



Fondazione per la Ricerca
sulla Fibrosi Cistica - ETS
fibrosicisticaricerca.it

AREA 3

Terapie dell'infezione broncopolmonare



Progetto FFC#16/2019

Lotta contro le forme persistenti di *Pseudomonas aeruginosa* nell'infezione polmonare FC: miglioramento delle tecniche diagnostiche e delle strategie terapeutiche



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: Carla Vignaroli
(Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona) dal 01/09/2021 sostituisce la prof.ssa Francesca Biavasco (Dip. Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona)



Partner: Barbara Citterio

(Università di Urbino, Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche)



Ricercatori coinvolti: 5



Qual è la durata dello studio: 2 anni

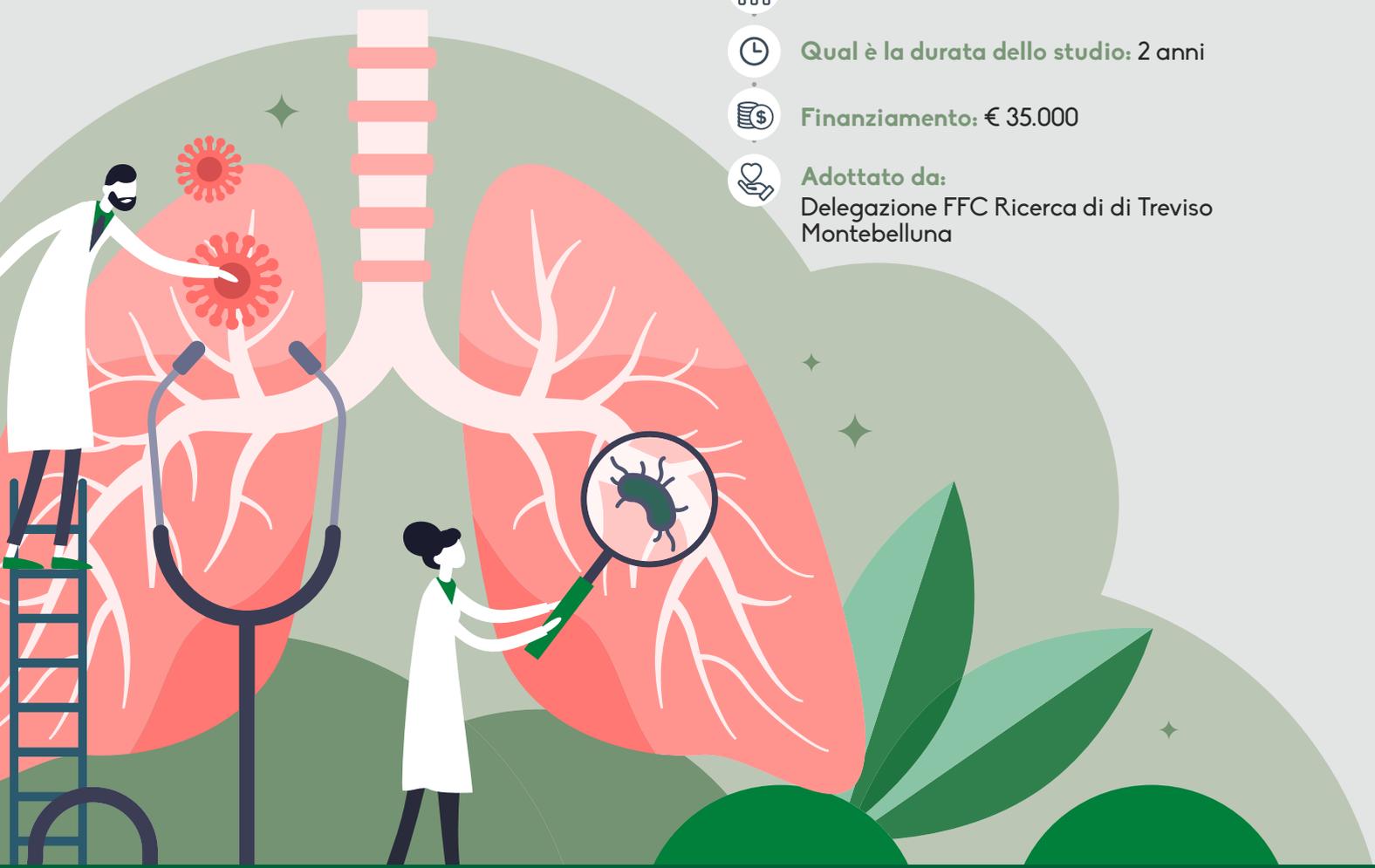


Finanziamento: € 35.000



Adottato da:

Delegazione FFC Ricerca di di Treviso Montebelluna





Perché è importante

Pseudomonas aeruginosa (Pa) è il principale responsabile dell'infezione polmonare cronica nelle persone con fibrosi cistica (FC). La completa eradicazione dell'infezione da Pa è ostacolata dallo sviluppo di forme batteriche vitali ma temporaneamente inattive e non coltivabili dette VBNC (*Viable But Non-Culturable*). Si ritiene che concentrazioni antibiotiche troppo basse per uccidere i batteri possano favorire lo sviluppo di forme VBNC. È importante indagare il ruolo degli antibiotici nello sviluppo di queste forme e sviluppare metodi di diagnosi per identificarle.



Che cosa hanno usato i ricercatori

Sono stati usati biofilm di *Pseudomonas aeruginosa in vitro* e campioni di Pa-VBNC provenienti dall'espettorato di persone con FC. Gli antibiotici usati nei test di efficacia sono stati ceftazidime, ciprofloxacina, colistina, fosfomicina, meropenem, tobramicina, ceftolozano/tazobactam e ceftazidime/avibactam. L'identificazione dei batteri VBNC nei campioni di espettorato da persone con fibrosi cistica è stata effettuata mediante particolari tecniche di laboratorio (colture batteriche di routine e qPCR/citometria di flusso).



Che cosa hanno fatto i ricercatori

Gli antibiotici selezionati e loro combinazioni sono stati testati sia *in vitro* che *in vivo* su 22 persone con FC.

Sono stati sviluppati alcuni protocolli di citometria a flusso, comparati in specificità e sensibilità alla tecnica qPCR.



Che cosa hanno ottenuto

In vitro, il trattamento con tobramicina e beta-lattamici, ha dimostrato favorire la persistenza delle forme VBNC. *In vivo*, Pa-VBNC è stato rilevato in campioni provenienti da 15 pazienti, di cui 12 con infezioni croniche. La persistenza dei batteri è stata associata al trattamento con tobramicina e beta-lattamici e loro combinazioni; la loro assenza in seguito all'uso della colistina, ceftolozano/tazobactam e ceftazidime/avibactam; la loro presenza, in assenza di forme coltivabili di Pa, in seguito all'uso di combinazioni colistina e tobramicina o meropenem.

La qPCR, supportata dalla citometria a flusso, si conferma una tecnica efficace, da affiancare alla diagnostica di routine, per un'analisi microbiologica più accurata della dinamica dell'infezione polmonare da Pa.



Che cosa succederà ora

I dati raccolti sono da considerarsi preliminari anche per il piccolo numero di casi analizzati e la varietà dei trattamenti antibiotici che ha reso difficoltosa un'analisi statistica affidabile. I test eseguiti e le informazioni raccolte hanno però gettato le basi per un altro progetto di FFC Ricerca, attualmente in corso ([FFC#22/2020](#)).

Per saperne di più



Obiettivi

Ricerca sulle cause della persistenza di *Pseudomonas aeruginosa* nell'infezione polmonare FC e su un nuovo metodo di diagnosi microbiologica di batteri persistenti, per migliorare le strategie antibiotiche

Pseudomonas aeruginosa (Pa) è il principale responsabile dell'infezione polmonare cronica nelle persone affetti da fibrosi cistica (FC). La completa eradicazione dell'infezione da Pa è ostacolata dallo sviluppo di forme batteriche vitali ma temporaneamente inattive, che l'antibiotico non ha eliminato, e che possono non essere evidenziabili attraverso il comune metodo della coltura batterica. Questi batteri che persistono e non sono diagnosticabili sono detti VBNC (Batteri Viventi Non Coltivabili). Si ritiene che concentrazioni antibiotiche troppo basse per uccidere i batteri possano favorire lo sviluppo di forme VBNC. Questo progetto si propone di:

- 1) indagare questa ipotesi esponendo ceppi di Pa a concentrazioni sub-inibenti di vari antibiotici;
- 2) sviluppare un nuovo metodo di diagnosi per identificare tutte le forme vitali di Pa presenti nelle colture batteriche di persone con FC e quindi anche le forme VBNC;
- 3) cercare composti che in combinazione con gli antibiotici in uso siano efficaci nell'eliminazione delle forme VBNC.

L'obiettivo generale è migliorare le terapie antibiotiche rivolte all'eradicazione di Pa e altri batteri frequenti in FC; inoltre realizzare un nuovo test diagnostico per migliorare la diagnosi microbiologica e conseguentemente le strategie antibiotiche in FC. Il progetto continua il filone di ricerca del progetto [FFC#13/2017](#).



Risultati

La persistenza di forme VBNC di *Pseudomonas aeruginosa* sembra rappresentare un tratto tipico delle infezioni croniche, probabilmente favorito dal trattamento con tobramicina e β -lattamici

I principali obiettivi di questo progetto (continuazione di FFC#13/2017) sono di indagare sul ruolo degli antibiotici nello sviluppo di forme vitali ma non coltivabili (VBNC) di *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), implicate nella riattivazione dell'infezione, e mettere a punto un protocollo di citometria a flusso per la conta delle cellule vitali totali (CVT) nei campioni di espettorato da persone con fibrosi cistica. Le cellule VBNC sono infatti date dalla differenza tra CVT e cellule coltivabili.

Biofilm *in vitro* di Pa sono stati esposti a antibiotici quali ceftazidime, ciprofloxacina, colistina (COL), fosfomicina, meropenem (MER), tobramicina (TOB), ceftolozano/tazobactam (C/T) e ceftazidime/avibactam (CZA) e le conte batteriche sono state effettuate mediante la tecnica colturale di routine e qPCR/citometria di flusso. La persistenza delle forme VBNC era favorita dal trattamento con TOB e con beta-lattamici (BL), escluso CZA.

Dei due protocolli di citometria a flusso sviluppati, basati sull'uso di anticorpi o di una sonda specie-specifica, il secondo ha dimostrato la richiesta specificità e risultati in accordo con quelli dell'analisi qPCR. La sua sensibilità è risultata scarsa a causa della matrice del campione, è pertanto da considerarsi affidabile per il rilevamento qualitativo di Pa, ma non per la sua quantificazione, meglio ottenuta con qPCR.

Per correlare la presenza di Pa-VBNC con lo stato infettivo e il trattamento antibiotico *in vivo* abbiamo analizzato 50 campioni di espettorato da persone con fibrosi cistica provenienti da 22

Per saperne di più



pazienti. Pa-VBNC è stato rilevato in 28 campioni da 15 pazienti, di cui 12 con infezioni croniche. Il trattamento con TOB, BL e le loro combinazioni (incluse TOB+C/T o CZA) è associato alla persistenza di Pa-VBNC, quello con COL, C/T e CZA alla sua assenza e quello con COL+TOB o MER alla sua persistenza in assenza di cellule coltivabili.

In conclusione, la presenza di cellule VBNC di *Pseudomonas aeruginosa* in campioni di espettorato da persone con fibrosi cistica è stata confermata mediante la tecnica di citometria di flusso e la persistenza di una sottopopolazione VBNC è risultata associata in particolare ai pazienti cronici e al trattamento con TOB e BL, confermando quanto osservato *in vitro*.

Publicazioni



Contribution of Drugs Interfering with Protein and Cell Wall Synthesis to the Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: An In Vitro Model*

International Journal of Molecular Sciences, 2021



Article

Contribution of Drugs Interfering with Protein and Cell Wall Synthesis to the Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: An In Vitro Model[†]

Gianmarco Mangiaterra^{1,*}, Elisa Carotti¹, Salvatore Vaiasicca^{1,‡}, Nicholas Cedraro¹, Barbara Citterio², Anna La Teana¹ and Francesca Biavasco¹

¹ Department of Life and Environmental Sciences, Polytechnic University of Marche, via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italy; e.carotti@pm.univpm.it (E.C.); s.vaiasicca@staff.univpm.it (S.V.); n.cedraro@pm.univpm.it (N.C.); a.lateana@univpm.it (A.L.T.); f.biavasco@staff.univpm.it (F.B.)

² Department of Biomolecular Science, Biotechnology Section, University of Urbino "Carlo Bo", via Arco d'Augusto 2, 61032 Fano, Italy; barbara.citterio@uniurb.it

* Correspondence: g.mangiaterra@staff.univpm.it; Tel: +39-071-220-4622; Fax: +39-071-220-4316

[†] In memory of Professor Gianni Mastella.

[‡] Present affiliation: Department of Clinical and Molecular Sciences, Polytechnic University of Marche, Via Trento 10/A, 60126 Ancona, Italy.

Author Contributions: Conceptualization, G.M., E.C., A.L.T. and F.B.; methodology, G.M., E.C., S.V. and N.C.; validation, G.M., E.C. and S.V.; formal analysis, N.C.; investigation, G.M. and N.C.; resources, F.B.; data curation, A.L.T. and F.B.; writing—original draft preparation, G.M., E.C., S.V. and N.C.; writing—review and editing, B.C., A.L.T. and F.B.; supervision, A.L.T. and F.B.; project administration, F.B.; funding acquisition, F.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Italian Cystic Fibrosis Foundation, grant number FFC#16/2019.

Publicazioni



Pseudomonas aeruginosa Biofilm Lung Infection in Cystic Fibrosis: The Challenge of Persisters

Intech Open, 2021

 OPEN ACCESS PEER-REVIEWED CHAPTER

Pseudomonas aeruginosa Biofilm Lung Infection in Cystic Fibrosis: The Challenge of Persisters

WRITTEN BY

Gianmarco Mangiaterra, Mehdi Amiri, Nicholas Cedraro and Francesca Biavasco

Submitted: October 6th, 2020 , Reviewed: December 21st, 2020 , Published: January 29th, 2021

DOI: 10.5772/intechopen.95590

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Salvatore Vaiasicca for his contribution to flow cytometry assays and to Dr. Natalia Cirilli for helpful discussion on *P. aeruginosa* CF lung infections.

This work was supported by FFC grants # 13/2017 and #16/2019 of the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation.

Publicazioni



Role of Tobramycin in the Induction and Maintenance of Viable but Non-Culturable Pseudomonas aeruginosa in an In Vitro Biofilm Model

Antibiotics, 2020



antibiotics



Article

Role of Tobramycin in the Induction and Maintenance of Viable but Non-Culturable Pseudomonas aeruginosa in an In Vitro Biofilm Model

Gianmarco Mangiaterra ^{1,*}, Nicholas Cedraro ¹, Salvatore Vaiasicca ¹, Barbara Citterio ², Roberta Galeazzi ¹, Emiliano Laudadio ³, Giovanna Mobbili ¹, Cristina Minnelli ¹, Davide Bizzaro ¹ and Francesca Biavasco ¹

¹ Department of Life and Environmental Sciences, Polytechnic University of Marche, via Brece Bianche, 60131 Ancona, Italy; n.cedraro@pm.univpm.it (N.C.); s.vaiasicca@pm.univpm.it (S.V.); r.galeazzi@staff.univpm.it (R.G.); g.mobbili@staff.univpm.it (G.M.); c.minnelli@pm.univpm.it (C.M.); d.bizzaro@staff.univpm.it (D.B.); f.biavasco@staff.univpm.it (F.B.)

² Department of Biomolecular Science, Biotechnology Section, University of Urbino "Carlo Bo", via Arco d'Augusto 2, 61032 Fano, Italy; barbara.citterio@uniurb.it

³ Department of Materials, Environmental Sciences and Urban Planning, Polytechnic University of Marche, via Brece Bianche, 60131 Ancona, Italy; e.laudadio@staff.univpm.it

* Correspondence: g.mangiaterra@staff.univpm.it; Tel.: +39-071-220-4622; Fax: +39-071-220-4316

Academic Editors: Patrick Mester and Nicholas Dixon

Received: 5 May 2020; Accepted: 8 July 2020; Published: 10 July 2020



Author Contributions: Conceptualization, F.B.; formal analysis, C.M.; funding acquisition, F.B.; investigation, G.M., N.C. and S.V.; methodology, G.M., S.V., B.C. and D.B.; project administration, F.B.; supervision, F.B.; validation, B.C., R.G., E.L., G.M., D.B. and F.B.; writing—original draft, G.M.; writing—review and editing, F.B. G.M. designed the experimental plan, developed the biofilm model, performed the qPCR assays and interpreted the obtained results. N.C. performed the microbiological and qPCR assays, evaluating the bacterial viability and culturability. S.V. developed the flow cytometry protocol and performed the related assays. B.C. contributed to the experimental design and critically commented on the obtained results. R.G. critically commented on the experimental data, focusing on the antibiotics' action on the microbial cells. E.L. contributed to the experimental design and interpretation. G.M. contributed to the experimental interpretation. C.M. performed the statistical analysis on the obtained results. D.B. contributed to the flow cytometry protocol development and data interpretation. F.B. coordinated the whole experiment and interpreted the obtained data in the context of antibiotic tolerance and persistence. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Italian Cystic Fibrosis Foundation, grant number FFC#13/2017 and by Università Politecnica delle Marche, grant number PSA 2016. The APC was funded by Italian Cystic Fibrosis Foundation, grant number FFC#16/2019.

Acknowledgments: Part of these results have been presented at the "Biofilm 8" meeting, 27–29 May 2018, Aarhus University, Aarhus C, Denmark and at the "Microbiology 2019" meeting, XXXIII SIMGBM Congress, 19–22 June 2019, Università di Firenze, Firenze, Italy.

Rendiconto economico



AREA 3

Terapie dell'infezione broncopolmonare

Progetto FFC#16/2019

Lotta contro le forme persistenti di *Pseudomonas aeruginosa* nell'infezione polmonare FC: miglioramento delle tecniche diagnostiche e delle strategie terapeutiche



Responsabile:

Carla Vignaroli

(Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona)



Periodo:

01/09/2019-31/08/2021



Grant assegnato:

€ 35.000



Usato per:

- Materiale di consumo € 14.918,85
- Spese viaggio/convegni € 416,20
- Borse di studio € 14.000,00
- Servizi scientifici € 2.377,48
- Pubblicazioni scientifiche € 2.982,99

€ 34.695,52



Saldo (usato per altri progetti):

€ 304,48