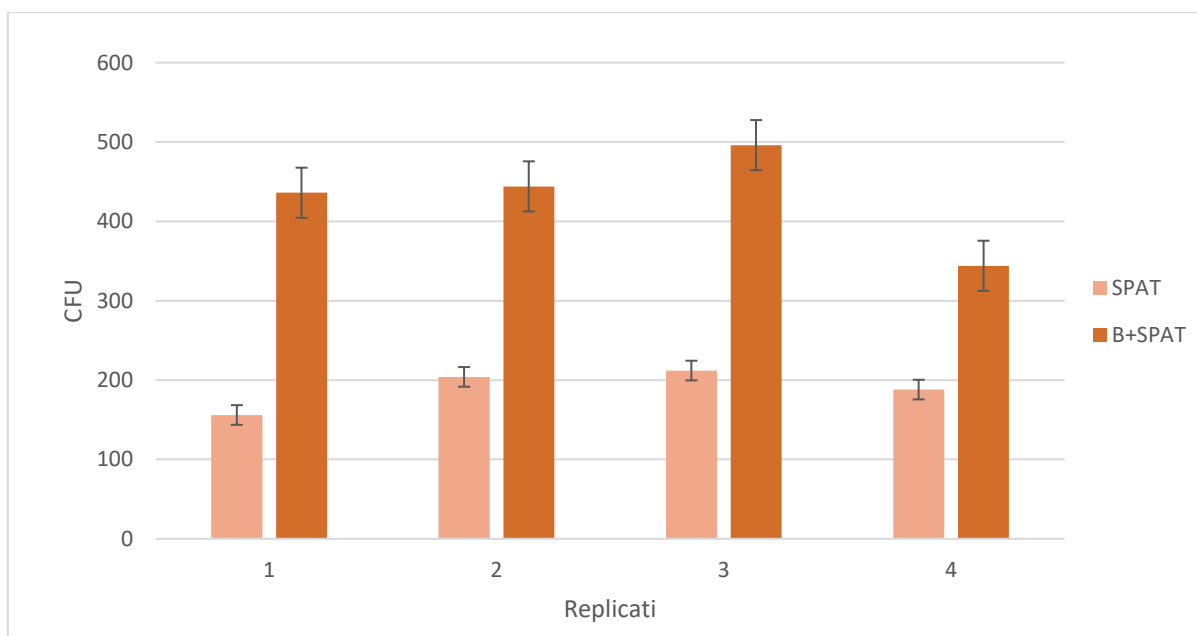


Grafico 11: CFU DILUITI SPAT e B+SPAT

4.5. CINETICA DI CRESCITA

Per la formazione e analisi della cinetica di SPIC e SPAT è stata formata una piastra multiwell da 96 con 4 tipologie di campioni: solo SPIC, solo SPAT, BEAS + SPIC e BEAS + SPAT, in modo tale da vedere la crescita dei due ceppi e se la presenza delle cellule implica una maggiore crescita, anche in questo caso l'infezione è stata eseguita con una MOI 100 rispettata tramite controllo K0. Una volta iniziata l'infezione la piastra è stata inserita all'interno dello spettrofotometro il quale ogni ora eseguiva una lettura OD a 595nm proporzionale alla crescita batterica.

Dai risultati (Grafico 12) emerge che SPAT presenta una cinetica di crescita chiaramente definita, nella quale risultano distinguibili le quattro fasi tipiche della crescita batterica: fase lag, fase esponenziale, fase stazionaria e fase di declino. Al contrario, SPIC mostra un andamento di crescita più attenuato e meno nettamente caratterizzato.

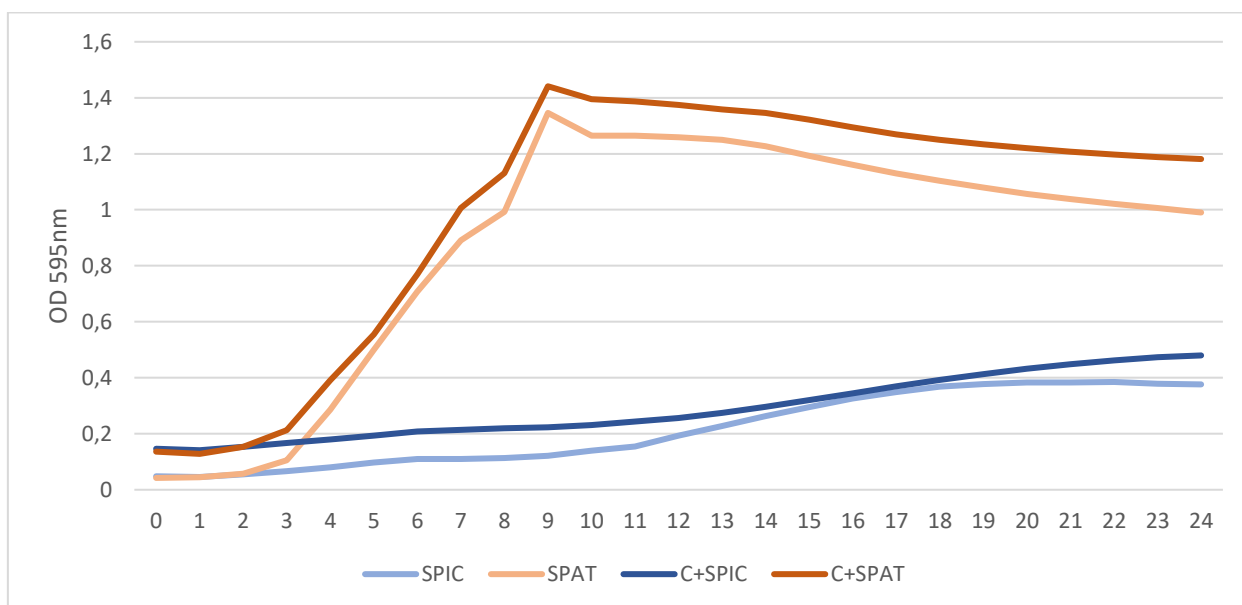


Grafico 12: Grafico cinetica 24 ore

La presenza delle cellule BEAS non sembra determinare un incremento della crescita batterica in nessuna delle due condizioni analizzate. Le differenze riscontrate nei valori di densità ottica (OD) sono verosimilmente attribuibili alla presenza delle cellule eucariotiche nei pozzetti, le quali contribuiscono all'assorbimento della luce in misura maggiore rispetto ai pozzetti contenenti esclusivamente i ceppi batterici.

4.6. BIOFILM

Per quantificare la formazione di biofilm dei ceppi SPIC e SPAT si è andato a formare una piastra multiwell da 96 con 3 condizioni: bianco (pozzetto vuoto ma trattato), solo SPIC e solo SPAT, con 4 replicati ciascuno; le cellule BEAS sono state escluse dato che anch'esse vengono colorate dal cristalvioletto, causando una interferenza nella lettura OD a 595 nm, impedendo la distinzione tra le cellule e il biofilm. La quantità di batteri inseriti per pozzetto è stata di circa 5×10^9 (il procedimento della conta è lo stesso dell'infezione) e gli intervalli di tempo sono stati 24, 48 e 72 ore, allo scadere delle ore si è andati a colorare il biofilm seguendo il protocollo specifico e si è posta la piastra nello spettrofotometro per la lettura a 595nm, facendo la media di tutti i replicati (Tabella 5) si è ottenuto il valore medio di OD, tale valore è stato confrontato con i valori OD cut-off (Tabella 6) derivati dalla lettura OD del pozzetto vuoto e trattato.

	SPIC	SPAT
24h	0,155	1,49
48h	0,16	1,56
72h	0,39	3,45

Tabella 5: Media OD biofilm

	Valori OD cut-off
ODc	0,1504
2ODc	0,3008
4ODc	1,2032

Tabella 6: OD cut-off

Una volta ottenuti i valori medi OD e i valori dei OD cut-off si confrontano (Tabella 7) per determinare se è stato prodotto biofilm e in quale quantità, il confronto viene eseguito secondo lo schema:

OD campione \leq OD cut-off = non produce biofilm

OD cut-off $<$ OD campione \leq 2x OD cut-off = produzione bassa/debole biofilm

2x OD cut-off $<$ OD campione \leq 4x OD cut-off = produzione moderata di biofilm

OD campione $>$ 4x OD cut-off = produzione alta/forte di biofilm

	SPIC	SPAT
24h	Nulla	Alta
48h	Debole	Alta
72h	Moderata	Alta

Tabella 7: formazione biofilm

Analizzando i risultati (Grafico 13) si nota in SPAT una produzione alta di biofilm nelle 24 e 48 ore successive all'infezione, con un ulteriore aumento a 72 ore. Mentre in SPIC la produzione di biofilm è assente/molto debole nelle prime 24-48 ore, mentre a 72 si nota una moderata presenza di biofilm.

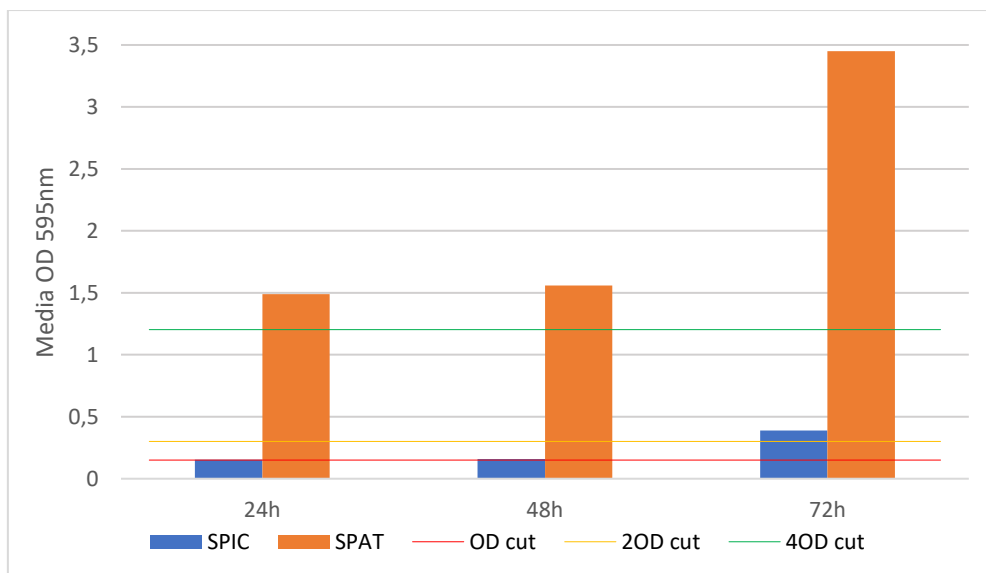


Grafico 13: visualizzazione OD medi con OD cut-off

4.7. ESTRAZIONE RNA

L'estrazione di RNA è stata eseguita in seguito all'infezione di 6 ore con MOI 100 seguendo il protocollo Quick-RNA™ Fungal/Bacterial Microprep, in seguito parte dei campioni sono stati congelati a -80°C e mandati in un laboratorio per eseguire la trascrittomico dei ceppi; l'altra parte dei campioni sono stati analizzati al nanodrop per vedere la quantità di RNA ottenuti e la purezza.

I risultati del nanodrop (Tabella 8) evidenziano una resa inferiore per la maggior parte dei campioni e non è presente contaminazione da DNA, ma è ben presente una contaminazione da fenoli che può inibire alcuni enzimi utilizzati nell'analisi della trascrittomico.

	RNA mg/uL	DNA (260/280)	Fenoli (260/230)
BEAS	244,5	2,11	1,75
B+SPIC	304,4	2,07	2,17
B+SPAT	178,8	2,12	1,78
SPIC	197,1	2,11	1,59
SPAT	185,7	2,11	1,56

Tabella 8: risultati Nanodrop

5. CONCLUSIONI

Contrariamente alle aspettative, il ceppo SPAT di *Pseudomonas aeruginosa* si è rivelato più patogeno rispetto a SPIC in tutti gli esperimenti condotti. La principale spiegazione di questo comportamento risiede nelle condizioni cliniche del paziente al momento della diagnosi di polmonite: affetto da una malattia autoimmune associata a Timoma di tipo B2 con metastasi polmonari, il soggetto presentava una marcata immunocompromissione, che probabilmente ha reso l'organismo estremamente vulnerabile anche all'azione di agenti patogeni relativamente poco aggressivi. In un individuo sano, è verosimile che il ceppo ospedaliero SPIC non avrebbe provocato una polmonite.

Va inoltre considerato che la sperimentazione in vitro rappresenta una semplificazione del contesto biologico reale, e pertanto le dinamiche di patogenicità osservate in laboratorio potrebbero non rispecchiare completamente quanto avviene in vivo. È quindi possibile che, in condizioni fisiologiche naturali, SPIC manifesti un grado di patogenicità superiore rispetto a quanto osservato negli esperimenti condotti.

A dispetto dei risultati preliminari è importante studiare e approfondire la dinamica di questi ceppi per capire al meglio i meccanismi dell'infezione, in modo tale da contrastarla utilizzando strategie più affini come l'utilizzo virtuoso di antibiotici per diminuire la comparsa di resistenze e isolamenti. Verranno eseguiti ulteriori studi su SPIC e su altri ceppi prelevati da pazienti con infezioni polmonari per chiarire tali dinamiche, valutando anche una eventuale coinfezione virale.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Francesco Farina, “POLMONITI NEL PAZIENTE OSPEDALIZZATO” 2024.
- [2] W. J. A and W. T. E, “Hydrophobic Surfactant Proteins in Lung Function and Disease,” *New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 26, pp. 2141–2148, Feb. 2026, doi: 10.1056/NEJMra022387.
- [3] D. A. KNIGHT and S. T. HOLGATE, “The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease,” *Respirology*, vol. 8, no. 4, pp. 432–446, Dec. 2003, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x>.
- [4] M. R. Knowles and R. C. Boucher, “Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways,” *J. Clin. Invest.*, vol. 109, no. 5, pp. 571–577, Mar. 2002, doi: 10.1172/JCI15217.
- [5] J. A. Al-Tawfiq, H. Kim, and Z. A. Memish, “Parasitic lung diseases,” *European Respiratory Review*, vol. 31, no. 166, Dec. 2022, doi: 10.1183/16000617.0093-2022.
- [6] S. L. Gellatly and R. E. W. Hancock, “Pseudomonas aeruginosa: New insights into pathogenesis and host defenses,” *Pathog. Dis.*, vol. 67, no. 3, pp. 159–173, 2013, doi: 10.1111/2049-632X.12033.
- [7] S. J. Wood, T. M. Kuzel, and S. H. Shafikhani, “Pseudomonas aeruginosa: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics,” Jan. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/cells12010199.
- [8] M. D. Parkins, R. Somayaji, and V. J. Waters, “Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal Pseudomonas aeruginosa Infections in Cystic Fibrosis,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 31, no. 4, pp. 10.1128/cmr.00019-18, 2018, doi: 10.1128/cmr.00019-18.
- [9] E. E. Smith *et al.*, “Genetic adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 22, pp. 8487–8492, May 2006, doi: 10.1073/pnas.0602138103.
- [10] M. Hogardt and J. Heesemann, “Hogardt M, Heesemann J.. Adaptation of Pseudomonas aeruginosa during persistence in the cystic fibrosis lung. Int J Med Microbiol 300: 557-562,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 300, pp. 557–562, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.ijmm.2010.08.008.
- [11] M. Killough, A. M. Rodgers, and R. J. Ingram, “Pseudomonas aeruginosa: Recent Advances in Vaccine Development,” Jul. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/vaccines10071100.
- [12] C. S. Lindestam Arlehamn and T. J. Evans, “Pseudomonas aeruginosa pilin activates the inflammasome,” *Cell. Microbiol.*, vol. 13, no. 3, pp. 388–401, Mar. 2011, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01541.x>.
- [13] M. C. Wolfgang, J. Jyot, A. L. Goodman, R. Ramphal, and S. Lory, “Pseudomonas aeruginosa regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, no. 17, pp. 6664–6668, Apr. 2004, doi: 10.1073/pnas.0307553101.

- [14] E. Kipnis, T. Sawa, and J. Wiener-Kronish, “Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis,” *Med. Mal. Infect.*, vol. 36, no. 2, pp. 78–91, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.007>.
- [15] Y. A. T. Y *et al.*, “Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Controlled by a Broad Spectrum of Transcriptional Regulators, Including MetR,” *J. Bacteriol.*, vol. 191, no. 18, pp. 5592–5602, Sep. 2009, doi: 10.1128/jb.00157-09.
- [16] L. Craig, M. E. Pique, and J. A. Tainer, “Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 5, pp. 363–378, 2004, doi: 10.1038/nrmicro885.
- [17] G. Döring, C. Meisner, M. Stern, and for the F. V. T. S. Group[¶], “A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 26, pp. 11020–11025, Jun. 2007, doi: 10.1073/pnas.0702403104.
- [18] R. T. Sadikot, T. S. Blackwell, J. W. Christman, and A. S. Prince, “Pathogen-host interactions in *pseudomonas aeruginosa* pneumonia,” Jun. 01, 2005. doi: 10.1164/rccm.200408-1044SO.
- [19] A. R. Hauser, “The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 9, pp. 654–665, 2009, doi: 10.1038/nrmicro2199.
- [20] P. Gogoi, A. Roy, P. Lahiri, and D. Ghosh, “Chapter 20 - The multifactorial pathobiology of lipidic quorum signaling molecules of *Pseudomonas aeruginosa*,” in *Lipid Analysis in Biology, Health, and Disease*, S. K. Bhattacharya, Ed., Academic Press, 2026, pp. 267–278. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19116-9.00042-7>.
- [21] C. E. Dulcey *et al.*, “The End of an Old Hypothesis: The *Pseudomonas* Signaling Molecules 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines Derive from Fatty Acids, Not 3-Ketofatty Acids,” *Chem. Biol.*, vol. 20, no. 12, pp. 1481–1491, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.09.021>.
- [22] O. Lieleg, M. Caldara, R. Baumgärtel, and K. Ribbeck, “Mechanical robustness of *Pseudomonasaeruginosa* biofilms,” *Soft Matter*, vol. 7, no. 7, pp. 3307–3314, 2011, doi: 10.1039/C0SM01467B.
- [23] R. D. Waite *et al.*, “Clustering of *Pseudomonas aeruginosa* transcriptomes from planktonic cultures, developing and mature biofilms reveals distinct expression profiles,” *BMC Genomics*, vol. 7, no. 1, p. 162, 2006, doi: 10.1186/1471-2164-7-162.
- [24] T. Bjarnsholt *et al.*, “*Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients,” *Pediatr. Pulmonol.*, vol. 44, no. 6, pp. 547–558, Jun. 2009, doi: <https://doi.org/10.1002/ppul.21011>.
- [25] C. Ryder, M. Byrd, and D. J. Wozniak, “Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 10, no. 6, pp. 644–648, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.010>.

- [26] J.B. Kaplan, “Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses,” *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 3, pp. 205–218, Feb. 2010, doi: 10.1177/0022034509359403.
- [27] R. Ramesh, N. D. Rekha, and S. Gopal, “Pseudomonas aeruginosa biofilm: treatment strategies to combat infection,” Jun. 01, 2025, *Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*. doi: 10.1007/s00203-025-04346-8.
- [28] A. J. Laarman *et al.*, “Pseudomonas aeruginosa Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways,” *The Journal of Immunology*, vol. 188, no. 1, pp. 386–393, Jan. 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1102162.
- [29] B. W. Bardoel *et al.*, “Pseudomonas Evades Immune Recognition of Flagellin in Both Mammals and Plants,” *PLoS Pathog.*, vol. 7, no. 8, pp. e1002206–, Aug. 2011, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002206>
- [30] J. L. Malloy, R. A. W. Veldhuizen, B. A. Thibodeaux, R. J. O’Callaghan, and J. R. Wright, “Pseudomonas aeruginosa protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions,” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 288, no. 2, pp. L409–L418, Feb. 2005, doi: 10.1152/ajplung.00322.2004.
- [31] W. I. Mariencheck, J. F. Alcorn, S. M. Palmer, and J. R. Wright, “Pseudomonas aeruginosa Elastase Degrades Surfactant Proteins A and D,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 28, no. 4, pp. 528–537, Apr. 2003, doi: 10.1165/rcmb.2002-0141OC.
- [32] Jerry D King, Dana Kocíncová, Erin L Westman, and Joseph S Lam, “Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa,” *Innate Immun.*, vol. 15, no. 5, pp. 261–312, Aug. 2009, doi: 10.1177/1753425909106436.
- [33] S. Akira, S. Uematsu, and O. Takeuchi, “Pathogen Recognition and Innate Immunity,” *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 783–801, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- [34] R. K. Ernst *et al.*, “Unique Lipid A Modifications in Pseudomonas aeruginosa Isolated from the Airways of Patients with Cystic Fibrosis,” *J. Infect. Dis.*, vol. 196, no. 7, pp. 1088–1092, Oct. 2007, doi: 10.1086/521367.
- [35] R. E. W. Hancock, L. M. Mutharia, L. Chan, R. P. Darveau, D. P. Speert, and G. B. Pier3, “Pseudomonas aeruginosa Isolates from Patients with Cystic Fibrosis: A Class of Serum-Sensitive, Nontypable Strains Deficient in Lipopolysaccharide O Side Chains,” 1983. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/iai>
- [36] E. B. M. Breidenstein, C. de la Fuente-Núñez, and R. E. W. Hancock, “Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance,” *Trends Microbiol.*, vol. 19, no. 8, pp. 419–426, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.
- [37] Y. Morita, Y. Komori, T. Mima, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya, “Construction of a series of mutants lacking all of the four major mex operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from Pseudomonas

- aeruginosa PAO1: MexCD-OprJ is an inducible pump,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 202, no. 1, pp. 139–143, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00314-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00314-7).
- [38] D. M. Livermore, “Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare?,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 34, no. 5, pp. 634–640, Mar. 2002, doi: 10.1086/338782.
- [39] G. A. Jacoby, “AmpC β -Lactamases,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 22, no. 1, pp. 161–182, 2009, doi: 10.1128/cmr.00036-08.
- [40] Y. Alguel, D. Lu, N. Quade, S. Sauter, and X. Zhang, “Crystal structure of MexZ, a key repressor responsible for antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*,” *J. Struct. Biol.*, vol. 172, no. 3, pp. 305–310, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.07.012>.
- [41] W. Gooderham *et al.*, “The sensor kinase PhoQ mediates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*,” *Microbiology (Reading)*, vol. 155, pp. 699–711, Apr. 2009, doi: 10.1099/mic.0.024554-0.
- [42] J. A. Otter, S. Yezli, and G. L. French, “The Role Played by Contaminated Surfaces in the Transmission of Nosocomial Pathogens,” *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, vol. 32, no. 7, pp. 687–699, 2011, doi: DOI: 10.1086/660363.
- [43] B. J. WILLIAMS, J. DEHNBOSTEL, and T. S. BLACKWELL, “*Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases,” *Respirology*, vol. 15, no. 7, pp. 1037–1056, 2010, doi: 10.1111/j.1440-1843.2010.01819.x.
- [44] D. A. García Estévez and J. Pardo Fernández, “Myasthenia gravis. Update on diagnosis and therapy,” *Medicina Clínica (English Edition)*, vol. 161, no. 3, pp. 119–127, 2023, doi: 10.1016/j.medcle.2023.04.012.