



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

**Corso di Laurea Magistrale in**

**BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

RUOLO DELLA POMPA DI EFFLUSSO MexXY-OprM NELLA  
RESILIENZA ALLA TOBRAMICINA DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

ROLE OF THE MexXY-OprM EFFLUX PUMP IN THE TOBRAMYCIN  
RESILIENCE OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Tesi di Laurea di:

**Cristina Baldini**

Relatore:

**Chiar.ma Prof.ssa Francesca Biavasco**

Correlatore:

**Prof.ssa Roberta Galeazzi**

Correlatore:

**Dott. Nicholas Cedraro**

Sessione straordinaria

Anno Accademico 2018/2019

# INDICE

## INTRODUZIONE

<b>1</b>	<b>ANTIBIOTICO RESISTENZA .....</b>	<b>6</b>
	1.1 Aspetti generali .....	6
	1.2 Resistenza naturale e acquisita .....	8
	1.3 Meccanismi biochimici della resistenza .....	12
	1.3.1 Modiche della molecola antimicrobica .....	13
	1.3.2 Ridotta permeabilità ed efflusso degli antibiotici	16
	1.3.3 Cambiamento dei siti target.....	20
	1.4 In che modo affrontare la resistenza agli antibiotici .....	21
<b>2</b>	<b>ANTIBIOTICO PERSISTENZA.....</b>	<b>23</b>
	2.2 Caratteristiche generali e definizione .....	23
	2.3 Persistenza, Resistenza e Tolleranza .....	25
	2.4 Meccanismo di formazione .....	27
<b>3</b>	<b>PSEUDOMONAS AUREGINOSA .....</b>	<b>33</b>
	3.1 Caratteristiche generali del genere.....	33
	3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nell'uomo.....	35
	3.3 Resistenza e Persistenza di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	38

<b>4</b>	<b>Pompa di efflusso MexXY-OprM .....</b>	<b>45</b>
4.1	Pompe di efflusso in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	45
4.2	Struttura di MexXY-OprM.....	47
4.3	Il ruolo degli inibitori delle pompe di efflusso.....	51
4.4	Berberina .....	54
	<b>SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>56</b>
	<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>57</b>
1.1	Isolati batterici, terreni di coltura e antibiotici.....	57
1.2	Determinazione Minima Concentrazione Inibente.....	59
1.3	Saggio di produzione biofilm .....	61
1.4	Saggio di persistenza.....	63
1.5	Caratterizzazione genotipica .....	65
1.5.1	Estrazione DNA .....	66
1.5.2	Saggi di PCR.....	68
1.5.3	Purificazione .....	70
1.5.4	Sequenziamento .....	71

<b>RISULTATI .....</b>	<b>72</b>
1.1 Caratterizzazione genotipica .....	72
1.2 Caratterizzazione fenotipica .....	75
1.3 Saggio di produzione biofilm .....	76
1.4 Saggio di persistenza .....	77
1.5 Sequenziamento e allineamento di mexY .....	79
1.6 Docking molecolare .....	87
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>89</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>103</b>
<b>FONTI DELLE IMMAGINI .....</b>	



# 1. ANTIBIOTICO-RESISTENZA

## 1.1 ASPETTI GENERALI

Nel corso della storia, le malattie infettive sono state una delle principali minacce per la salute umana e animale e causa importante di malattia e mortalità (Guardabassi L et al, 2008). Il 3 settembre 1928 rappresenta una data storica per l'umanità: Alexander Fleming scopriva che il fungo *Penicillium notatum*, contaminante accidentale di una capsula Petri in laboratorio, inibiva la crescita dei batteri coltivati. L'agente antimicrobico era la penicillina e in circa dieci anni, fu trasformata dai ricercatori in un farmaco che permise il trattamento di molteplici infezioni batteriche e il salvataggio di numerose vite (Neill et al, 2015). Inizia così l'era degli antibiotici caratterizzata dalla presenza di un potente strumento che affianca la medicina, fondamentale per la terapia delle infezioni batteriche e delle complicazioni a esse connesse. Tuttavia, l'uso degli antibiotici non è esente da effetti indesiderati: l'utilizzo di varie classi di molecole ad azione antimicrobica ha purtroppo favorito la selezione e la diffusione di popolazioni resistenti di agenti batterici. Con antibiotico-resistenza si intende l'insensibilità di un batterio ad un antimicrobico alle concentrazioni utilizzate in terapia. Finora, nessuna classe di antibiotici è sfuggita a questo fenomeno. Ad oggi la resistenza agli antibiotici è descritta come una delle maggiori minacce globali del ventunesimo secolo. Sebbene sia stata osservata

subito dopo la prima introduzione degli antibiotici in terapia, l'impatto dell'antibiotico-resistenza è stato inizialmente mitigato dallo sviluppo e dall'uso di nuovi agenti (Conly J et al, 2005). Tuttavia, a partire dalla fine degli anni '60 lo sviluppo di nuove molecole antibatteriche è andata calando fino quasi ad arrestarsi negli ultimi anni (Wise R et al, 2015). L'antibiotico-resistenza colpisce in primis la medicina umana, ma anche il settore veterinario, con possibilità di trasmissione di resistenze dagli animali all'uomo e viceversa. Risulta essere un problema di rilevanza mondiale che va affrontato con un approccio *One Health*, che evidenzia la necessità di una stretta collaborazione di tutte le categorie coinvolte: medici umani, medici veterinari, farmacisti, industrie farmaceutiche e utilizzatori finali del farmaco, per citarne alcune (Department of Health, 2011). La resistenza rappresenta per i batteri un fenomeno evolutivo in accordo col principio Darwiniano di selezione naturale: l'effetto antibatterico esercitato da un chemioterapico su una popolazione batterica seleziona i microrganismi che hanno sviluppato o acquisito meccanismi che permettano loro di eludere l'attività inibente del farmaco. I ceppi sensibili vengono così eliminati mentre quelli resistenti continuano a moltiplicarsi arrivando nel tempo ad essere predominanti (Intorre L et al, 2009). La resistenza è quindi una conseguenza naturale e inevitabile, favorita dall'uso degli antimicrobici (Guardabassi L et al, 2008). È impossibile prevenire

l'emergenza di resistenze, evento casuale e di solito transitorio se non implica un vantaggio selettivo. È doveroso considerare che la resistenza esiste in natura da epoche antecedenti l'introduzione degli antimicrobici: molti di questi infatti sono di derivazione naturale e i loro produttori hanno dovuto sviluppare dei meccanismi di protezione per eludere il danno provocato dalle sostanze da loro stessi prodotte. L'impiego di antibiotici ha quindi generato un aumento della pressione selettiva determinando un'accelerazione nella propagazione di questi determinanti di resistenza. Questo fenomeno può essere amplificato da una serie di fattori: l'utilizzazione inadeguata di antimicrobici terapeutici in medicina umana e veterinaria, l'utilizzazione di antimicrobici a fini non terapeutici e l'inquinamento ambientale da antimicrobici accelerano l'apparizione nonché la propagazione di microorganismi resistenti comportando gravi conseguenze (European Commission, 2011).

## ***1.2 RESISTENZA NATURALE E ACQUISITA***

Nel contesto della resistenza antimicrobica, i batteri presentano due fenotipi fondamentali di resistenza: intrinseca e acquisita (Intorre L et al, 2009).

La **resistenza naturale** o **intrinseca** caratterizza quei batteri le cui caratteristiche biofisiche impediscono a prescindere l'azione dell'antibiotico.

Ciò può essere dovuto a fattori genetici, strutturali e fisiologici (Intorre L et al, 2009). Quando la resistenza a un determinato farmaco antibatterico è intrinseca, è espressa da tutti i ceppi (o quasi) di una specie batterica (Antonelli et al, 2008.). Ciò riflette la presenza di un meccanismo biochimico relativo a un determinante genetico di resistenza, evoluto nella specie batterica che generalmente viene diffuso mediante un trasferimento verticale (o clonale) intergenerazionale tra la cellula batterica madre e le cellule figlie (Intorre L et al, 2009). Questa resistenza è prevedibile, quindi una volta nota l'identità del microorganismo, sono noti anche certi aspetti del suo profilo di antibiotico resistenza. I meccanismi di resistenza naturale riguardano:

- l'assenza delle strutture bersaglio,
- l'impermeabilità della parete o della membrana batterica che quindi rendono impossibile il raggiungimento del sito d'azione del farmaco,
- la produzione di enzimi che inattivano il chemioterapico.

Ad esempio, molti batteri Gram negativi sono naturalmente resistenti all'attività dei macrolidi poiché queste sostanze hanno dimensioni troppo grandi per attraversare la membrana cellulare e raggiungere il bersaglio citoplasmatico. Altri esempi di resistenza innata sono noti tra i batteri anaerobi e gli aminoglicosidi: questi farmaci presentano una ridotta penetrazione nelle cellule batteriche in condizioni di anaerobiosi risultando dunque scarsamente efficaci

nei confronti di questi batteri; oppure tra i batteri produttori di beta-lattamasi (Boerlin P et al, 2013).

La **resistenza acquisita** o **genetica** si palesa quando all'interno di una specie batterica naturalmente sensibile a un dato farmaco antibatterico emergono dei ceppi resistenti. Ciò riflette una modificazione genetica recente nel genoma del ceppo resistente. Le basi genetiche della resistenza acquisita includono eventi di mutazione/ricombinazione di geni resistenti, oppure l'acquisizione di nuovi geni mediante un trasferimento genetico orizzontale (HGT) (Antonelli et al, 2008).

Si può quindi distinguere la resistenza acquisita in:

- resistenza **cromosomica** o **endogena**, dovuta a mutazioni spontanee, cioè provocate da meccanismi biochimici che operano normalmente nella cellula e che hanno un'intrinseca capacità di errore, nel locus cromosomico che controlla la sensibilità al farmaco. Queste mutazioni sono di solito caratterizzate da una frequenza estremamente bassa (Couce et al, 2009);
- resistenza **extra-cromosomica** o **esogena**, dovuta all'acquisizione di elementi genetici mobili (MGE) che contengono uno o più geni di resistenza. I principali elementi mobili sono rappresentati da plasmidi (elementi genetici extra-cromosomici liberi nel citoplasma batterico in grado di replicarsi autonomamente dal DNA microbico), trasposoni

(sequenze di DNA che possono spostarsi in diverse posizioni del genoma) e cassette di resistenza (integroni).

La diffusione della resistenza può avvenire attraverso un trasferimento orizzontale o verticale dei geni di resistenza tra batteri della stessa specie o di specie differenti. Il **trasferimento orizzontale** rappresenta uno dei principali motori dell'evoluzione batterica. Classicamente, i batteri acquisiscono materiale genetico esterno attraverso tre strategie principali (**Figura 1**):

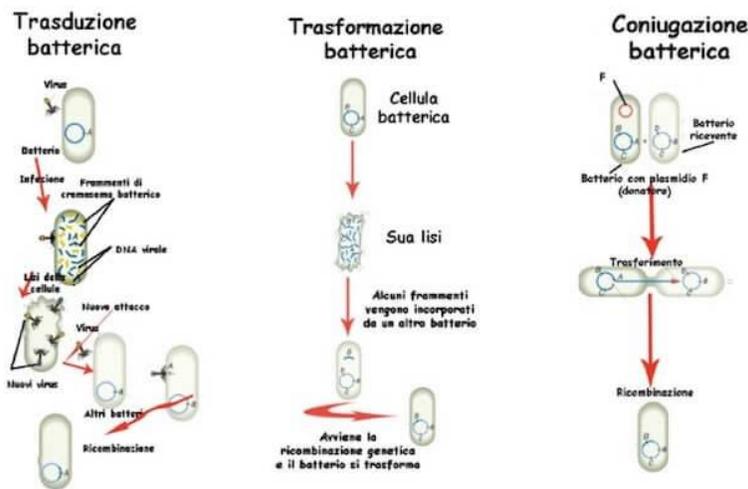
*i*) trasformazione,

*ii*) trasduzione e,

*iii*) coniugazione.

La trasformazione consiste nell' incorporare "naturalmente" il DNA nudo proveniente da cellule lisate dall'ambiente extracellulare per sviluppare resistenza. Rappresenta forse il tipo più semplice di HGT, ma tra le specie batteriche clinicamente rilevanti solo poche, che vengono definite cellule "naturalmente competenti", sono sempre in grado di farlo.

La trasduzione implica il passaggio del DNA da un batterio ad un altro tramite l'intermediazione di un fago, mentre la coniugazione consente lo scambio di materiale genetico e la ricombinazione genetica attraverso il contatto cellula-cellula (Manson JM et al, 2010).

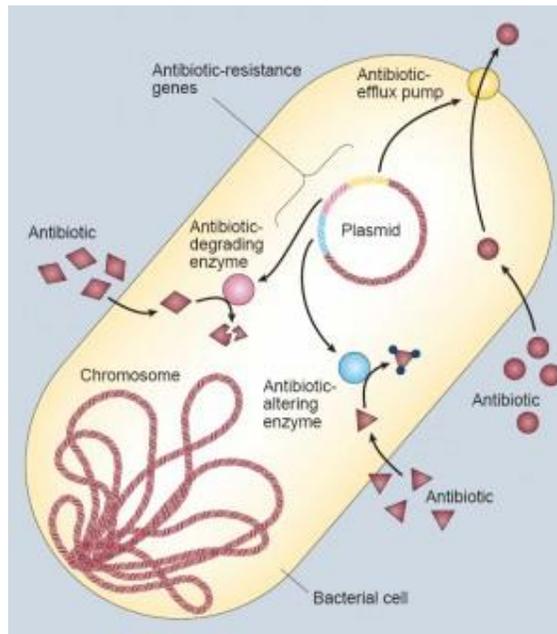


*Figura 1. Principali meccanismi di trasferimento genetico orizzontale.*

### ***1.3 MECCANISMI BIOCHIMICI DI RESISTENZA***

Non sorprende che i batteri abbiano sviluppato sofisticati meccanismi di resistenza ai farmaci per evitare di essere “uccisi” da molecole antimicrobiche, un processo che probabilmente si è verificato in milioni di anni di evoluzione. Da notare che la resistenza a una classe antimicrobica può di solito essere raggiunta attraverso molteplici percorsi biochimici, come si può osservare in **Figura 2** e una cellula batterica può essere in grado di utilizzare un quadro di meccanismi di resistenza per sopravvivere all'effetto di un antibiotico. I principali meccanismi sono:

1. modifiche della molecola antimicrobica,
2. ridotta permeabilità ed efflusso degli antibiotici,
3. cambiamenti dei siti target. (Jose M et al, 2016).



*Figura 2. Principali meccanismi biochimici di resistenza batterica.*

### 1.3.1 MODICHE DELLA MOLECOLA ANTIMICROBICA

Questa strategia batterica consiste nella produzione di enzimi che inattivano il farmaco aggiungendo specifiche frazioni chimiche al composto o che distruggono la molecola stessa, rendendo l'antibiotico incapace di interagire con il suo bersaglio.

## -Alterazioni chimiche dell'antibiotico

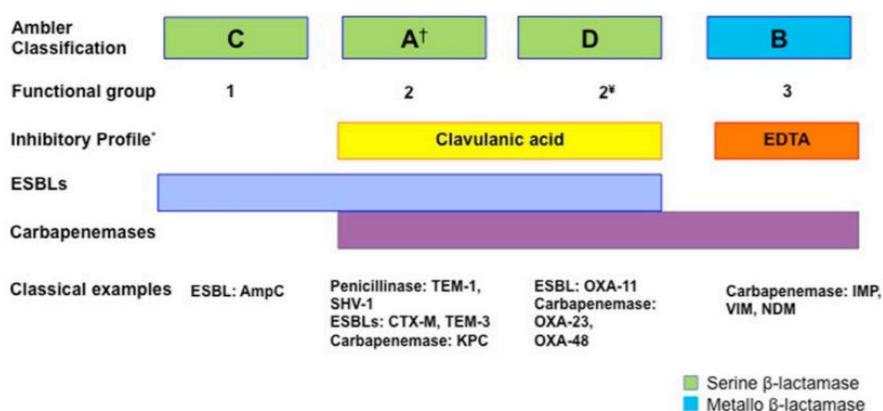
La produzione di enzimi in grado di introdurre cambiamenti chimici nella molecola antimicrobica è un meccanismo ben noto acquisito sia nei batteri gram-negativi che nei batteri gram-positivi. È interessante notare che la maggior parte degli antibiotici interessati da queste modificazioni enzimatiche esercitano il loro meccanismo d'azione inibendo la sintesi proteica a livello del ribosoma (Wilson DN et al, 2014). Sono stati descritti molti tipi di enzimi modificanti e le reazioni biochimiche più frequenti che catalizzano includono: acetilazione (aminoglicosidi, cloramfenicolo, streptogramine), fosforilazione (aminoglicosidi, cloramfenicolo) e adenilazione (aminoglicosidi, lincosamidi). Indipendentemente dalla reazione biochimica, l'effetto risultante è spesso correlato all'ostacolo sterico che diminuisce l'affinità del farmaco per il suo bersaglio, che, a sua volta, si riflette in concentrazioni minime inibenti (MIC) batteriche più elevati. Uno dei migliori esempi di resistenza attraverso la modifica del farmaco è la presenza di enzimi modificanti gli aminoglicosidi (AME) che modificano covalentemente gli ossidrili o i gruppi amminici della molecola aminoglicosidica (Ramirez MS et al, 2010). Un altro esempio classico di alterazione enzimatica di un antibiotico riguarda la modifica del cloramfenicolo, un antibiotico che inibisce la sintesi proteica interagendo con il

centro di trasferimento peptidilico della subunità ribosomiale 50S (Schwarz S, et al, 2004).

### -Distruzione della molecola antibiotica

Il principale meccanismo di resistenza al  $\beta$ -lattamici (classe di antibiotici che impediscono la sintesi della parete cellulare dei batteri, inibendo la transpeptidasi: un enzima responsabile della formazione dei legami crociati), si basa sulla distruzione di questi composti per azione delle  $\beta$ -lattamasi. Questi enzimi distruggono il legame ammidico dell'anello  $\beta$ -lattamico, rendendo inefficace l'antimicrobico (D'Costa VM et al, 2011). I geni che codificano per le  $\beta$ -lattamasi sono generalmente chiamati *bla*, seguiti dal nome dell'enzima specifico (ad esempio *bla<sub>KPC</sub>*) e sono stati trovati nel cromosoma o localizzati in MGE come parte del genoma accessorio. Questi geni possono anche essere trovati come parte di integroni, una situazione che ne facilita la diffusione. In termini di espressione, la trascrizione di questi geni può essere costitutiva o può richiedere un segnale esterno per indurre la loro produzione. Ad oggi sono state descritte più di 1.000 diverse  $\beta$ -lattamasi ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)) e molte altre probabilmente continueranno a essere segnalate, come parte del normale processo di evoluzione batterica. Sono stati proposti due principali schemi di classificazione nel tentativo di raggruppare questo gran numero di enzimi.

Innanzitutto, la classificazione Ambler si basa sull'identità della sequenza di aminoacidi e separa le  $\beta$ -lattamasi in 4 gruppi (A, B, C e D). D'altra parte, la classificazione Bush-Jacoby divide le  $\beta$ -lattamasi in 4 categorie (ciascuna con diversi sottogruppi) in base alla loro funzione biochimica, principalmente basata sulla specificità del substrato (Bush K et al, 2013). Un riassunto delle  $\beta$ -lattamasi più importanti e la loro classificazione è presentato nella **Figura 3**.



*Figura 3. Rappresentazione schematica e classificazione delle  $\beta$ -lattamasi.*

### 1.3.2 RIDOTTA PERMEABILITA' ED EFFLUSSO DEGLI ANTIBIOTICI

#### -Ridotta permeabilità

Molti degli antibiotici utilizzati nella pratica clinica hanno bersagli batterici intracellulari o, nel caso di batteri gram-negativi, situati nella membrana citoplasmatica (la membrana interna). Pertanto, il composto deve penetrare nella membrana esterna e/o citoplasmatica per esercitare il suo effetto

antimicrobico. Molte classi batteriche hanno sviluppato meccanismi per impedire all'antibiotico di raggiungere il suo bersaglio intracellulare o periplasmatico riducendo l'assorbimento della molecola antimicrobica. Questo meccanismo è particolarmente importante nei batteri gram-negativi, limitando l'afflusso di sostanze dall'ambiente esterno. In effetti, la membrana esterna funge da prima linea di difesa contro l'entrata di più composti tossici, inclusi diversi agenti antimicrobici. Le molecole idrofiliche, come i  $\beta$ -lattamici, le tetracicline e alcuni fluorochinoloni sono particolarmente colpite dai cambiamenti nella permeabilità della membrana esterna poiché utilizzano porine (complessi proteici che formano un canale tra le due facce di una membrana) per attraversare questa barriera (Pagès JM et al, 2008). Il primo esempio dell'efficienza di questa barriera naturale è il fatto che la vancomicina, un antibiotico glicopeptidico, non è attiva contro gli organismi gram-negativi a causa della mancanza di permeabilità attraverso la membrana esterna. Sono stati descritti diversi tipi di porine, che possono essere classificati in base alla loro struttura (trimerica o monomerica), alla loro selettività e alla regolazione della loro espressione. È importante sottolineare che i cambiamenti nella permeabilità attraverso uno di questi meccanismi spesso provocano una resistenza di basso livello e sono spesso associati ad altri meccanismi di resistenza, come una maggiore espressione delle pompe di efflusso (Nikaido H et al, 2003).

## -Pompe di efflusso

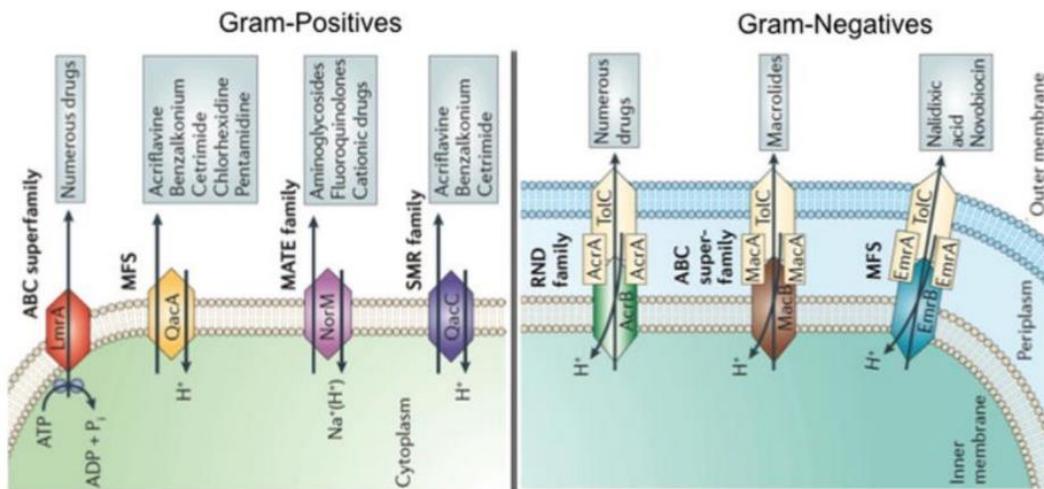
La resistenza antimicrobica può essere provocata anche dalla produzione di “macchinari” batterici complessi in grado di estrudere un composto tossico fuori dalla cellula. La descrizione di un sistema di efflusso in grado di espellere la tetraciclina dal citoplasma di *E. coli* risale ai primi anni '80 ed è stata tra le prime ad essere descritte (McMurry LM et al, 1980). Da allora, molte classi di pompe di efflusso sono state caratterizzate in specie batteriche sia gram-negative che gram-positive. Questi sistemi possono riconoscere solo uno specifico substrato o possedere affinità per un'ampia varietà di substrati: una caratteristica che viene spesso osservata nei batteri Multi-Drug-Resistant (MDR) (Poole K et al, 2005). Questo meccanismo di resistenza colpisce una vasta gamma di classi antimicrobiche tra cui inibitori della sintesi proteica, fluorochinoloni,  $\beta$ -lattamici, carbapenemi e polimixine. I geni che codificano per le pompe di efflusso possono essere localizzati nel cromosoma o nei MGE.

Esistono 5 famiglie principali di pompe di efflusso:

- the major facilitator superfamily (MFS),
- the small multidrug resistance family (SMR),
- the resistance-nodulation-cell division family (RND),
- the ATP-binding cassette family (ABC), and

- the multidrug and toxic compound extrusion family (MATE).

Queste famiglie differiscono in termini di conformazione strutturale, fonte di energia, gamma di substrati che sono in grado di espellere e nel tipo di organismi batterici in cui sono distribuiti (Pidcock LJ et al, 2006). La **Figura 4** mostra i diversi tipi di pompe di efflusso in batteri sia gram-positivi che gram-negativi.



**Figura 4.** Rappresentazione di diversi tipi di pompe di efflusso in batteri gram-positivi e gram-negativi.

Le mutazioni nelle regioni regolatorie dell'efflusso possono annullare una resistenza antibiotica stabile a un ceppo batterico. Un'espressione costitutivamente elevata delle proteine dell'efflusso a seguito di una mutazione può portare ad una maggiore e permanente resistenza agli antibiotici. La MIC di questi ceppi è di solito 2-8 volte superiore a quella dei ceppi *wild type* e lo spettro di resistenza normalmente include una vasta gamma di farmaci antimicrobici (Pidcock et al, 2006).

### 1.3.3 CAMBIAMENTO DEI SITI TARGET

Una strategia comune per i batteri per sviluppare resistenza antimicrobica è quella di evitare l'azione dell'antibiotico interferendo con il loro sito bersaglio. Per raggiungere questo obiettivo, i batteri hanno sviluppato diverse tattiche, inclusa la protezione del bersaglio (evitando che l'antibiotico raggiunga il suo sito di legame) e la sua modifica.

#### -Protezione del target

Esempi di farmaci interessati da questo meccanismo includono tetraciclina (la cui azione è inattivata dalle “ribosomal protection proteins” Tet [M] e Tet [O]), fluorochinoloni (Qnr) e acido fusidico (FusB e FusC) (Connell SR et al, 2003).

#### -Modificazione del sito di destinazione

L'introduzione di modifiche al sito target è uno dei meccanismi più comuni di resistenza agli antibiotici nei patogeni batterici che coinvolgono quasi tutte le famiglie di composti antimicrobici. Questi cambiamenti del target possono consistere in:

- 1) mutazioni puntiformi nei geni che codificano il sito target,
- 2) alterazioni enzimatiche del sito di legame (ad es. Aggiunta di gruppi metilici),
- 3) sostituzione o bypass del target originale.

Indipendentemente dal tipo di cambiamento, l'effetto finale è sempre lo stesso: una diminuzione dell'affinità dell'antibiotico per il sito di destinazione.

#### ***1.4 IN CHE MODO AFFRONTARE LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI***

La resistenza agli antibiotici è diventata una preoccupazione internazionale, con importanti implicazioni sia sul piano clinico (aumento della morbilità, letalità, durata della malattia, possibilità di sviluppo di complicanze, possibilità di epidemie), sia in termini di ricaduta economica per il costo aggiuntivo richiesto per l'impiego di farmaci e di procedure più onerose, per l'allungamento delle degenze in ospedale e per eventuali invalidità. Negli ultimi decenni, gli organismi internazionali tra i quali l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), l'Unione Europea (UE) e il Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) hanno prodotto raccomandazioni e proposto strategie e azioni coordinate atte a contenere il fenomeno, riconoscendo l'antibiotico resistenza come una priorità in un ambito sanitario (Spellberg B et al, 2013). In generale, gli interventi possono essere classificati in due approcci principali:

- a) Strategie per proteggere gli antibiotici come risorsa limitata e prevenire l'emergere e la diffusione di ulteriori resistenze;

b) Rinvigorire i percorsi di sviluppo dei farmaci e introdurre sul mercato nuovi antibiotici.

## 2 ANTIBIOTICO- PERSISTENZA

### 2.1 CARATTERISTICHE GENERALI e DEFINIZIONE

Il problema della resistenza ai farmaci antibatterici è abbastanza noto e, sebbene costituisca un'emergenza clinica e sociale di portata elevatissima, i meccanismi cellulari e molecolari che ne sono alla base sono sufficientemente ben compresi. Meno conosciuti, ma altrettanto importanti e pericolosi, sono i fenomeni della **tolleranza** e della **persistenza agli antibatterici**. Si ritiene che l'esistenza di cellule persistenti sia la causa di molte infezioni batteriche croniche (Conlon et al, 2015; Lewis et al, 2010, 2007; Stewart e Cookson et al, 2012). Il trattamento di queste infezioni croniche, come le malattie indotte da *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* e *S. aureus*, è estremamente difficile a causa del serbatoio di cellule persistenti (Conlon et al., 2015; Lewis, et al, 2010, 2007; Stewart e Cookson et al, 2012). Anche le infezioni del tratto urinario causate da *Escherichia coli* e/o le infezioni opportunistiche nelle protesi o nelle ferite aperte provocate da biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus* rappresentano patologie in cui sono coinvolti i “persisters” (Niu et al., 2015; Norton and Mulvey,2012). Il fenomeno della persistenza fu osservato per la prima volta nel 1944, quando un microbiologo irlandese, Joseph Bigger, trattò una colonia di *Staphylococcus aureus* con penicillina. Come aspettato, il trattamento con penicillina produsse

la lisi della colonia, ma una piccola sottopopolazione sopravvisse. Quando questa sottopopolazione fu re-inoculata, generò una nuova cultura che era ancora sensibile all'azione della penicillina. Quindi, non si era generata resistenza, ma una forma di tolleranza che fu chiamata, appunto, **persistenza**.

Poiché il numero di scienziati che affrontano il puzzle e le sfide della persistenza degli antibiotici da molti punti di vista è aumentato notevolmente, si è reso necessario concordare la definizione di base della persistenza e la sua distinzione dagli altri meccanismi con cui i batteri sopravvivono all'esposizione ai trattamenti battericidi.

Vengono definite cellule persistenti quelle varianti fenotipiche di una popolazione batterica isogenica che sono in grado di sopravvivere ai trattamenti antibiotici, per poi tornare a crescere al termine del trattamento, ripopolando la popolazione batterica e dando luogo ad una “prole” batterica nuovamente sensibile all'antibiotico (Balaban et al, 2019). Le cellule si differenziano in persisters in modo casuale ad una frequenza basale, ma questa conversione può essere indotta da segnali esterni che possono indicare al batterio condizioni ambientali sfavorevoli. Prima di analizzare le differenze fra la persistenza, la resistenza e la tolleranza è opportuno effettuare una distinzione tra la “persistenza antibiotica” ed “infezione persistente” (Nataro, et al, 2000) (Fisher, et al, 2017).

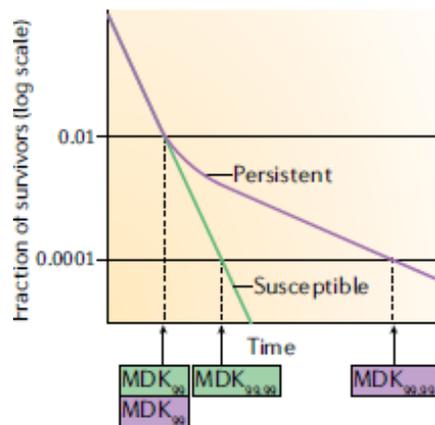
Con il termine **infezione persistente** si descrivono le infezioni, causate da diversi agenti patogeni, che il sistema immunitario dell'ospite non riesce ad eradicare. Diversi meccanismi sono in genere coinvolti in questo tipo di infezioni (Ernst, et al, 2018).

La **persistenza antibiotica** descrive invece una popolazione di cellule batteriche refrattaria ai trattamenti antibiotici, sia in vitro che nell'ospite. La persistenza antibiotica può essere un ulteriore fattore per il prolungamento delle infezioni persistenti, nonostante il trattamento antibiotico (Blango, et al, 2010).

## ***2.2 PERSISTENZA, RESISTENZA e TOLLERANZA***

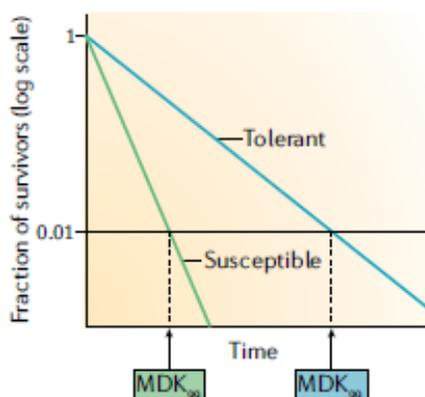
Anche se i concetti di resistenza e persistenza batterica sono abbastanza noti, esistono inoltre diverse caratteristiche che distinguono ancora meglio la persistenza da resistenza, innanzitutto, il segno distintivo della persistenza antibiotica è la curva di uccisione bifasica (**Figura 5**), ovvero l'osservazione che non tutti i batteri in una coltura clonale vengono uccisi allo stesso ritmo. Una dose letale di antibiotico battericida aggiunta al momento zero sradica rapidamente la maggior parte della popolazione (sensibile, linea verde) fino a quando rimangono solo le cellule persistenti non in crescita (linea viola) che vengono uccise a un ritmo più lento. L'uccisione più lenta è stata interpretata in modo da riflettere il tasso di rianimazione da persistere, ma ciò resta da dimostrare sperimentalmente (Blair JM et al, 2015). Quando le cellule

persistenti vengono ricoltivate in un terreno senza antibiotici, la loro progenie dà origine a una popolazione sensibile ai farmaci quanto la popolazione dei genitori da cui è stata isolata, in quanto la persistenza non è causata da mutazioni a livello genotipico ereditabili. Il livello di persistenza, ovvero le dimensioni della sottopopolazione dei persisters, dipenderà debolmente dalla concentrazione del farmaco purché sia molto al di sopra della MIC. Si può però affermare che la persistenza è un fenomeno fortemente correlato all'antibiotico resistenza, in quanto diversi pathway di segnalazione importanti per la formazione dei persisters sono anche coinvolti nell'incremento delle mutazioni (tipo SOS system) e nell'attivazione degli elementi genetici mobili (El-Halfawy, et al, 2015).



**Figura 5.** Curva di killing di una popolazione sensibile (verde) e persistente (viola) in presenza di un antibiotico. L'antibiotico- persistenza è caratterizzata da una curva bifasica di uccisione.

Per quanto riguarda il confronto tra tolleranza e persistenza, i due fenomeni si somigliano nell'aumento della sopravvivenza in presenza di un antibiotico senza aumento della MIC. Tuttavia, la persistenza influenza solo una sottopopolazione di cellule, mentre la tolleranza indica la capacità generale di una popolazione di sopravvivere a trattamenti più lunghi, mostrando un tasso di uccisione più basso (Figura 6) (Handwerger, S, et al, 1985).

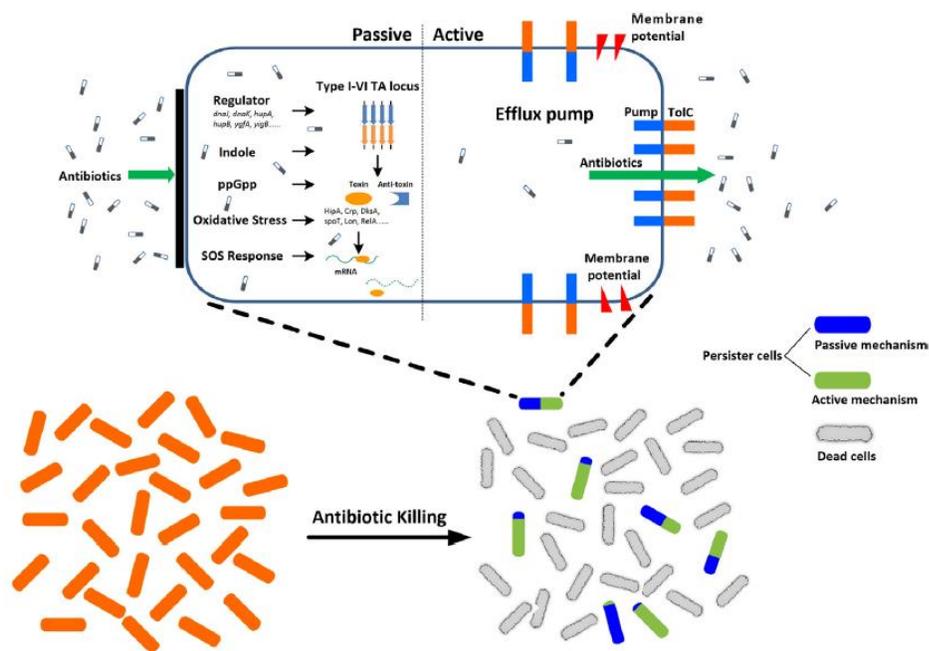


*Figura 6. Curva di killing di una popolazione sensibile (verde) e tollerante (blu) in presenza di un antibiotico. L'antibiotico tolleranza è caratterizzata da una curva di uccisione più lenta rispetto alla popolazione sensibile.*

### **2.3 MECCANISMO DI FORMAZIONE**

La dormienza cellulare è stata a lungo considerata il meccanismo fondamentale alla base della persistenza batterica (Balaban, et al, 2004; Lewis, et al, 2007). I meccanismi molecolari coinvolti nella dormienza cellulare sono stati ampiamente studiati, inclusi i moduli tossina-antitossina (Balaban, et al, 2004; Maisonneuve, et al, 2011), vie di risposta SOS

(Theodore, et al, 2013), vie di risposta all'ossidazione (Vega, et al, 2012; Wu, et al, 2012) e regolatori globali che portano al rallentamento del metabolismo (Hansen, et al, 2008). Tuttavia, la dormienza da sola non è in grado di spiegare appieno la formazione di persister. Si possono dunque distinguere processi attivi e passivi che sono coinvolti nella formazione dei persister come mostra la **Figura 7**.



*Figura 7. meccanismi passivi e attivi della persistenza batterica.*

## DIFESE PASSIVE

1. Moduli Tossina-Antitossina;
2. (p)ppGpp;
3. Indolo;

## **1. MODULI TOSSINA-ANTITOSSINA**

I moduli tossina-antitossina sono degli elementi genetici costituiti dalla **TOSSINA**, una proteina in grado di interferire con processi legati alla vitalità della cellula batterica e l'**ANTITOSSINA** che previene la sintesi della tossina o ne ostacola la funzionalità. Sulla base della natura dell'antitossina e del suo meccanismo di azione sono classificati vari tipi di sistemi, di cui i principali sono:

- Tipo I, se viene inibita la sintesi della tossina tramite sRNA;
- Tipo II, se viene sintetizzata un'antitossina di natura proteica in grado di bloccare direttamente la tossina. Le tossine di tipo II possono avere diverse funzioni, ma nella gran parte dei casi inibiscono la traduzione.

Che ruolo svolgono i moduli TA nella formazione dei persister?

L'attivazione dei moduli TA richiede un'espressione adeguata della tossina e lo sbilanciamento dell'equilibrio tra complesso tossina-antitossina a favore della tossina: ciò porta ad una transizione verso la dormienza della cellula batterica.

Una graduale attivazione dei moduli TA in modo che non venga completamente annullata la crescita batterica permette di modificare il ritmo di crescita e modificare la fisiologia per aumentare la tolleranza allo stress. Un esempio del modulo TA è rappresentato dall'operone HipB-HipA, dove il locus HipA,

codifica per una serin-chinasi, ovvero un enzima che è coinvolto nell'inibizione della sintesi proteica e perciò nell'arresto cellulare. L'attività della proteina HipA si neutralizza quando viene legata dalla proteina HipB e il complesso si lega al promotore hipAB (Korch, et al, 2003; Moyedand Bertrand, et al, 1983). Dei numerosi loci TA espressi da *E. coli*, hipA è il più ampiamente studiato e ha notevolmente migliorato la nostra comprensione di come i sistemi TA facilitano la persistenza (Schumacher, et al, 2015; Schumacher, et al, 2009). Sono state messe appunto diverse varianti della proteina HipA, come ad esempio il mutante HipA7 che rende più efficace la tossina, con conseguente aumento del fenotipo di persistenza (Schumacher, et al, 2015).

## **2. (p)ppGpp**

La guanosina tetrafosfato (ppGpp) induce una repressione trascrizionale su larga scala dei geni coinvolti nella biosintesi degli aminoacidi, nella risposta allo stress e nell'acquisizione dei nutrienti. Allo stesso tempo, ppGpp inibisce direttamente le attività dei fattori di traduzione e degli enzimi coinvolti nella biosintesi di GTP, che sono essenziali per la rapida crescita dei batteri (Gaca, et al, 2015; Hauryliuk, et al, 2015; Liu, et al, 2015). È interessante notare che i persisters possiedono livelli molto elevati di ppGpp (Maisonneuve, et al, 2013). Attraverso l'imaging fluorescente a singola cellula, un recente studio (Maisonneuve, et al, 2013) ha rivelato che l'espressione stocastica di ppGpp in

cellule a crescita esponenziale ha determinato la persistenza delle cellule batteriche (Maisonneuve, et al, 2013). Studi successivi hanno riportato in che modo i ppGpp media la formazione di persisters, (Gaca, et al, 2015; Hauryliuk, et al, 2015; Liu, et al, 2015), sebbene il meccanismo dettagliato è ancora ignoto.

### **3. INDOLO**

L'Indolo è un composto eterociclico, che a temperatura ambiente si presenta come solido incolore. È un composto molto diffuso tra i microorganismi, che svolge un ruolo importante in aspetti della fisiologia batterica, come la formazione di spore, la stabilità dei plasmidi, la resistenza ai farmaci, la formazione di biofilm e la virulenza. In risposta ai cambiamenti di densità cellulare, fonti di carbonio, temperatura e pH, le molecole di indolo vengono sintetizzate dalla triptofanasi a partire dall'amminoacido L-triptano in varie specie batteriche, regolando molti processi cellulari. (Lee and Lee, et al, 2010; Lee et al., et al, 2015). Inoltre, come molecola di segnalazione intercellulare, l'indolo può portare alla formazione di persisters. In un modello recente, il rilevamento dell'indolo ha portato all'attivazione di numerosi processi di rottura della membrana, innescando risposte protettive nella cellula batterica e creando una popolazione persistente (Vega, et al, 2012).

## **DIFESE ATTIVE**

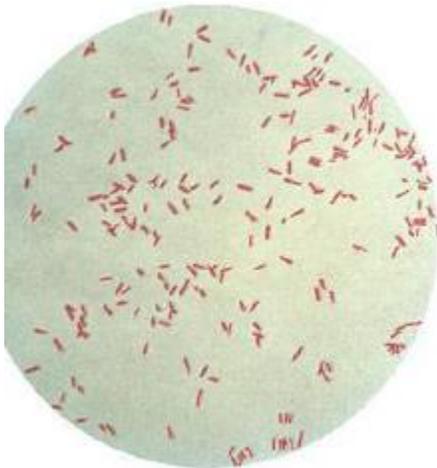
L'estrusione di farmaci dalla cellula attraverso i sistemi di efflusso è uno dei meccanismi più importanti che spiegano la resistenza agli antibiotici. Tuttavia, le pompe di efflusso non solo conferiscono resistenza agli antibiotici utilizzati nella terapia clinica, ma svolgono anche ruoli cruciali nella patogenicità batterica (Buckley, et al, 2006; Hirakata, et al, 2002; Jerse, et al, 2003) e persistenza batterica (Abel Zur Wiesch, et al, 2015; Adams, et al, 2011; Pu, et al, 2016), che era stata precedentemente associata solamente alla dormienza cellulare, rivelando uno stato dormiente ma attivo di cellule persistenti (Abel Zur Wiesch., et al, 2015; Du Toit, et al, 2016; Gerdes and Semsey , et al, 2016; Pu et al., 2016). Pertanto, le cellule persistenti mettono in atto due strategie apparentemente contraddittorie per garantire sopravvivenza sotto attacco antibiotico. Nella strategia dormiente, sebbene l'antibiotico si legghi al bersaglio del farmaco, non riesce a avere effetto a causa dei percorsi a valle del sito target inattivi. Al contrario, nella strategia attiva, la maggior parte degli antibiotici che entrano in queste cellule vengono espulsi dalle pompe di efflusso prima di raggiungere gli obiettivi del farmaco, stabilendo una linea di difesa attiva prima di utilizzare la difesa passiva attraverso la dormienza. (Balaban et al., 2004; Rotem et al., 2010).

### 3. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

#### 3.1 CARATTERISTICHE GENERALI

La specie *Pseudomonas aeruginosa* (dal greco pseudo= variabile e monas= forma) è un bacillo Gram-negativo appartenente alla Famiglia delle *Pseudomonadaceae*, che comprende microorganismi di forma bastoncellare, (Figura 8),

A)



B)



**Figura 8.** A) *P.aeruginosa* osservato al microscopio ottico; B) *P.aeruginosa* osservato al microscopio elettronico.

con corpo diritto o leggermente incurvato, mobili per flagelli polari, non acido resistenti, le cui caratteristiche fondamentali sono:

- Metabolismo Ossidativo (Ox) e mai fermentativo;
- Aerobiosi/anaerobiosi facoltativa;

- Catalasi positiva;
- Ossidasi generalmente positiva;
- Cromogenesi: molte specie producono pigmenti solubili o non in acqua.

(Stover CK, et al, 2000)

Crescono su tutti i comuni terreni culturali a temperature comprese tra 4 e 43°C.

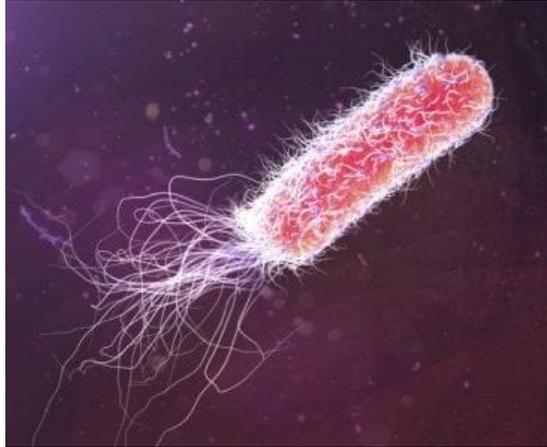
La famiglia riveste una notevole importanza sia perché comprende specie patogene (*P. mallei*) oppure occasionalmente patogene (*P. pseudomallei*, *P. aeruginosa*) sia soprattutto, per i notevoli danni economici da essi arrecati essendo tra i maggiori responsabili dei processi alterativi dei vari alimenti, in particolare di quelli conservati a bassa temperatura.

Morfologicamente si presentano in genere di dimensione piuttosto piccole (0,5-1,0/1,5-4,0 micron). Le dimensioni, tuttavia possono presentare notevoli variazioni; anche nello stesso ceppo possono trovarsi forme cocco-bacillari e decisamente bacillari. Asporigeni acapsulati, anche se secondo alcuni ricercatori la maggior parte delle specie produrrebbe un sottile strato viscoso addossato alla parete cellulare. Molte specie producono un pigmento idrosolubile fluorescente, in particolare se coltivate in terreni poveri in ferro, come pure pigmenti blu, rossi, gialli o verdi insolubili, come pioverdina, piocianina, piorubina. La maggior parte delle specie, comprese quelle patogene, non richiedono per lo sviluppo l'aggiunta ai terreni di fattori di crescita, mentre alcune richiedono

l'aggiunta di vitamine o aminoacidi. Le esigenze termiche per lo sviluppo variano notevolmente; la temperatura ottimale è intorno ai 30°C ma possono crescere, a seconda della specie, a temperature comprese tra 4 e 43°C. Fatta eccezione per le specie patogene, tuttavia, sono da considerare delle specie psicrotrofe. Crescono bene in ambiente neutro o alcalino (pH 7,0-8,5) e non sono in grado di riprodursi quando il pH scende sotto 6,0. Le specie isolate dalle acque marine possono richiedere per lo sviluppo l'aggiunta di almeno l'1% di NaCl nei terreni colturali. Sono microorganismi largamente diffusi in natura, ubiquitari nel suolo e nelle acque. (Tiecco G. et al, 2000).

### ***3.2 PSEUDOMONAS AERUGINOSA NELL'UOMO***

Nell'uomo la specie più comune appartenente al genere *Pseudomonas* è *P. aeruginosa*, una specie ubiquitaria e con caratteristiche di adattabilità che ne consentono la sopravvivenza negli ambienti più disparati (acque e superficie umide, cosmetici, shampoo, pasta dentifricia, saponi, creme e lozioni per le mani, pomate, nebulizzatori, disinfettanti, liquidi oculari, fluidi dialisi, piscine, docce, lavandini, vasche da bagno, incubatrici, vasche per lavaggio neonati) che possono perciò rappresentare una sorgente di infezione (**Figura 9**).



*Figura 9: Cellula di P.aeruginosa al microscopio elettronico a scansione.*

Ad oggi *P. aeruginosa* rappresenta un importante problema a livello sanitario, essendo uno dei principali patogeni opportunisti e causando, soprattutto in pazienti immunocompromessi ed ospedalizzati, diverse forme morbose dalla più semplice alle più complesse. Esso è responsabile infatti di:

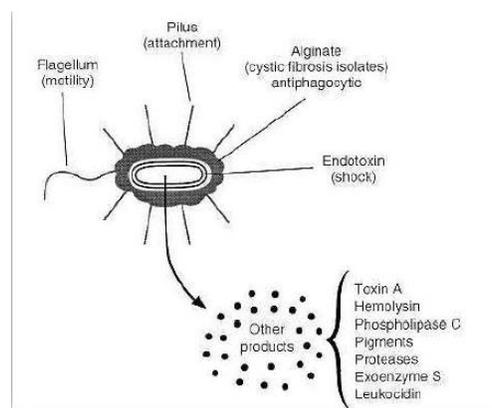
- 1- Infezioni cutanee (follicoliti, infezioni della cute ustionata, infezioni dell'orecchio, infezioni di ferite e infezioni delle unghie);
- 2- Infezione all'occhio (acqua contaminata, soggetti con abrasioni corneali o portatori di lenti a contatto, post-intervento chirurgico);
- 3- Batteriemie, sepsi, endocardite (prevalentemente in soggetti affetti da diabete, immunocompromessi, con neoplasie o ustionati);
- 4- Infezioni urinarie (pazienti con cateteri, pazienti con uropatie ostruttive cui siano stati somministrati antibiotici a largo spettro, pazienti sottoposti a manipolazioni urologiche);

5- Infezioni respiratorie (infezioni alle basse vie respiratorie, da bronchiti benigne sino a bronco polmoniti necrotizzanti);

6- Infezioni respiratori in pazienti affetti da **FIBROSI CISTICA**.  
(Zavanella M., et al, 2004).

L'elevata virulenza di questa specie è data da un vasto numero di fattori di virulenza che *Pseudomonas aeruginosa* possiede, i quali possono essere suddivisi in:

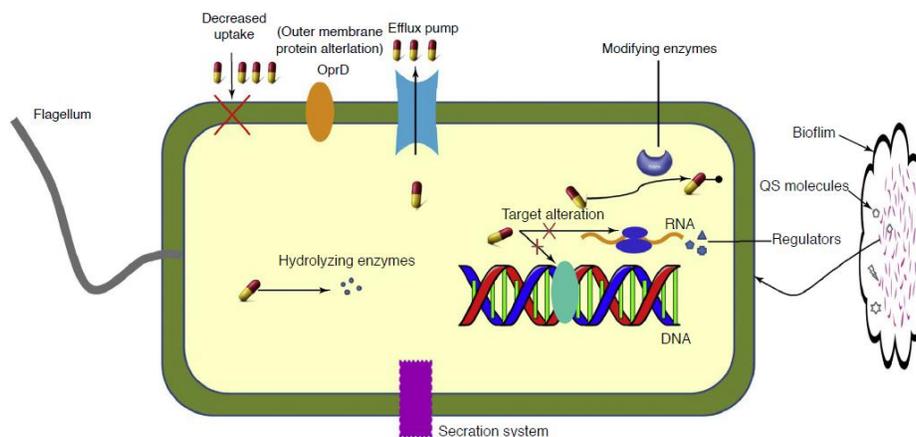
- Componenti strutturali: adesine e capsula polisaccaridica;
- Tossine: endotossina, esotossina A, esoenzima S;
- Enzimi e altri prodotti spesso iniettati nelle cellule eucariotiche attraverso sistemi di secrezione di tipo III e IV: elastasi, proteasi, piocianina, pioverdina, piorubina (**Figura 10**).



**Figura 10.** Rappresentazione di alcuni fattori di virulenza di *Pseudomonas aeuroginosa*.

### 3.3 Resistenza e Persistenza in *Pseudomonas aeruginosa*

Come descritto dal paragrafo precedente, *P. aeruginosa* è un organismo patogeno che causa malattie sia nelle piante che negli animali, compresi gli esseri umani ed è una delle principali cause di infezioni acquisite in ospedale (IIS) nei pazienti (Tacconelli E, et al. (2002)). Il notevole sviluppo di antibiotico resistenze in *P. aeruginosa* rende molto difficile il trattamento delle infezioni e limita le diverse opzioni terapeutiche. Alcuni ceppi sono resistenti alla maggior parte degli agenti antimicrobici disponibili, dai carbapenemici alle cefalosporine di terza generazione, che sono le opzioni principali per il trattamento dei batteri multidrug resistant (MDR). *P. aeruginosa* ha sviluppato molteplici meccanismi per resistere agli agenti antimicrobici (**Figura 11**).



**Figura 11.** Meccanismi di resistenza antimicrobica in *Pseudomonas aeruginosa*.

Come citato precedentemente, la resistenza antimicrobica può essere suddivisa in resistenza intrinseca e resistenza acquisita, ma in molte specie batteriche, compreso *Pseudomonas aeruginosa*, è possibile osservare un terzo fenotipo di resistenza, di tipo adattativo (Lambert, P.A. et al. 2002).

Per quanto riguarda la resistenza intrinseca essa è dovuta a:

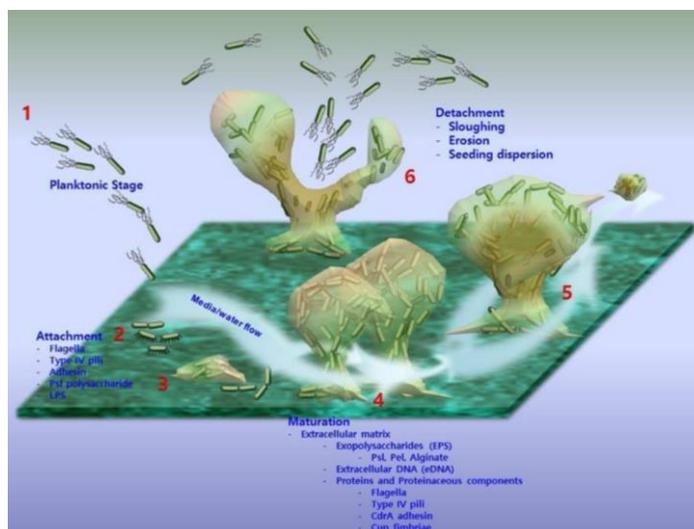
-struttura della parete batterica;

-formazione del biofilm.

È già noto da tempo come la membrana esterna dei Gram-negativi sia estremamente selettiva nel lasciar passare vari tipi di molecole, antibiotici inclusi (Nicas TI and REW Hancock, et al, 1983.). Questa caratteristica è ancora più accentuata in *P. aeruginosa*, la cui membrana esterna è 12-100 volte meno permeabile della membrana di *Escherichia coli* (Hancock REW, et al, 1998.)

Questa bassissima permeabilità è dovuta al fatto che la maggior parte delle porine (tra cui le principali sono OprF, OprD e OprB), presenti sulla membrana esterna di *P. aeruginosa*, ha in realtà un canale dal diametro decisamente ristretto, mentre quelle deputate al passaggio di grandi molecole idrofiliche (tra cui alcuni antibiotici) sono presenti in un numero modestissimo (Breidenstein EBM, et al, 2011.)

La **formazione del biofilm** porta alla formazione di microcolonie di batteri inglobate in una matrice formata soprattutto dall'esopolisaccaride alginato (MEP) (**Figura 12**). Il primo evento nella formazione del biofilm è rappresentato dal processo di adesione mediato da strutture della superficie cellulare di *P. aeruginosa*, quali il flagello e strutture di tipo CUP (Chaperone Usher Pathway); nelle fasi successive la strutturazione delle microcolonie in un biofilm maturo implica l'intervento di diversi determinanti per l'espressione di alcuni geni legati al “quorum sensing”, una modalità di comunicazione tra batteri basata sulla produzione di sostanze diffusibili che correlano direttamente con la densità cellulare in un determinato ambiente. Nel caso di *P. aeruginosa* la molecola segnale è l'omoserina lattone, che interagisce tramite vari attivatori trascrizionali che coordinano l'espressione di un pool di geni correlati alla virulenza e codificanti vari fattori, quali alginato, proteasi, emolisine A e pigmenti che facilitano la persistenza del batterio nel polmone (Davies et al., 1998). Il MEP rappresenta anche una barriera difensiva nei confronti di agenti antimicrobici e del sistema immunitario dell'ospite. Inoltre, la lenta crescita batterica, limitata dalla carenza di ferro e altri nutrienti all'interno del biofilm, riduce la suscettibilità batterica agli antibiotici, contribuendo in tal modo all'inabilità di eradicare *P. aeruginosa* anche con i trattamenti antibiotici più aggressivi.



**Figura 12.** Schema della formazione del biofilm prodotto da *Pseudomonas aeruginosa*.

*P. aeruginosa* possiede una spiccata capacità di acquisire fattori di resistenza dall'esterno tramite HGT (resistenza acquisita), conferendo spesso alla specie un fenotipo multi-resistente a diverse classi di antibiotici. Sono molti i geni di resistenza che risultano trasferibili attraverso plasmidi, trasposoni, integroni, profagi, ecc. e non è raro che alcuni di questi elementi trasferibili contengano più fattori di resistenza (Breidenstein EBM, et al, , 2011.). Per ogni classe di antibiotico, *Pseudomonas aeruginosa* ha sviluppato una serie di meccanismi di resistenza:

La **resistenza ai BETA-LATTAMICI**: il meccanismo più comune è l'incremento della produzione della beta-lattamasi AmpC che causa ridotta sensibilità ai beta-lattamici quali penicilline, cefemi e monobactami (Rossolini et al, 2005).

Sono state classificate tre tipi diversi di beta-lattamasi in *P. aeruginosa*:

- Penicillasi a spettro-ristretto che degradano le penicilline e le cefalosporine anti- *Pseudomonas*, ma non attive per i cefemi, i monobactami e i carbapenemi (Bush et al. 1995).
- beta-lattamasi (ESBLs) ad ampio spettro che degradano penicilline, cefemi, monobactami (aztreonam), ma non i carbapenemi (imipenem e meropenem) (Bradford et al, 2001).
- Metallo-beta-lattamasi (MBL), che degradano quasi tutti i beta-lattamici anti-*Pseudomonas* tranne i monobactami. (Rossolini et al, 2005, Livermore et al, 2001).

Inoltre, la resistenza ai beta-lattamici si manifesta anche con una ridotta espressione delle porine della membrana esterna (Poole K, et al, 2011).

Le **resistenze agli AMINOGLICOSIDI** sono dovute dall' over-espressione della pompa di efflusso MexXY-OprM, alla metilazione dell'rRNA 16S con blocco del sito A della subunità ribosomiale 30S, alla modificazione dell'antibiotico tramite modificazione enzimatica (AMEs).

Le **resistenze ai FLUOROCHINOLONI** sono dovute alle mutazioni legate alla sovraespressione delle pompe d'efflusso, oppure a mutazioni dei siti bersaglio delle topoisomerasi (Jalal et al 2000).

Le **resistenze** alle **TETRACICLINE** sono dovute alla sovra-espressione delle pompe di efflusso MexAB-OprM e MexXY-OprM.

Infine, le **resistenze** ai **MACROLIDI** dipendono dalla sovra-espressione delle pompe di efflusso e da meccanismi di mutazione del bersaglio (rRNA 23S).

La resistenza intrinseca e acquisita in *P. aeruginosa* viene in alcuni casi definita anche “adattativa”, poiché l’espressione dei geni aventi un ruolo nella sensibilità agli antibiotici può spesso essere influenzata da segnali ambientali: è stato osservato come il pH, la concentrazione di ossigeno, la disponibilità di fonti di carbonio, la formazione di biofilm e soprattutto la presenza di antibiotico in concentrazioni sub-letali siano dei fattori in grado di innescare e modulare l’espressione di molti geni di resistenza (Fernández L, et al, 2011). L’elasticità del sistema di resistenza adattativa rende spesso imprevedibile la risposta al trattamento di infezioni causate da *P. aeruginosa*, fatto ancora più evidente per il ripristino della sensibilità wildtype in assenza del fattore innescante. La resistenza adattativa potrebbe anche essere uno dei motivi per cui spesso la terapia in vivo non ha un esito positivo come suggerirebbe l’attività antimicrobica osservata in vitro (Breidenstein EBM, et al, 2011.)

Come descritto precedentemente oltre alla resistenza batterica, anche il fenomeno della persistenza è in grande sviluppo, è anche *Pseudomonas aeruginosa* presenta dei meccanismi sia attivi che passivi, coinvolti in questo fenomeno, in cui è stato dimostrato il coinvolgimento di una delle pompe di efflusso principali MexAB-OprM, risultate essere un meccanismo attivo nella formazione di cellule persistenti.

## 4. POMPA DI EFFLUSSO MexXY-OprM

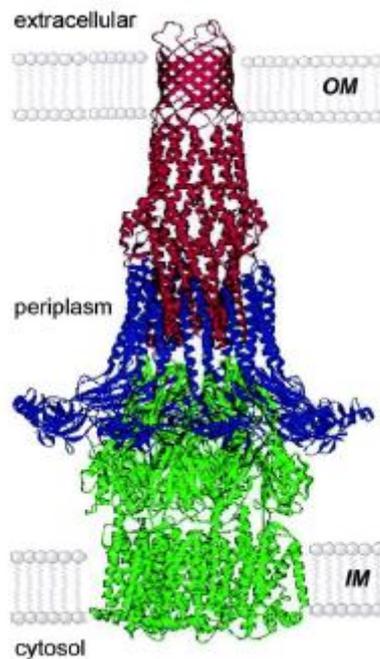
### 4.1 Pompe di efflusso in *Pseudomonas aeruginosa*

Come descritto precedentemente una pompa di efflusso rappresenta un sistema proteico il quale svolge ruoli importanti nella resistenza in *Pseudomonas aeruginosa* e in altri ceppi batterici. In *P. aeruginosa*, in particolare, sono state descritte diverse pompe di efflusso che appartengono alla famiglia RND, la quale è caratterizzata dalla combinazione di tre subunità:

1. RND transporter, posto nella membrana citoplasmatica e atto a legare ed estrarre la molecola di antibiotico sfruttando il gradiente protonico.
2. Un canale proteico inserito nella membrana esterna (OMF) in diretta comunicazione con l'ambiente extracellulare.
3. Una proteina di fusione di membrana (MFP), localizzata a livello dello spazio periplasmatico, che collega i due componenti menzionati sopra.

(Tsutsumi K., et al, 2019).

Queste proteine si complessano a formare un canale attraverso il quale la molecola target viene estrusa dal citoplasma nell'ambiente extracellulare (De Kievit TR., et al, 2001) (**Figura 13**).



**Figura 13.** Rappresentazione di una pompa di efflusso della superfamiglia RND.

Sono state descritte 4 pompe di efflusso della famiglia RND in *P. aeruginosa*, MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN; di queste, le prime due sono quelle principalmente coinvolte nel fenomeno dell'antibiotico resistenza (Li XZ., et al, 1995). In particolare, MexAB-OprM è in grado di estrarre una vasta gamma di substrati, tra cui beta-lattamici, tetracicline, cloramfenicolo e chinoloni (Lau CHF, et al, 2014), mentre MexXY-OprM presenta l'affinità maggiore per gli aminoglicosidi (Guenard S et al., 2014).

La **Tabella 1** riassume le principali pompe di efflusso di *Pseudomonas Aeruginosa* con i rispettivi substrati.

Efflux system	Efflux pump family	Substrates
MexAB-OprM	Resistance Nodulation Division (RND)	Fluoroquinolones Aminoglycosides $\beta$ -Lactams (preferably Meropenem, Ticarcillin) Tetracycline Tigecycline Chloramphenicol
MexCD-OprJ	Resistance Nodulation Division (RND)	Fluoroquinolones $\beta$ -Lactams (preferably Meropenem, Ticarcillin) Tetracycline Tigecycline Chloramphenicol Erythromycin Roxythromycin
MexEF-OprN	Resistance Nodulation Division (RND)	Fluoroquinolones $\beta$ -Lactams (preferably Meropenem, Ticarcillin) Tetracycline Tigecycline Chloramphenicol
MexXY-OprM	Resistance Nodulation Division (RND)	Fluoroquinolones Aminoglycosides $\beta$ -Lactams (preferably Meropenem, Ticarcillin, Cefepime) Tetracycline Tigecycline Chloramphenicol

**Tabella 1.** Principali pompe di efflusso della famiglia RND di *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 4.2 Struttura di MexXY-OprM

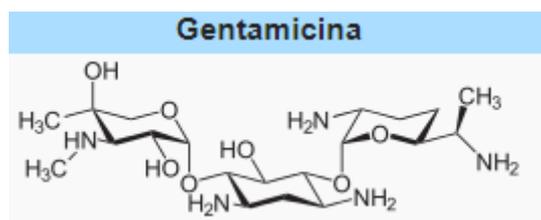
La pompa di efflusso MexXY-OprM costituisce in *P. aeruginosa* il principale determinante di resistenza nei confronti degli aminoglicosidi.

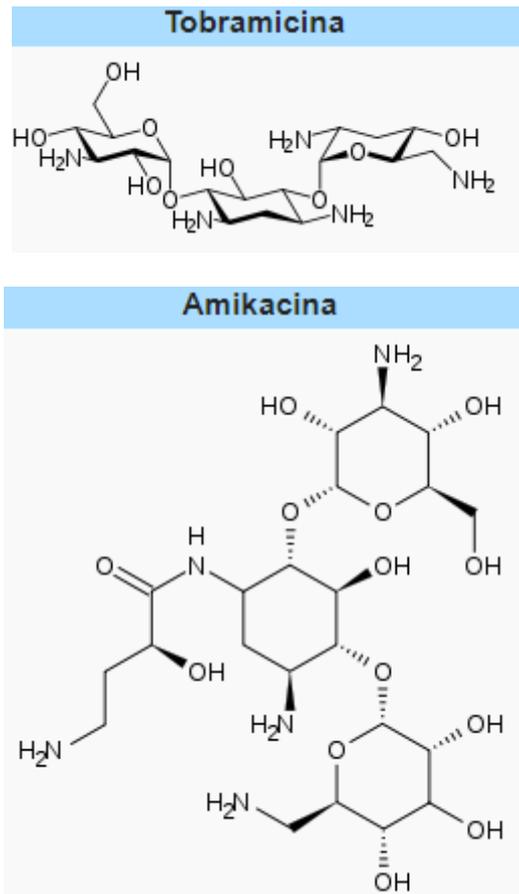
Gli aminoglicosidi sono una classe di antibiotici attivi contro batteri aerobi Gram-negativi, come *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinobacter* e anche alcune specie di micobatteri. Sono formati da un gruppo amminico e un gruppo

glicosidico, che forniscono loro proprietà basiche e ne comportano un'elevata solubilità in acqua. Gli aminoglicosidi esercitano la loro funzione legandosi a proteine specifiche della subunità 30S del ribosoma, inibendo la sintesi proteica del batterio in almeno tre modi:

- blocco della formazione del complesso ribosoma-RNA messaggero;
- induzione di errori nella lettura del messaggero stesso, con l'incorporazione di amminoacidi errati provocando la sintesi di proteine anormali e/o non funzionali;
- impedimento della traslocazione del peptidil-tRNA dal sito A al sito P del ribosoma.

La streptomicina è stata il primo aminoglicoside ad essere scoperto, purificato da *Streptomyces griseus*, ed impiegato soprattutto nel trattamento della tubercolosi e delle infezioni provocate da batteri Gram-negativi. Gli aminoglicosidi adottati di routine contro *P. aeruginosa* sono tobramicina, gentamicina e amikacina (**Figura 14**).

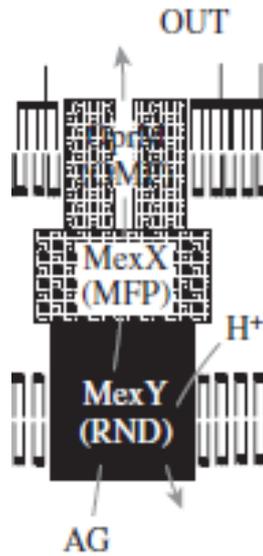




**Figura 14.** Strutture chimiche di tobramicina, gentamicina e amikacina.

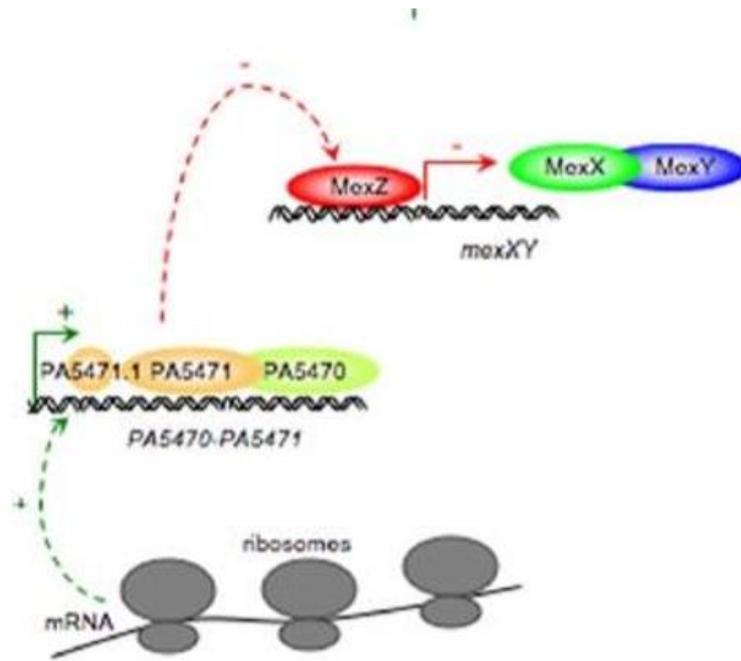
La tobramicina si è subito mostrata dai test in vitro molto attiva contro *P. aeruginosa* e viene, infatti, adottata di routine nelle infezioni polmonari in pazienti affetti da fibrosi cistica (Cantón R, et al, 2005).

Come la pompa MexAB-OprM, anche la pompa MexXY-OprM è costituita da tre componenti: un canale antiporto (farmaco/H<sup>+</sup>) nella membrana interna (MexY), una proteina-canale nella membrana esterna (OprM) e una proteina periplasmatica di fusione che unisce le due componenti (MexX). (**Figura 15**) (Hocquet D. et al, 2003).



**Figura 15.** Rappresentazione dei tre componenti della pompa di efflusso MexXY-OprM.

In *Pseudomonas aeruginosa* è stato osservato che le componenti MexX e MexY vengono codificate da un unico operone, mentre il gene per il componente OprM si trova solitamente sull'operone del sistema di efflusso MexAB-oprM (Lau CHF, et al, 2014). L'espressione costitutiva, a bassi livelli, di questo sistema può rendere il microorganismo intrinsecamente resistente a limitate concentrazioni di antibiotico, tuttavia esiste anche un meccanismo di regolazione dell'espressione genica che può portare ad un fenotipo più resistente di *P. aeruginosa* (Morita Y, et al, 2012). La **Figura 16** mostra i componenti genetici coinvolti nella regolazione della pompa.



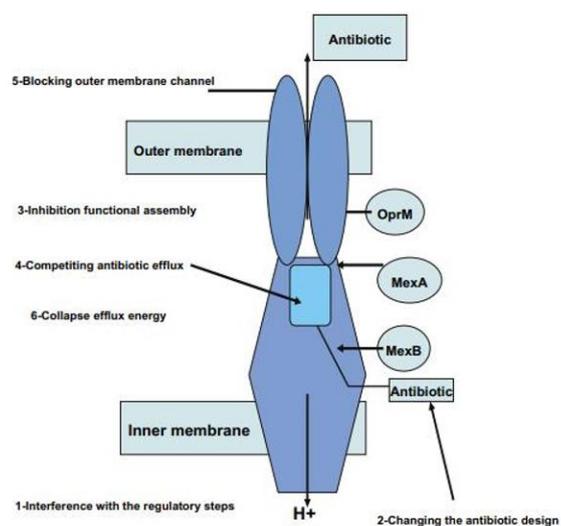
**Figura 16:** Meccanismi molecolari coinvolti nell'espressione dei geni *mexX* e *mexY*. *MexZ* e il prodotto del gene *PA5471* rappresentano i due fattori principali nella regolazione.

Nelle cellule persistenti, le pompe di efflusso sono generalmente indicate come un meccanismo attivo di tolleranza nei confronti dell'antibiotico (Pu et al., 2016).

#### **4.3 Il ruolo degli inibitori delle pompe di efflusso**

Gli inibitori delle pompe di efflusso (EPIs) sono una classe di composti di varia natura (naturali, semi-sintetici e sintetici), capaci di inibire l'efflusso degli antibiotici dalla cellula microbica e di permettere l'accumulo dei farmaci in ambiente intracellulare. In questo modo la suscettibilità dei ceppi resistenti viene ripristinata e non si riscontra uno sviluppo di resistenza all'inibitore, in

quanto di per sé manca di attività antibatterica. Per tale ragione, la ricerca di nuovi EPI, da usare in combinazione con antibiotici conosciuti, costituisce un argomento di ricerca che sta riscuotendo molto interesse sia in ambito chimico che microbiologico. L'attività di inibizione dipende dal tipo di interazione tra composto e pompa di efflusso ed esistono diversi meccanismi come mostra la **Figura 17**.



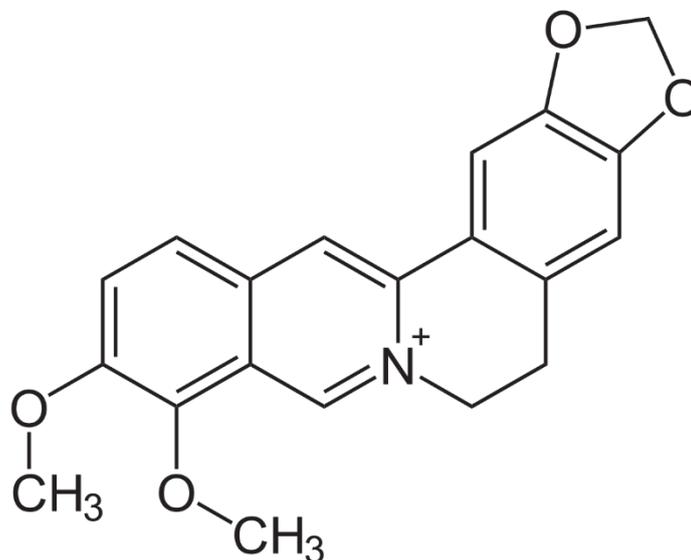
**Figura 17.** *Principali meccanismi di inibizione della pompa di efflusso.*

Il primo EPI descritto è stato la fenilalanina-arginina- $\beta$ -naftilammide (PA $\beta$ N o MC 207,110) un composto peptidomimetico considerato l'EPI per eccellenza in quanto riduce in maniera significativa la resistenza ai fluorochinoloni in *P. aeruginosa*. Questa classe di antibiotici costituisce il “substrato universale” delle pompe di efflusso, pertanto l'attività degli EPIs viene spesso testata tenendo in considerazione la resistenza a tali farmaci. Il meccanismo d'azione

si basa su un'inibizione competitiva: la pompa di efflusso riconosce l'inibitore come substrato anziché l'antibiotico target, la cui concentrazione intracellulare aumenta raggiungendo concentrazioni battericide (Askoura M., et al, 2011). Un altro noto EPI è il carbonil cianuro m-clorofenil idrazone (CCCP) meno specifico di PA $\beta$ N, in quanto "de-energizza" le pompe RND riducendo la forza proton-motrice, responsabile del funzionamento dei complessi stessi (Nelson ML, et al, 2002). L'interazione risulta quindi indiretta e, pertanto, non viene considerato un vero inibitore. Diversi studi hanno messo in luce la tossicità di entrambi questi nei confronti delle cellule eucariotiche, limitandone l'impiego in ambito clinico. Negli ultimi anni la ricerca di nuovi EPI ha permesso di identificare nuove promettenti molecole da poter utilizzare in combinazione con antibiotici adottati di routine nel trattamento di infezioni sostenute da *P. aeruginosa*. Nello specifico caso della pompa MexAB-OprM, sono stati recentemente individuati due composti, il pregnan-20-one (P1) e il morelloflavone, che hanno mostrato sinergia con l'antibiotico ciprofloxacina nei confronti di ceppi MDR di *P. aeruginosa* isolati da pazienti con fibrosi cistica (Mangiaterra G., et al, 2016); entrambi i composti mostrano affinità per il sito di legame dell'antibiotico nel trasportatore RND, ma presentano anche la capacità di bloccare i cambiamenti conformazionali responsabili dell'estrusione del farmaco.

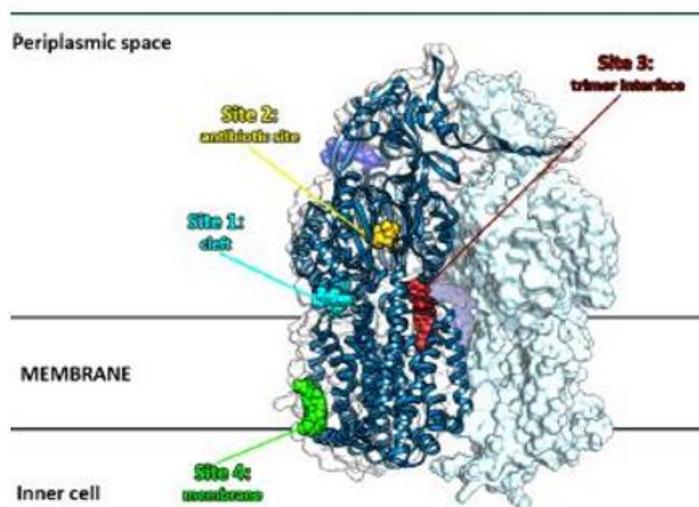
#### 4.4 Berberina

Un ulteriore importante inibitore su cui sono tutt'ora in corso studi è la Berberina (Be), (**Figura 18**) un alcaloide naturale estratto da diverse piante tra cui *Hydratis Canadensis* e *Berberis aristata*, che presenta attività specifica contro la pompa MexXY-OprM ed ha mostrato sinergia con la tobramicina, (Laudadio E., et al, 2019).



**Figura 18.** *Struttura chimica della Berberina.*

Anche in questo caso si instaura una competizione tra EPI ed antibiotico per il sito di legame nel trasportatore RND; l'EPI, formando un complesso più stabile con la proteina MexY, impedisce il reclutamento della tobramicina e quindi l'espulsione dalla cellula, permettendo all'antibiotico di agire a livello del suo bersaglio intracellulare (**Figura 19**).



*Figura 19: Localizzazione dei siti di legame sul monomero MexY: sito2 (giallo) sito di legame dell'antibiotico.*

Il ruolo degli EPI per contrastare il dilagante fenomeno dell'antibiotico resistenza è stato ampiamente dimostrato, mentre rimangono scarse le informazioni sulla loro influenza sul fenotipo persistente. Trattandosi di un fenomeno transitorio nel tempo e di natura multifattoriale, non è ancora chiaro se l'azione degli EPI possa contrastare lo sviluppo delle cellule persistenti e permettere così l'eradicazione dei processi infettivi.

## SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato innanzitutto valutare il coinvolgimento della pompa di efflusso MexXY-OprM nella persistenza alla tobramicina e nella produzione di biofilm in diversi ceppi clinici di *Pseudomonas aeruginosa* (CF e non CF). Inoltre, è stata valutata la capacità *anti-persistenter* della berberina, già descritta come inibitore della pompa, in associazione con la tobramicina. Infine, sono state analizzate le sequenze parziali di alcuni ceppi scelti sulla base della loro risposta al trattamento con la berberina, al fine di evidenziare possibili mutazioni che possano spiegare il differente comportamento in presenza dell'inibitore. Data la crescente preoccupazione dovuta al dilagare di infezioni croniche e refrattarie al trattamento antibiotico, lo sviluppo di nuove strategie farmaceutiche risulta essere di primaria importanza. In tale prospettiva l'impiego di inibitori delle pompe di efflusso, considerate tra i principali meccanismi di resistenza e persistenza, può rappresentare un promettente approccio terapeutico.

## MATERIALI E METODI

### *1.1 Isolati batterici, terreni di coltura e antibiotici*

Sono stati utilizzati 30 ceppi batterici, 18 isolati da campioni di espettorato di pazienti affetti da fibrosi cistica resistenti agli aminoglicosidi e 8 campioni isolati da altre matrici biologiche, proveniente sia dal Laboratorio di Torrette “Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Ancona”, sia dal Laboratorio di Fermo “Ospedale Augusto Murri”. I ceppi utilizzati sono elencati in **Tabella 2**.

I ceppi PA01, K767, PA14 e ATCC 27853 fanno parte della collezione della sezione di Microbiologia generale del Dipartimento Scienze della Vita e dell’Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona.

Gli isolati sono stati fatti crescere su piastre di terreno LB agar e poi conservati come colture di stoccaggio a -80°C in LB brodo supplementato col 20% di glicerolo. Tutti i terreni di coltura sono stati forniti dalla ditta Oxoid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

L’antibiotico tobramicina utilizzato è stato fornito da Sigma-Aldrich (Saint Luis, Missouri, USA). La berberina è stata fornita da SPECS ([www.specs.net](http://www.specs.net)).

<b>CEPPO</b>	<b>MATRICE</b>
<b>C6</b>	CF ESPETTORATO
<b>C9</b>	CF ESPETTORATO
<b>C15</b>	CF ESPETTORATO
<b>C25</b>	CF ESPETTORATO
<b>C30</b>	CF ESPETTORATO
<b>C31</b>	CF ESPETTORATO
<b>C54</b>	PUS
<b>C59</b>	URINOCOLTURA
<b>C61</b>	URINOCOLTURA
<b>C76</b>	TAMPONE NASOFARINGEO
<b>C83</b>	URINOCOLTURA
<b>C84</b>	URINOCOLTURA
<b>C86</b>	URINOCOLTURA
<b>C104</b>	URINOCOLTURA
<b>AR48</b>	CF ESPETTORATO
<b>AR51</b>	CF ESPETTORATO
<b>NC01</b>	CF ESPETTORATO
<b>NC02</b>	CF ESPETTORATO
<b>NC03</b>	CF ESPETTORATO
<b>NC04</b>	CF ESPETTORATO
<b>NC05</b>	CF ESPETTORATO
<b>NC06</b>	CF ESPETTORATO
<b>NC07</b>	CF ESPETTORATO
<b>NC08</b>	CF ESPETTORATO
<b>NC09</b>	CF ESPETTORATO
<b>NC10</b>	CF ESPETTORATO

*Tabella 2. Elenco ceppi utilizzati e matrici da cui sono stati prelevati.*

## ***1.2 Determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC)***

La determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC) è stata effettuata utilizzando la tecnica della microdiluzione in brodo, descritta dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (**CLSI M07-A10**), utilizzando concentrazioni scalari di tobramicina da 0.125 a 128 µg/ml. Inoltre, la MIC della tobramicina è stata valutata anche in presenza della **berberina**, alla concentrazione fissa di 80 µg/ml. Il ceppo *P. aeruginosa* ATCC 27853 è stato utilizzato come controllo positivo.

### **Metodo della microdiluzione in brodo**

#### ***1. Preparazione della piastra con brodo e antibiotico***

- Inoculare 50 µl di brodo Mueller Hinton II (MHII) sterile in ciascun pozzetto della microtiter ad eccezione della prima colonna.
- Preparare una soluzione dell'antibiotico in esame ad una concentrazione doppia rispetto a quella più elevata che si vuole saggiare (256 µg/ml), diluendo la soluzione madre in brodo MHII.
- Inoculare 50 µl della soluzione di antibiotico preparata nelle prime due colonne della piastra microtiter.

- Mescolare il contenuto presente nella seconda colonna, prelevare 50  $\mu$ l e passarli nella terza colonna. Procedere allo stesso modo per le successive diluizioni fino alla penultima colonna e scartare gli ultimi 50  $\mu$ l di soluzione (l'ultima colonna non deve contenere antibiotico e serve come controllo di crescita). Al termine di questa procedura tutte le colonne contengono una concentrazione doppia di antibiotico rispetto a quella finale da saggiare, che si ottiene dopo aver aggiunto un uguale volume (50 $\mu$ l) di inoculo batterico standardizzato.

## 2. Preparazione dell'inoculo batterico

- Allestire brodo colture overnight dei ceppi da testare in brodo MH.
- Standardizzare le brodocolture in brodo MHII ad una OD (625 nm) di 0,1.
- Diluire ulteriormente l'inoculo 1:100 in brodo MHII, mescolando 10  $\mu$ l della sospensione batterica (OD = 0,1) con 990  $\mu$ l di brodo MHII.

## 3. Preparazione dell'inoculo batterico con l'aggiunta dell'inibitore

- Standardizzare le brodocolture in brodo MHII ad una OD (625 nm) di 0,1.
- Diluire ulteriormente l'inoculo in brodo MHII, (929  $\mu$ l di brodo MHII più 10  $\mu$ l di sospensione batterica), addizionato con 45  $\mu$ l di diluente

(50% DMSO, 50% ETANOLO). Infine, aggiungere alla soluzione 16  $\mu\text{g}$  di berberina.

- Ad ognuna delle righe aggiungere 50  $\mu\text{l}$  della brodocoltura, nell'ultima riga aggiungere il controllo *P. aeruginosa* ATCC27853.
- Incubare a 37° C per 24h.

Al termine dell'incubazione si determina per ogni ceppo la più bassa concentrazione di antibiotico alla quale non si osserva crescita visibile nel relativo pozzetto della piastra microtiter, questa concentrazione corrisponde alla MIC. Perché il test sia valido si deve osservare sempre crescita nella colonna priva di antibiotico e si deve verificare che il ceppo di controllo abbia una MIC che rientri nel range riportato dalle tabelle di riferimento (CLSI).

### ***1.3 Saggio di produzione biofilm***

I ceppi batterici sono stati testati per la loro capacità di produzione dei biofilm, utilizzando il protocollo descritto da Baldassari et al, 1996 opportunamente modificato.

- Allestire brodocolture overnight a 37 °C in 4 ml di LB brodo a 37° C.
- Successivamente, effettuare un subinocolo delle brodocolture dei ceppi batterici in esame in LB brodo e diluendole a O.D (600nm) di 0.1.

Inoculare poi 200  $\mu$ l di sospensione batterica in triplicato in una piastra in Polystrene da 96 pozzetti a fondo piatto.

- Incubare la piastra overnight a 37° C.
- Prelevare da ogni pozzetto 100  $\mu$ l di sospensione batterica e trasferire il contenuto in una nuova piastra da 96 pozzetti e prima di leggere i risultati allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 600 nm, aggiungere 100  $\mu$ l di LB brodo fresco.
- Togliere delicatamente il terreno rimasto dai pozzetti della piastra iniziale e eseguire 2 lavaggi con 200  $\mu$ l di acqua deionizzata senza disturbare il biofilm sul fondo dei pozzetti. Asciugare la piastra in posizione capovolta.
- Colorare i pozzetti con cristal violetto 1% per 15 minuti (200  $\mu$ l per pozzetto). Rimuovere l'eccesso di colorante lavando i pozzetti con acqua (2-3 lavaggi) ed asciugare nuovamente la piastra in posizione capovolta.
- Aggiungere 200  $\mu$ l di etanolo in ogni pozzetto e leggere di nuovo allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 570 nm (**Figura 20**).



**Figura 20.** Saggio di produzione del biofilm eseguito su piastra microtiter da 96 pozzetti.

I risultati si ottengono effettuando il rapporto il seguente rapporto:

$$\frac{O.D. \text{cristalvioletto}(570nm)}{O.D. \text{coltura liquida} (600nm)} = O.D. \text{normalizzata}$$

Calcolare la media delle 3 O.D. normalizzate del ceppo di controllo, poi dividere ogni O.D normalizzata dei vari ceppi in esame per il valore ottenuto e moltiplicare x 100, così da avere la variazione percentuale di formazione di biofilm rispetto al controllo.

#### ***1.4 Saggio di persistenza***

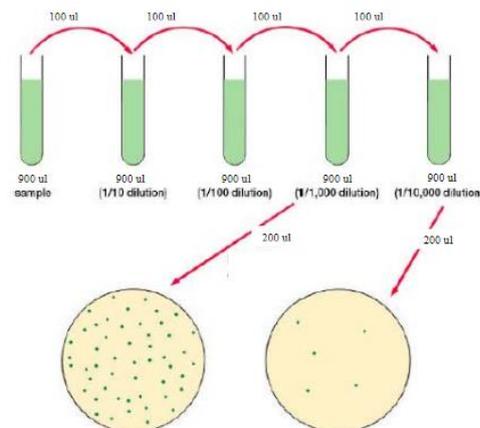
Il saggio di persistenza in esame valuta lo sviluppo di forme persistenti coltivabili, sia in presenza di una concentrazione di tobramicina 20 volte la MIC, specifica per ogni ceppo batterico, sia combinando l'antibiotico con la berberina a 80 µg/ml. L'effetto dell'antibiotico e della combinazione con l'inibitore è stato valutato tramite conta su piastra delle CFU dopo 24 ore di

trattamento (TEMPO 24) e comparato con la concentrazione batterica iniziale prima del trattamento (TEMPO 0). Tutti i ceppi sono stati testati in duplicato biologico. I ceppi in esame sono stati fatti crescere in 12 ml di LB brodo overnight a 37°C e successivamente sono state effettuate le seguenti procedure.

### TEMPO 0

1. Prelevare 1 ml della brodocoltura e centrifugare per 5 minuti a 3.3 g.
2. Eliminare il sovrantante e risospendere il pellet in 1 ml con LB brodo fresco.
3. Effettuare delle diluizioni seriali dei campioni 1:10 (**Figura 21**) con PBS;
4. Piastrare 100 µl delle soluzioni -5 e -6 su piastre di LB agar.

Il numero di unità formanti colonia (CFU/ml) è stato contato dopo 24 ore di incubazione a 37°C.



**Figura 21:** Metodo delle diluizioni seriali.

## TEMPO 24

1. Preparazione delle due condizioni di crescita (TOBRAMICINA e TOBRACINA + BERBERINA) dei ceppi:
  - 1.1 Aggiungere a 2 ml di brodocoltura la concentrazione di tobramicina 20 X MIC (tabella valori mic).
  - 1.2 Aggiungere a 2 ml di brodocoltura sia la concentrazione di tobramicina 20X MIC, sia la concentrazione fissa di berberina (80 µg/ml), con l'aggiunta di 45 µl di diluente.
2. Incubare le due soluzioni a 37 ° C per 24 ore.
3. Prelevare 1 ml delle due soluzioni e centrifugare per 5 minuti a 3.3g.
4. Eliminare il sovrnatante e risospendere il pellet con 1 ml di LB fresco.
5. Effettuare diluizione seriali 1:100 con PBS.
6. Piastrare le opportune diluzioni a seconda dell'abbattimento della carica batterica.

Il numero di unità formanti colonia (CFU/ml) è stato contato dopo 24 ore di incubazione a 37°C.

### ***1.5 Caratterizzazione genotipica della resistenza agli aminoglicosidi***

Su alcuni ceppi clinici che mostravano resistenza agli aminoglicosidi, è stato eseguito uno screening molecolare tramite saggi di PCR, per valutare la

presenza di geni codificanti per fattori di resistenza agli aminoglicosidi, diversi dalle pompe di efflusso.

È stato utilizzato il kit di estrazione “Bacterial genomic DNA Isolation Kit” fornita da Diatheva, seguendo il protocollo fornito dalla ditta e descritto di seguito:

### **1.5.1 Estrazione DNA**

La sospensione batterica per l'estrazione è stata ottenuta prelevando da piastre di LB agar una colonia del ceppo in esame in 3 ml di MHII.

#### *Fase 1: Preparazione soluzioni di lisi*

1. Trasferire 1mL di coltura batterica nelle eppendorf e centrifugare per 30 secondi a 14,000xg. Dopo la centrifuga, eliminare il sovrnatante e lasciare solo il pellet.
2. Aggiungere 250 µl di RESUSPENSION SOLUTION al pellet.
3. Aggiungere 250 µl di LYSIS SOLUTION e 12 µl di PROTEASI K e mettere i campioni nel bagnetto a 55 gradi per 30 minuti.

#### *Fase 2: Binding to column*

1. Aggiungere ai campioni 500 µl di BINDING SOLUTION.
2. Assemblare la colonnina con la provetta del kit ognuno per ogni campione e metterci 750 µl nella colonnina; centrifugare per 1 minuto a 5,200xg.

3. Dopo la centrifuga tenere la colonna e buttare via la soluzione di scarto nella provetta.
4. Aggiungere il volume iniziale rimasto e centrifugare di nuovo per 1 minuto a 5,200xg.
5. Eliminare di nuovo il contenuto della provetta e tenere la colonnina;

*Fase 3: Washing bound DNA*

1. Aggiungere alla colonna 500 µl di WASH SOLUTION e centrifugare per 1 minuto a 14,000xg;
2. Eliminare il contenuto della provetta e tenere la colonna;
3. Aggiungere di nuovo 500 µl di WASH SOLUTION e centrifugare per 1 minuto a 14,000xg;
4. Eliminare il contenuto della provetta e tenere la colonna;
5. Centrifugare per 2 min a 14,000g per eliminare l'eccesso di liquido;

*Fase 4: Eluizione DNA*

1. Assemblare la nuova colonnina mettendola in una nuova eppendorf;
2. Aggiungere 100 µl di ELUTION BUFFER e centrifugare per 1 minuto a 3,000xg e successivamente centrifugare ancora a 14,000xg per 2 minuti;

3. Buttare via la colonna e prelevare il contenuto nella provetta e trasferirla in una eppendorf per la conservazione.
4. I campioni di DNA possono essere conservati sia alla temperatura tra i 2°-8° per alcuni giorni, o a -20° per lunghi periodi.

### 1.5.2 Saggi di PCR

Sono stati effettuati saggi di PCR per la ricerca dei geni specie-specifici di *Pseudomonas aeruginosa*: *ecfX* (codificante per un fattore sigma della RNA polimerasi) e *mexY* (codificante per una delle componenti della pompa di efflusso MexXY-OprM); e dei geni codificanti per meccanismi di resistenza agli aminoglicosidi diversi dalle pompe di efflusso: *ant(2'')-Ia* (codificante per una nucleotidiltransferasi modificante l'antibiotico) e *rmtA* (codificante per una metilasi del 16s rRNA, target preferenziale degli aminoglicosidi), osservando i seguenti protocolli (**Tabella 3**). Infine, in 8 ceppi, è stata amplificata un'ulteriore porzione del gene *mexY* (long-*mexY*) per poter essere sequenziata. Il termociclatore utilizzato è "MiniAmp Plus, Thermal Cycler".

I prodotti di amplificazione sono stati verificati mediante elettroforesi in gel d'agarosio all'1,5% in TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA 1 mM, pH8), fatto migrare a una differenza di potenziale di 80v per circa un'ora.

<b>GENE TARGET</b>	<b>AMPLIFICATO</b>	<b>Seq. Nucleotidica Primers (5'→3')</b>	<b>PROGRAMMA di AMPLIFICAZIONE</b>
<i>ecfX</i> ,	145bp (Lavenir R, et al,2007)	<b>ecfX-F</b> 5'-AGCGTTCGTCTCTGCACAAGT-3' <b>ecfX-R</b> 5'-TCATCCTTCGCCTCCCTG-3'	95°C x 5min; 94°C x 30s; 61°C x 30s; 72°C x 45s; 72°C x 7min. } <b>35 cicli</b>
<i>mexY</i>	270 bp (Oh H, et al, 2003)	<b>mexY-F</b> 5'-TGGAAGTGCAGAACCGCCTG-3' <b>mexY-R</b> 5'-AGGTCAGCTTGGCCGGGTC-3'	95°C x 5 min; 94°C x 30 s; 68°C x 20 s; 72°C x 45 s; 72°C x 5 min. } <b>35 cicli</b>
<i>long-mexY</i>	588bp	<b>Y-F</b> 5'- CGTGAGCATGGACGAGATCA -3' <b>Y-R</b> 5'- ATGATGGTGATCAGGCCGAC -3'	95°C x 5min; 95°C x 30s; 57°C x 1min; 72°C x 1min; 72°C x 7min. } <b>35 cicli</b>
<i>ant (2'')-Ia</i>	500bp (Michalska AD, et al, 2014)	<b>ant2bi-F</b> 5'-GACACAACGCAGGTCACATT-3' <b>ant2bi-R</b> 5'-CGCAAGACCTCAACCTTTTC-3'	95°C x 5min; 94°C x 30s; 55°C x 45s; 72°C x 1min; 72°C x 7min. } <b>35 cicli</b>
<i>rmtA</i>	635bp (Yamane K, et al, 2004)	<b>rmtA-F</b> 5'-CTAGCGTCCATCCTTTCCTC-3' <b>rmtA-R</b> 5-'TTTGCTTCCATGCCCTTGCC-3'	95°C x 5min; 94°C x 30s; 60°C x 30s; 72°C x 45min; 72°C x 5min } <b>35 cicli</b>

**Tabella 3.** Sequenza nucleotidica dei primers utilizzati, lunghezza dell'amplificato e programma di amplificazione per ogni gene esaminato.

### 1.5.3 Purificazione

Per poter procedere al sequenziamento degli amplificati ottenuti tramite PCR sulle due regioni del gene *mexY*, alcuni campioni sono stati sottoposti a purificazione utilizzando il kit GenElute PCR CLEAN-UP, fornito da Sigma, secondo il seguente protocollo.

1. Inserire le colonnine nelle eppendorf e aggiungere 500 µl di soluzione Preparation Solution, centrifugare a 12.000g per 1 minuto;
2. Eliminare l'eluato e aggiungere la Binding Solution e il prodotto della PCR in rapporto 5:1. Mettere i due componenti nella colonnina e centrifugare a 16.000xg per 1,5 minuti;
3. Eliminare l'eluato e mantenere la colonnina;
4. Aggiungere 500 µl di soluzione Wash Solution e centrifugare a 16.000xg per 1, 5 minuti;
5. Eliminare l'eluato e mantenere la colonnina;
6. Centrifugare ulteriormente per 2,5 minuti;
7. Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf e aggiungere 500 µl di Elution Solution. Attendere 1 minuto a temperatura ambiente ed infine centrifugare per 1 minuto a 16.000xg.

Il campione è pronto per la conservazione.

#### **1.5.4 Sequenziamento**

Il sequenziamento dei campioni in esame è stato effettuato tramite BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing kit e le sequenze sono state analizzate tramite ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Le sequenze ottenute sono state comparate alla sequenza del gene *mexY* del ceppo di controllo *P. aeruginosa* PA01. Le sequenze sono state allineate tramite clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

## RISULTATI

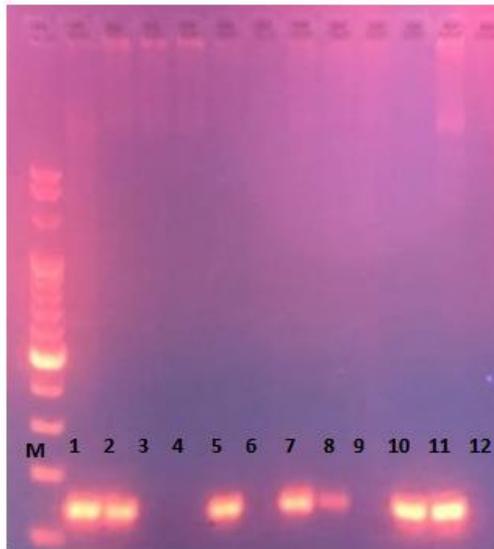
### 1.1 Caratterizzazione genotipica

La caratterizzazione genotipica dei ceppi NC01-10 è stata eseguita mediante PCR per i geni *ecfX*, *mexY*, *ant(2'')-Ia* e *rmtA*. Innanzitutto, al fine di appurare che i ceppi risultino appartenenti alla specie *Pseudomonas aeruginosa*, è stata inizialmente valutata la presenza del gene specie-specifico *ecfX* (Figura 22) e, per i ceppi risultati negativi, è stato ricercato il gene *mexY* (Figura 23).

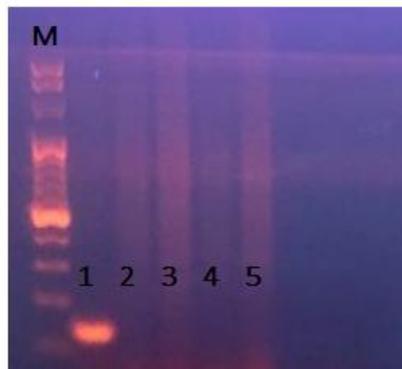
Solo il ceppo NC02 è risultato negativo per *ecfX* e positivo per *mexY* (Tabella 4).

<b>CEPPO</b>	<b><i>ecfX</i></b>	<b><i>mexY</i></b>
NC01	+	
NC02	-	+
NC03	-	-
NC04	+	
NC05	-	-
NC06	+	
NC07	-	-
NC08	-	-
NC09	+	
NC10	+	

*Tabella 4 : Risultati della PCR per la ricerca dei gene *ecfX* e *mexY**



**Figura 22.** Elettroforesi su gel di agarosio degli amplificati relativi al gene *ecfX*: M (Marker, 100bp ladder), 1 (controllo positivo, PA01), 2 (NC01), 3 (NC02), 4 (NCO3), 5 (NC04), 6 (NC05), 7 (NC06), 8 (NC07), 9 (NCO8), 10 (NC09), 11(NC10), 12 (controllo negativo acqua MQ).

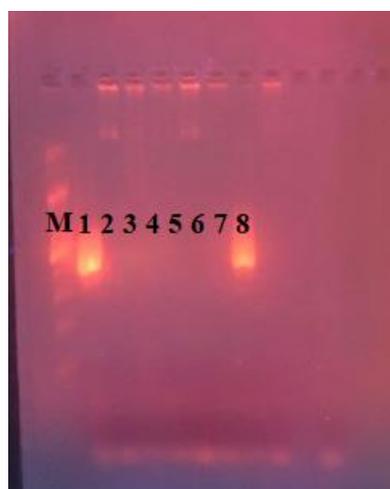


**Figura 23:** Elettroforesi su gel di agarosio degli amplificati relativi al gene *mexY*: M (Marker, 100bp ladder), 1 (NC02), 2 (NC03), 3 (NC05), 4 (NC07), 5 (NC08).

Successivamente, sui ceppi risultati positivi almeno a *ecfx* o *mexY*, è stata valutata la presenza dei geni *ant(2'')-Ia* e *rmtA*. Tutti i ceppi testati sono risultati negativi ad entrambi i geni ad eccezione di NC09, risultato positivo per *ant(2'')-Ia* (Tabella 5) (Figura 24).

<b>CEPPO</b>	<b><i>ant(2'')-Ia</i></b>	<b><i>rmtA</i></b>
<b>NC01</b>	-	-
<b>NC02</b>	-	-
<b>NC04</b>	-	-
<b>NC06</b>	-	-
<b>NC09</b>	+	-
<b>NC10</b>	-	-

**Tabella 5.** Risultati della PCR per la ricerca di geni *ant(2'')-Ia* e *rmtA*..



**Figura 24:** Elettroforesi su gel di agarosio degli amplificati relativi al gene *ant(2'')-*

*Ia*: M(Marker, 100bp ladder), 1(AR86), 2 (NC01), 3 (NC02), 4 (NC04), 5 (NC06),

6(NC10), 7 ( Controllo negativo), 8 (NC09). .

## 1.2 Caratterizzazione fenotipica della resistenza agli aminoglicosidi

Il test di MIC alla tobramicina e alla combinazione tobramicina-berberina 80 µg/ml è stato eseguito sui 5 ceppi clinici di *P. aeruginosa* NC01, NC02, NC04, NC06, NC10, in quanto sui ceppi restanti era stato già precedentemente eseguito (Laudadio et.al). La **Tabella 6** mostra i valori di MIC. Il ceppo *P. aeruginosa* ATCC 27853 è stato utilizzato come ceppo di controllo.

<b>CEPPO</b>	<b>MIC(µg/ml)</b>	
	<b>TOBRAMICINA</b>	<b>TOBRA+BERBERINA</b>
<b>NC01</b>	<b>16</b>	<b>8</b>
<b>NC02</b>	<b>32</b>	<b>16</b>
<b>NC04</b>	<b>0.5</b>	<b>0</b>
<b>NC06</b>	<b>2</b>	<b>0.5</b>
<b>NC10</b>	<b>1</b>	<b>0.125</b>

**Tabella 6.** Valori di MIC con tobramicina e tobramicina più berberina. Tobramicina breakpoints per *Pseudomonas aeruginosa*: S <4 µg/mL, I= 8 µg/mL, R >16 µg/mL.

Dei 5 ceppi testati:

- 2 ceppi (40%) sono risultati RESISTENTI alla tobramicina;
- 3 ceppi (60%) sono risultati SENSIBILI alla tobramicina.

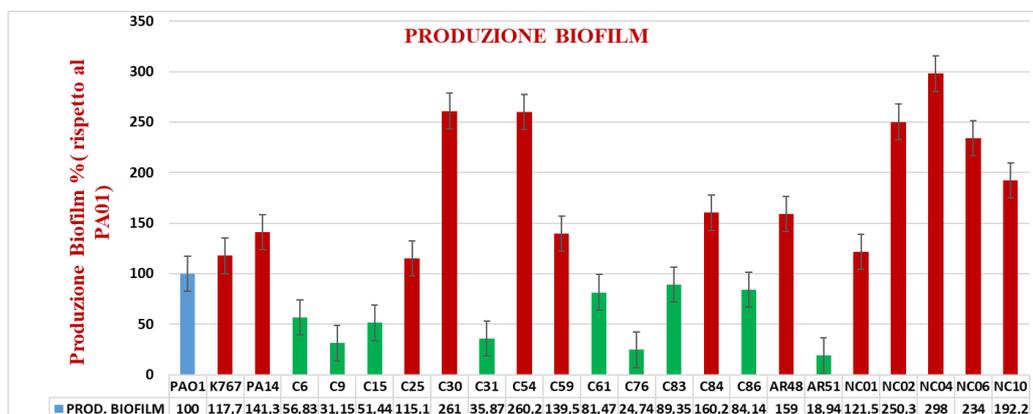
Interessante è notare la diminuzione del valore di MIC in presenza della berberina. In particolare:

- Su 3 ceppi (60%) si osserva un calo di valore di MIC  $\geq$  a 2 diluizioni;  
Su 2 ceppi (40 %) si osserva un calo di una diluizione.

### 1.3 Saggio di produzione biofilm

La produzione di biofilm eseguita su 23 ceppi di *P. aeruginosa* è stata valutata tramite il test del cristal violetto. La quantificazione è stata calcolata come percentuale rispetto al ceppo di laboratorio PA01. La **Figura 25** riporta i valori della produzione media di biofilm e la deviazione standard per ogni ceppo analizzato. Dei 24 ceppi analizzati (PA01 controllo), i 23 ceppi rimanenti hanno prodotto rispettivamente:

- 60,87% (14 ceppi) hanno avuto una produzione maggiore di biofilm rispetto a PA01;
- 39,13% (9 ceppi) hanno avuto una produzione minore di biofilm rispetto a PA01.



**Figura 25:** Produzione di biofilm: in rosso sono mostrati i ceppi che hanno mostrato una produzione di biofilm maggiore del controllo, mentre in verde i ceppi che hanno mostrato una produzione di biofilm minore del PA01.

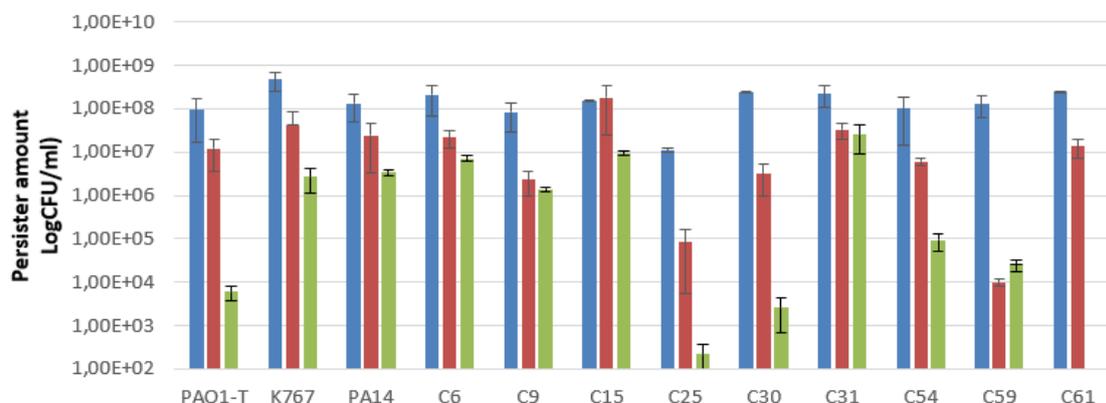
### 1.4 Saggio di persistenza

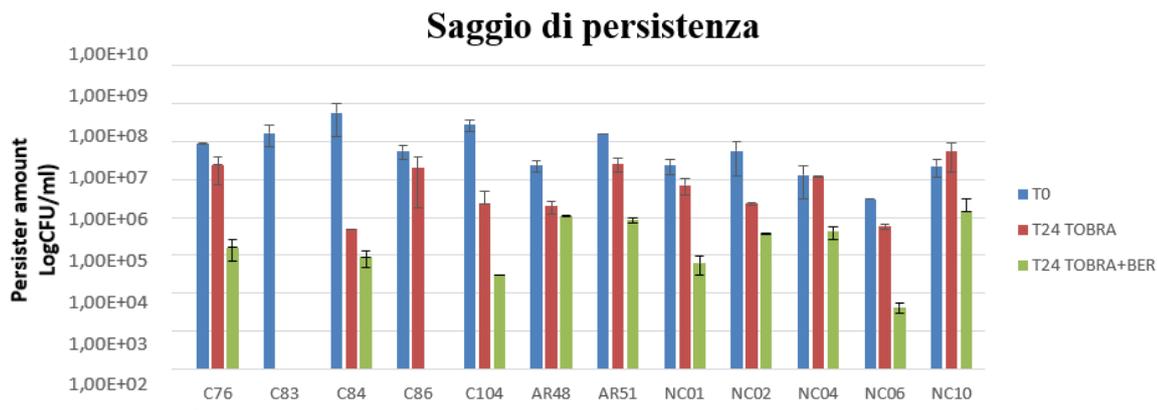
Nel saggio di persistenza alla tobramicina, i ceppi sono stati fatti crescere in LB broth overnight, e sottoposti per 24h ad una concentrazione 20X MIC di tobramicina addizionata o meno con berberina 80 µg/ml. La presenza di cellule persistenti è stata valutata a due tempi di esposizione, 0 e 24 ore. Dei ventiquattro ceppi:

- 17 ceppi batterici (70.83 %) riducono la **PERSISTENZA** ( $\geq 1$  log);
- 7 ceppi (29,17%) **NON** riducono la **PERSISTENZA** ( $< 1$  log);

In particolare, su 2 ceppi (8,3%) si può osservare un completo abbattimento delle cellule batteriche; nello specifico in C83 non c'è stata la produzione di persister anche quando le cellule batteriche sono state trattate solo con la tobramicina, mentre in C86 l'abbattimento cellulare si è verificato con la combinazione tobramicina-berberina. La **Figura 26** mostra i risultati totali.

#### Saggio di persistenza





*Figura 26. Saggio di persistenza sia in presenza di tobramicina sia combinando tobramicina-berberina.*

CEPPO	T0	T24 TOBRA	T24 TOBRA+Be	CEPPO	T0	T24 TOBRA	T24 TOBRA+Be
PAOI-T	9,50E+07	1,20E+07	6,10E+03	C83	1,71E+08	0,00E+00	0,00E+00
K767	4,70E+08	4,11E+07	2,71E+06	C84	5,70E+08	5,00E+05	9,00E+04
PA14	1,31E+08	2,45E+07	3,38E+06	C86	5,70E+07	2,01E+07	0,00E+00
C6	2,10E+08	2,18E+07	7,15E+06	C104	2,79E+08	2,31E+06	3,00E+04
C9	8,25E+07	2,28E+06	1,38E+06	AR48	2,40E+07	1,98E+06	1,07E+06
C15	1,56E+08	1,84E+08	9,45E+06	AR51	1,63E+08	2,53E+07	8,40E+05
C25	1,10E+07	8,41E+04	2,15E+02	NC01	2,30E+07	7,17E+06	6,17E+04
C30	2,41E+08	3,09E+06	2,53E+03	NC02	5,80E+07	2,27E+06	3,74E+05
C31	2,20E+08	3,34E+07	2,56E+07	NC04	1,30E+07	1,16E+07	4,15E+05
C54	1,03E+08	6,09E+06	9,33E+04	NC06	3,00E+06	5,67E+05	4,27E+03
C59	1,31E+08	9,82E+03	2,55E+04	NC10	2,25E+07	5,40E+07	1,43E+06
C61	2,42E+08	1,38E+07	0,00E+00	C76	9,05E+07	2,42E+07	1,63E+05

**Tabella 7.** Valori di persisters (CFU/ml) in seguito al trattamento con tobramicina (in blu) 20XMIC e tobramicina-Be (in verde) dopo 24 h di incubazione confrontate con il tempo o (in rosso)

### ***1.5 Sequenziamento e allineamento di mexY***

Sono state selezionate due sequenze interne del gene mexY, rispettivamente di 270 e 588 bp di 8 ceppi scelti in base al loro comportamento nei confronti della berberina, considerando che, sulla base di indagini preliminari in silico le corrispondenti sequenze di aminoacidi potrebbero essere coinvolte nel legame con la berberina. Sono stati amplificati, sequenziati e allineati con le corrispondenti sequenze di *P. aeruginosa* PAO1. Sono state osservate un piccolo numero di mutazioni puntiformi (**Figura 27- Figura 28**).

*mexY* (270 bp)

PA01	TGGAAGTGCAGAACCGCCTGAAGATCGTTCGAGTCGCGCCTGCCCGAATCGGTGCGGGCGCG	60
C59	-----CTACGTCGGTCGCGCCTGCCCGAATCGGTGCGGGCGCG	37
C84	-----TGTACGTCGGTCGCGCCTGCCCGAATCGGTGCGGGCGCG	38
C25	-----TGTACGTCGGTCGCGCCTGCCCGAATCGGTGCGGGCGCG	38
C31	-----CGTACTCGGTGCGCGCCTGCCCGATCGGTGCGGGCGCG	36
AR48	-----CGTACGTCGATCGCGCCTGCTCCGATCGGTGCGGGCGCG	38
C54	-----GGTACGTCGATCGC-GCCTGCCCGATCGGTGCGGGCGCG	37
C30	-----CGTACGTCGATCGC-GCCTGCCCGATCGGTGCGGGCGCG	37
NC06	-----CGTACGTCGATCGC-GCCTGCCCGATCGGTGCGGGCGCG	37
	* * *****	
PA01	ACGGCATCTACGTGGAGAAGGCGGGACAGCATCCAGCTGATCGTTACCCTTACCTCCT	120
C59	ACGGCATCTACGTGGAGAAGGCGGGACAGCATCCAGCTGATCGTTACCCTTACCTCCT	97
C84	ACGGCATCTACGTGGAGAAGGCGGGACAGCATCCAGCTGATCGTTACCCTTACCTCCT	98
C25	ACGGCATCTACGTGGAGAAGGCGGGACAGCATCCAACTGATCGTTACCCTTACCTCCT	98
C31	ACGGCATCTATGTGGAGAAGGCGGGACAGCATCCAACTGATCGTCACCCTTACCTCCT	96
AR48	ACGGCATCTATGTGGAGAAGGCGGGACAGCATCCAACTGATCGTCACCCTTACCTCCT	98
C54	ACGGCATCTACGTGGAGAAGGCGGGACAGCATCCAGCTGATCGTTACCCTTACCTCCT	97
C30	ACGGCATCTATGTGGAGAAGGCGGGACAGCATCCAACTGATCGTCACCCTTACCTCCT	97
NC06	ACGGCATCTATGTGGAGAAGGCGGGACAGCATCCAGCTGATCGTCACCCTTACCTCCT	97
	*****	
PA01	CCAGCGGCCGCTACGACGCCATGGAGCTGGGCGAGATCGCCTCGTCCAACGTGTTGCAGG	180
C59	CCAGCGGCCGCTACGACGCCATGGAGCTGGGCGAGATCGCCTCGTCCAACGTGTTGCAGG	157
C84	CCAGCGGCCGCTACGACGCCATGGAGCTGGGCGAGATCGCCTCGTCCAACGTGTTGCAGG	158
C25	CCAGCGGCCGCTACGACGCCATGGAGCTGGGCGAGATCGCCTCGTCCAACGTGTTGCAGG	158
C31	CCAGCGGCCGCTACGACGCCATGGAGCTGGGCGAGATCGCCTCGTCCAACGTGTTGCAGG	156
AR48	CCAGCGGCCGCTACGACGCCATGGAGCTGGGCGAGATCGCCTCGTCCAACGTGTTGCAGG	158
C54	CCAGCGGCCGCTACGACGCCATGGAGCTGGGCGAGATCGCCTCGTCCAACGTGTTGCAGG	157
C30	CCAGCGGCCGCTACGACGCCATGGAGCTGGGCGAGATCGCCTCGTCCAACGTGTTGCAGG	157
NC06	CCAGCGGCCGCTACGACGCCATGGAAGTGGGCGAGATCGCCTCGTCCAACGTGTTGCAGG	157
	*****	
PA01	CGCTGCGCCGGGTGGAGGGCGTGGGCAAGGTCGAGACCTGGGGCGCCGAGTACGCCATGC	240
C59	CGCTGCGCCGGGTGGAGGGCGTGGGCAAGGTCGAGACCTGGGGCGCCGAGTACGCCATGC	217
C84	CGCTGCGCCGGGTGGAGGGCGTGGGCAAGGTCGAGACCTGGGGCGCCGAGTACGCCATGC	218
C25	CGCTGCGCCGGGTGGAGGGCGTGGGCAAGGTCGAGACCTGGGGCGCCGAGTACGCCATGC	218
C31	CGCTGCGCCGGGTGGAGGGCGTGGGCAAGGTCGAGACCTGGGGCGCCGAGTACGCCATGC	216
AR48	CGCTGCGCCGGGTGGAGGGCGTGGGCAAGGTCGAGACCTGGGGCGCCGAGTACGCCATGC	218
C54	CGCTGCGCCGGGTGGAGGGCGTGGGCAAGGTCGAGACCTGGGGCGCCGAGTACGCCATGC	217
C30	CGCTGCGCCGGGTGGAGGGCGTGGGCAAGGTCGAGACCTGGGGCGCCGAGTACGCCATGC	217
NC06	CGCTGCGCCGGGTGGAGGGCGTGGGCAAGGTCGAGACCTGGGGCGCCGAGTACGCCATGC	217
	*****	
PA01	GCATCTGGCCCGACCCGGCCAGCTGACCT	270
C59	GCATCTGGCCCGACCCGGCCAGCTGACCTA	247
C84	GCATCTGGCCCGACCCGGCCAGCTGACCTA	248
C25	GCATCTGGCCCGACCCGGCCAGCTGACCTA	248
C31	GCATCTGGCCCGACCCGGCCAGCTGACCTA	246
AR48	GCATCTGGCCCGACCCGGCCAGCTGACCTA	248
C54	GCATCTGGCCCGACCCGGCCAGCTGACCTA	247
C30	GCATCTGGCCCGACCCGGCCAGCTGACCTA	247
NC06	GCATCTGGCCCGACCCGGCCAGCTGACCTA	247
	***** *	

**Figura 27.** Allineamento delle sequenze del gene *mexY* con le sequenze del PA01 (regione amplificata 270 bp).

**Long *mexY* (588 bp)**

PA01	CGTGAGCATGGACGAGATCAACACCACCTGGCGGTGATGTTCCGGCTCGGACTACATCGG	60
C30	-----CCCTGGCGGTGATGTTCCGGCTCGGACTACATCGG	33
C59	-----CCCTGGCGGTGATGTTCCGGCTCGGACTACATCGG	34
C25	-----CCCCCTGGCGGTGATGTTCCGGCTCGGACTACATCGG	37
C54	-----CCCTGGCGGTGATGTTCCGGCTCGGACTACATCGG	34
C84	-----CCCTGGCGGTGATGTTCCGGCTCGGACTACATCGG	33
NC06	-----GCGGTGATGTTCCGGCTCGGACTACATCGG	29
AR48	-----CCTGGCGGTGATGTTCCGGCTCGGACTACATCGG	33
C31	-----CCCTGGCGGTGATGTTCCGGCTCGGACTACATCGG	34
	*****	
PA01	CGACTTCATGCACGGCAGCCAGGTGCGCAAGGTGGTGGTCCAGGCCGACGGCGCAAGCG	120
C30	CGACTTCATGCACGGCAGCCAGGTGCGCAAGGTGGTGGTCCAGGCCGACGGCGCAAGCG	93
C59	CGACTTCATGCACGGCAGCCAGGTGCGCAAGGTGGTGGTCCAGGCCGACGGCGCAAGCG	94
C25	CGACTTCATGCACGGCAGCCAGGTGCGCAAGGTGGTGGTCCAGGCCGACGGCGCAAGCG	97
C54	CGACTTCATGCACGGCAGCCAGGTGCGCAAGGTGGTGGTCCAGGCCGACGGCGCAAGCG	94
C84	CGACTTCATGCACGGCAGCCAGGTGCGCAAGGTGGTGGTCCAGGCCGACGGCGCAAGCG	93
NC06	CGACTTCATGCACGGCAGCCAGGTGCGCAAGGTGGTGGTCCAGGCCGACGGCGCAAGCG	89
AR48	CGACTTCATGCACGGCAGCCAGGTGCGCAAGGTGGTGGTCCAGGCCGACGGCGCAAGCG	93
C31	CGACTTCATGCACGGCAGCCAGGTGCGCAAGGTGGTGGTCCAGGCCGACGGCGCAAGCG	94
	***** * *****	
PA01	CCTGGGCATCGACGACATCGGCCGGCTTCACGTGCGCAACGAGCAGGGCGAGATGGGTGC	180
C30	CCTGGGCATCGACGACATCGGCCGGCTTCACGTGCGCAACGAGCAGGGCGAGATG-GTCC	152
C59	CCTGGGCATCGACGACATCGGCCGGCTTCACGTGCGCAACGAGCAGGGCGAGATG-GTCC	153
C25	CCTGGGCATCGACGACATCGGCCGGCTTCACGTGCGCAACGAGCAGGGCGAGATG-GTGC	156
C54	CCTGGGCATCGACGACATCGGCCGGCTTCACGTGCGCAACGAGCAGGGCGAGATG-GTGC	153
C84	CCTGGGCATCGACGACATCGGCCGGCTTCACGTGCGCAACGAGCAGGGCGAGATG-GTGC	152
NC06	CCTGGGCATCGACGACATCGGCCGGCTTCACGTGCGCAACGAGCAGGGCGAGATG-GTCC	148
AR48	CCTGGGCATCGACGACATCGGCCGGCTTCACGTGCGCAACGAGCAGGGCGAGATG-GTCC	152
C31	CCTGGGCATCGACGACATCGGCCGGCTTCACGTGCGCAACGAGCAGGGCGAGATG-GTCC	153
	***** ** *	
PA01	CGCTGGCGACGTTTCGCAAGGCCGCTGGACCCTCGGCCCGCCGCAACTGACCCGCTACA	240
C30	CGCTGGCGACGTTTCGCAAGGCCGCTGGACCCTCGGCCCGCCGCAACTGACCCGCTACA	212
C59	CGCTGGCGACGTTTCGCAAGGCCGCTGGACCCTCGGCCCGCCGCAACTGACCCGCTACA	213
C25	CGCTGGCGACGTTTCGCAAGGCCGCTGGACCCTCGGCCCGCCGCAACTGACCCGCTACA	216
C54	CGCTGGCGACGTTTCGCAAGGCCGCTGGACCCTCGGCCCGCCGCAACTGACCCGCTACA	213
C84	CGCTGGCGACGTTTCGCAAGGCCGCTGGACCCTCGGCCCGCCGCAACTGACCCGCTACA	212
NC06	CGCTGGCGACGTTTCGCAAGGCCGCTGGACCCTCGGCCCGCCGCAACTGACCCGCTACA	208
AR48	CGCTGGCGACGTTTCGCAAGGCCGCTGGACCCTCGGCCCGCCGCAACTGACCCGCTACA	212
C31	CGCTGGCGACGTTTCGCAAGGCCGCTGGACCCTCGGCCCGCCGCAACTGACCCGCTACA	213
	*****	
PA01	ACGGCTATCCCTCGTTC AACCTCGAGGGCCAGGCCGCGCCGGGCTACAGCAGCGGCAAG-	299
C30	ACGGCTATCCCTCGTTC AACCTCGAGGGCCAGGCCGCGCCGGGCTACAGCAGCGGCAAG	272
C59	ACGGCTATCCCTCGTTC AACCTCGAGGGCCAGGCCGCGCCGGGCTACAGCAGCGGCAAG	273
C25	ACGGCTATCCCTCGTTC AACCTCGAGGGCCAGGCCGCGCCGGGCTACAGCAGCGGCAAG	276
C54	ACGGCTATCCCTCGTTC AACCTCGAGGGCCAGGCCGCGCCGGGCTACAGCAGCGGCAAG	273
C84	ACGGCTATCCCTCGTTC AACCTCGAGGGCCAGGCCGCGCCGGGCTACAGCAGCGGCAAG	272
NC06	ACGGCTATCCCTCGTTC AACCTCGAGGGCCAGGCCGCGCCGGGCTACAGCAGCGGCAAG	268
AR48	ACGGCTATCCCTCGTTC AACCTCGAGGGCCAGGCCGCGCCGGGCTACAGCAGCGGCAAG	272
C31	ACGGCTATCCCTCGTTC AACCTCGAGGGCCAGGCCGCGCCGGGCTACAGCAGCGGCAAG	273
	***** *	

```

PA01      CCATGCAGGCGATGGAGCAATTGATGCAGGGAAGTCCCCGAGGCATTGCGCCACGAGTGG  359
C30       CCATGCAGGCGATGGAGGAATTGATGCA-GGGCCTGCCCGAGGGCATCGCCACGAGTGG  331
C59       CCATGCAGGCGATGGAGGAATTGATGCA-GGGCCTGCCCGAGGGCATCGCCACGAGTGG  332
C25       CCATGCAGGCGATGGAGGAATTGATGCA-GGGCCTGCCCGAGGGCATCGCCACGAGTGG  335
C54       CCATGCAGGCGATGGAGCAATTGATGCA-GGGACTGCCCGAGGGCATCGCCACGAGTGG  332
C84       CCATGCAGGCGATGGAGGAATTGATGCA-GGGCCTGCCCGAGGGCATCGCCACGAGTGG  331
NC06     CCATGCAGGCGATGGAGCAATTGATGCA-GGGCCTGCCCGAGGGCATCGCCACGAGTGG  327
AR48     CCATGCAGGCGATGGAGGAATTGATGCA-GGGCCTGCCCGAGGGCATCGCCACGAGTGG  331
C31       CCATGCAGGCGATGGAGGAATTGATGCA-GGGCCTGCCCGAGGGCATCGCCACGAGTGG  332
*****

PA01      TCCGGCCAGTCCTTTCGAAGAACGCCTGTTGCCGGCGCCAGGCGCCGGCGCTGTTCCGCC  419
C30       TCCGGCCAGTCCTTTCGAAGAACGCCTGTC--CGGCGCCAGGCGCCGGCGCTGTTCCGCC  389
C59       TCCGGCCAGTCCTTTCGAAGAACGCCTGTC--CGGCGCCAGGCGCCGGCGCTGTTCCGCC  390
C25       TCCGGCCAGTCCTTTCGAAGAACGCCTGTC--CGGCGCCAGGCGCCGGCGCTGTTCCGCC  393
C54       TCCGGCCAGTCCTTTCGAAGAACGCCTGTC--CGGCGCCAGGCGCCGGCGCTGTTCCGCC  390
C84       TCCGGCCAGTCCTTTCGAAGAACGCCTGTC--CGGCGCCAGGCGCCGGCGCTGTTCCGCC  389
NC06     TCCGGCCAGTCCTTTCGAAGAACGCCTGTC--CGGCGCCAGGCGCCGGCGCTGTTCCGCC  385
AR48     TCCGGCCAGTCCTTTCGAAGAACGCCTGTC--CGGCGCCAGGCGCCGGCGCTGTTCCGCC  389
C31       TCCGGCCAGTCCTTTCGAAGAACGCCTGTC--CGGCGCCAGGCGCCGGCGCTGTTCCGCC  390
*****

PA01      TCTCGGTGTTGATCGTGTTCCTCGCCCTGGCCGCCCTCTACGAAAGCTGGTTCGATCCCGC  479
C30       TCTCGGTGTTGATCGTGTTCCTCGCCCTGGCCGCCCTCTACGAAAGCTGGTTCGATCCCGC  449
C59       TCTCGGTGTTGATCGTGTTCCTCGCCCTGGCCGCCCTCTACGAAAGCTGGTTCGATCCCGC  450
C25       TCTCGGTGTTGATCGTGTTCCTCGCCCTGGCCGCCCTCTACGAAAGCTGGTTCGATCCCGC  453
C54       TCTCGGTGTTGATCGTGTTCCTCGCCCTGGCCGCCCTCTACGAAAGCTGGTTCGATCCCGC  450
C84       TCTCGGTGTTGATCGTGTTCCTCGCCCTGGCCGCCCTCTACGAAAGCTGGTTCGATCCCGC  449
NC06     TCTCGGTGTTGATCGTGTTCCTCGCCCTGGCCGCCCTCTACGAAAGCTGGTTCGATCCCGC  445
AR48     TCTCGGTGTTGATCGTGTTCCTCGCCCTGGCCGCCCTCTACGAAAGCTGGTTCGATCCCGC  449
C31       TCTCGGTGTTGATCGTGTTCCTCGCCCTGGCCGCCCTCTACGAAAGCTGGTTCGATCCCGC  450
*****

PA01      TGGCGGTGATCCTGGTGGTGCCGCTGGGCGTACTCGGCGCACTGCTCGGGGTGAGCCTGC  539
C30       TGGCGGTGATCCTGGTGGTGCCGCTGGGCGTACTCGGCGCAGCTGCACGGGAGTGA----  505
C59       TGGCGGTGATCCTGGTGGTGCCGCTGGGCGTACTCGGCGCACTGCTCGGGGTGAGCCTGC  510
C25       TGGCGGTGATCCTGGTGGTGCCGCTGGGCGTACTCGGCGCACTGCTCGGGGTGAGCCTGC  513
C54       TGGCGGTGATCCTGGTGGTGCCGCTGGGCGTACTCGGCGCACTGCTCGGGGTGAGCCTGC  510
C84       TGGCGGTGATCCTGGTGGTGCCGCTGGGCGTACTCGGCGCACTGCTCGGGGTGAGCCTGC  509
NC06     TGGCGGTGATCCTGGTGGTGCCGCTGGGCGTACTCGGCGCACTGCTCGGGGTGAGCCTGC  505
AR48     TGGCGGTGATCCTGGTGGTGCCGCTGGGCGTACTCGGCGCACTGCTCGGGGTGAGCCTGC  509
C31       TGGCGGTGATCCTGGTGGTGCCGCTGGGCGTACTCGGCGCACTGCTCGGGGTGAGCCTGC  510
*****

PA01      GCGGTCTGCCCAACGACATCTACTTCAAGGTCGGCCTGATCACCATCATCGGCCTCTCGG  599
C30       -----  505
C59       GCG-----  513
C25       GCGG-----  517
C54       GCGGTCTG-----  518
C84       GCGGTCTGCCCAACGA-----  525
NC06     GCGGCCTGCCCAACGA-----  521
AR48     GCGGTCTGCCCAACGAC-----  526
C31       GCGGT-----  515

```

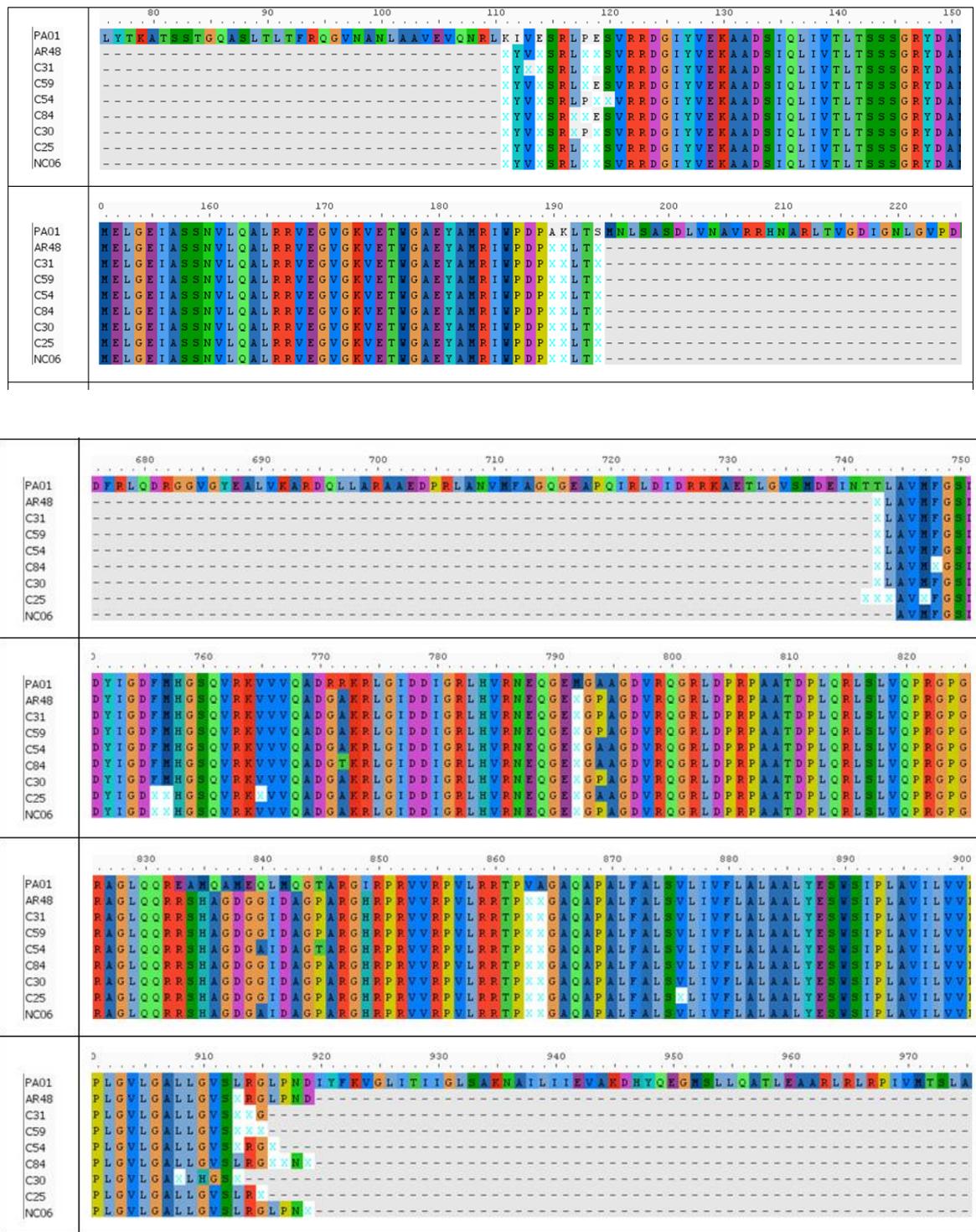
**Figura 28.** Allineamento delle sequenze del gene *mexY* con le sequenze del PA01 (regione amplificata 588 bp).

L'allineamento ha mostrato sei SNP nella sequenza di 270 bp (sequenza 1) e di 27 SNP nella sequenza di 588 bp (sequenza 2), che sono specificati di seguito.

**Sequenza 1:** c.71C> T, c.80G> A, c.98G> A, c.107T> C, c.113T> C, c.146G> A;

**Sequenza 2:** c.110C> G, c.112G> C, c.113C> G / A, c.114G> C, c.179G> C, c.294C> G, c.295G> C, c.296A > G, c.298G> A, c.317C> G, c.331A> G, c.332A> C, c.343C> G, c.344A> C, c.345T> A, c.388T> C , c.428T> C, c.451C> G, c.511A> G, c.521C> G, c.522T> C, c.523G> T, c.524G> C, c.525T> C, c.526C> A, c.527G> C e c.531T> A.

I ceppi CF *P. aeruginosa* C30, C31, AR48 e NC06, hanno riportato il numero più alto di SNP in entrambe le sequenze. L'analisi dell'allineamento della loro sequenza di aminoacidi (**Figura 29**), effettuata dal gruppo di Modeling Biomolecolare della Professoressa Roberta Galeazzi, ha confermato che le sequenze investigate potrebbero essere coinvolte in un polimorfismo di MexY, poiché la struttura 3D recuperata della pompa e il modello *in silico* ha mostrato che le sequenze mutate potrebbero essere coinvolto nei siti di legame della berberina.



**Figura 29.** Allineamento sequenze amminoacidiche dei ceppi in esami con il ceppo di *P.aeruginosa* PA01.

Un numero maggiore di sostituzioni è stato rilevato nella **sequenza 2** rispetto alla **sequenza 1**, che mostrava solo la mutazione I112Y, condivisa da tutti i ceppi analizzati. La **Tabella 8** mostra le sostituzioni amminoacidiche dei ceppi in esame.

<b>BACTERIAL STRAIN</b>	<b>AMINO ACID SUBSTITUTIONS</b>
<i>P. aeruginosa</i> C25 (CF)	R771G, R772A, E833R, A834S, M835H, Q836A, A837G, M838D, E839G, Q840G, L841I, M842D, Q843A, T845P, I849H,
<i>P. aeruginosa</i> C30 (CF)	R771G, R772A, A794P, E833R, A834S, M835H, Q836A, A837G, M838D, E839G, Q840G, L841I, M842D, Q843A, T845P, I849H, L908A, L909A, G910H, V911G
<i>P. aeruginosa</i> C31(CF)	R771G, R772A, A794P, E833R, A834S, M835H, Q836A, A837G, M838D, E839G, Q840G, L841I, M842D, Q843A, T845P, I849H,
<i>P. aeruginosa</i> C54(C)	R771G, R772A, E833R, A834S, M835H, Q836A, A837G, M838D, E839G, Q840A, L841I, M842D, Q843A, I849H,
<i>P. aeruginosa</i> C59(C)	R771G, R772A, A794P, E833R, A834S, M835H, Q836A, A837G, M838D, E839G, Q840G, L841I, M842D, Q843A, T845P, I849H,

<b><i>P. aeruginosa</i> C84(C)</b>	R771G, R772T, E833R, A834S, M835H, Q836A, A837G, M838D, E839G, Q840G, L841I, M842D, Q843A, T845P, I849H,
<b><i>P. aeruginosa</i> AR48(CF)</b>	R771G, R772A, A794P, E833R, A834S, M835H, Q836A, A837G, M838D, E839G, Q840G, L841I, M842D, Q843A, T845P, I849H,
<b><i>P. aeruginosa</i> NC06(CF)</b>	R771G, R772A, A794P, E833R, A834S, M835H, Q836A, A837G, M838D, E839G, Q840A, L841I, M842D, Q843A, T845P, I849H,

**Tabella 8.** Sostituzioni specifiche di aminoacidi in 8 ceppi di *P. aeruginosa* CF e clinici (C).

Nella sequenza 2 sono state trovate un totale di 22 sostituzioni, rilevate in modo variabile nei diversi ceppi. Di questi, dodici (R771G, E833R, A834S, M835H, Q836A, A837G, M838D, E839G, L841I, M842D, Q843A e I849H) erano comuni a tutti i ceppi; T845P era comune a tutti i ceppi ad eccezione di C54; R772A è stato rilevato in sette ceppi; Q840G e A794P rispettivamente in sei e cinque ceppi; Q840A in due ceppi; R772T, L908A, L909A, G910H e V911G in un solo ceppo.

## 1.6 Docking molecolare

Per ottenere maggiori approfondimenti tra le modalità di legame della berberina in diversi ceppi di *P. aeruginosa* e il diverso comportamento degli isolati nei confronti dell'inibitore è stato utilizzato un approccio di docking molecolare, effettuato dal gruppo di lavoro Modeling Biomolecolare della Professoressa Roberta Galeazzi. Pertanto, sono state considerate le strutture MexY relative ai ceppi *P. aeruginosa* C30 (in cui è stata osservata una ridotta persistenza), AR48 (in cui è stata trovata una MIC ridotta) e C25 (che hanno mostrato una riduzione sia della resistenza che della persistenza). La struttura della subunità MexY dei tre ceppi è stata ricostruita utilizzando come template la struttura del *P. aeruginosa* PA01. In tutti e tre i modelli, sono stati individuati due siti di legame per la berberina: la fessura periplasmatica (**sito 1**) e il sito legante l'antibiotico (**sito 2**). Considerando il **SITO 2** in tutti e tre i modelli abbiamo riscontrato elevate affinità di legame (**Tabella 9**).

<b>CEPPO</b>	<b>ENERGIA LIBERA, <math>\Delta G_{bind}</math> (kJ/mol)</b>
<b>C25</b>	$E_b = -8.05$ kcal/mol
<b>C30</b>	$E_b = -8.02$ kcal/mol
<b>AR48</b>	$E_b = -7.31$ kcal/mol

**Tabella 9.** Valori di energia libera di legame della berberina nel **Sito 2**.

La posa di legame della berberina era la stessa per entrambe le strutture MexY C25 e C30. È stato osservato un comportamento diverso di AR48, con una posa di legame leggermente diversa rispetto alle due precedenti.

Considerando il **SITO 1** la **Tabella 10** mostra i valori di energia libera di legame per i tre ceppi.

<b>CEPPO</b>	<b>ENERGIA LIBERA, <math>\Delta G_{bind}</math> (kJ/mol)</b>
<b>C25</b>	$E_b = -7,62$ kcal/mol
<b>C30</b>	$E_b = -7,31$ kcal/mol
<b>AR48</b>	$E_b = -7,77$ kcal / mol

*Tabella 10. Valori di energia libera di legame della berberina nel Sito 1.*

In questo caso AR48, ha mostrato un'affinità più elevata rispetto al C25 con affinità intermedia e C30 con un'affinità minore, dovuto al fatto che la berberina si legava più esternamente rispetto al sito.

## DISCUSSIONE

Nonostante l'antibiotico resistenza abbia acquisito sempre maggior importanza ed attenzione da parte sia del mondo scientifico che dell'opinione pubblica (Martinez JL, et al, 2014) un fenomeno altrettanto preoccupante e strettamente coinvolto nello sviluppo di infezioni è l'antibiotico persistenza (Vogwill T, et al 2016). Le forme batteriche persisters, risultando capaci di tollerare elevate dosi di antibiotici, sono ritenute direttamente responsabili della recrudescenza di molte infezioni; esempio tipico risulta l'infezione polmonare da *P. aeruginosa*, un batterio Gram-negativo, appartenente alla famiglia delle *Pseudomonadaceae*, in pazienti affetti da fibrosi cistica, caratterizzata da un andamento ciclico e da continue esacerbazioni polmonari (Davies JC, et al, 2002. Caso esemplare, riportato in letteratura, è il dato che episodi successivi di riacutizzazione dell'infezione nello stesso paziente sottoposto a trattamento antibiotico siano causati dallo stesso ceppo batterico, erroneamente ritenuto debellato (Yum HK., et al, 2014). Per quanto le forme batteriche persistenti siano note da tempo, lo studio dei pathways relativi alla loro induzione, nonché i meccanismi alla base dell'antibiotico-persistenza, rimangono ancora poco chiari. Negli ultimi anni è stato proposto un meccanismo di difesa attiva delle persisters contro elevate concentrazioni di antibiotico, basato sull'azione delle pompe di efflusso (Pu Y., et al, 2016). Considerata l'attenzione rivolta a questo

meccanismo intrinseco e adattativo di resistenza, per i suoi risvolti nell'efficienza del trattamento antibiotico e per l'identificazione di nuove molecole con attività di EPI, da usare in combinazione con gli antibiotici, lo studio del coinvolgimento dell'efflusso anche nel fenomeno della persistenza risulta particolarmente interessante. L'obiettivo di questo studio di tesi è stato in primo luogo la valutazione del contributo della pompa di efflusso MexXY-OprM nel fenomeno della persistenza alla tobramicina e nella produzione di biofilm di *P. aeruginosa* (CF e non CF). Inoltre, è stata valutata anche la capacità *anti-persister* della berberina (Be), un EPI precedentemente descritto, che risulta comportarsi come competitore per il sito di legame dell'antibiotico nella pompa di efflusso MexXY-OprM, testata in associazione con la tobramicina. Infine, sono state analizzate le sequenze parziali di alcuni ceppi scelti sulla base della loro risposta al trattamento con la berberina, al fine di evidenziare possibili mutazioni che possano spiegare il differente comportamento in presenza dell'inibitore. I saggi sono stati effettuati utilizzando colture planctoniche di ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* CF e non CF isolati da diverse matrici biologiche, in cui precedentemente era stato valutato il ruolo della pompa di efflusso MexXY-OprM e della berberina nel fenomeno della resistenza antibiotica. Inoltre, lo studio ha previsto inizialmente l'inserimento di dieci nuovi ceppi (NCO1, NC02, NC03, NC04, NC05, NC06,

NC07, NCO8, NC09, NC10) provenienti dal Laboratorio di Torrette “Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Ancona”. Per integrare definitivamente i ceppi nello studio è stata effettuata una caratterizzazione genotipica tramite saggi di PCR per la ricerca in primis di geni specie-specifici di *P.aeruginosa*. I geni testati sono stati: *ecfx* e *mexY*.

*ecfx* codifica per un fattore  $\sigma$  di trascrizione coinvolto nella trascrizione di geni a localizzazione extra-citoplasmatica che potrebbe essere coinvolto nella virulenza e nell’assorbimento del ferro, mentre *mexY* codifica per una subunità della pompa di efflusso MexXY-OprM specifica per aminoglicosidi.

Dall’analisi della PCR per la ricerca del gene *ecfx* di *P.aeruginosa* sono risultati positivi 5 ceppi batterici (NC01, NC04, NC06, NC09, NC10). Pur essendo un gene specie-specifico, *ecfx* può non essere presente in ogni singola cellula batterica di *Pseudomonas aeruginosa*: per questo è stata eseguita una seconda PCR di conferma per la ricerca del gene specifico codificante la subunità della pompa di efflusso MexXY-OprM in esame sui ceppi *ecfx* negativi. In questo caso dei 5 ceppi batterici analizzati solo il ceppo NC02 è risultato positivo per la presenza del gene *mexY*.

I quattro ceppi negativi sia per *ecfx* sia per *mexY* non sono stati inseriti nello studio, mentre il ceppo NCO2 è stato aggiunto definitivamente per i saggi successivi.

Nello sviluppo della resistenza e persistenza antibiotica oltre al sistema attivo delle pompe di efflusso sono coinvolti anche altri meccanismi biochimici, come modifiche della molecola antibiotica e/o cambiamenti dei siti target. Per cui per essere sicuri che il fenomeno della tolleranza agli aminoglicosidi dei ceppi *ecfx* e *mexY* positivi fosse dovuta solo alla presenza e all'attività esercitata della pompa MexXY-OprM, è stato eseguito un ulteriore screening molecolare per la ricerca di geni coinvolti in meccanismi diversi dalle pompe. In questo caso i geni scelti sono stati:

*ant(2'')-Ia*, che codifica per una nucleotidiltransferasi modificante l'antibiotico e *rmtA*, che codifica per una metilasi del 16s rRNA, target preferenziale degli aminoglicosidi.

Nessun campione è risultato positivo per il gene *rmtA*, mentre per il gene *ant(2'')-Ia* solo ceppo NC09 è risultato positivo. Confermata per cui la presenza di un gene coinvolto in un ulteriore meccanismo di resistenza diverso dalla pompa di efflusso, il ceppo è stato eliminato dallo studio, in quanto non possiamo dedurre che il suo comportamento nei confronti della tobramicina dipenderà esclusivamente dalla attività della pompa MexXY-OprM.

Dalla caratterizzazione genotipica per i 6 nuovi ceppi si è passati ad effettuare una caratterizzazione fenotipica, determinando la minima concentrazione inibente (MIC) utilizzando concentrazioni scalari di tobramicina da 0.125 a 128

µg/ml. I risultati ottenuti confermano come, malgrado gli aminoglicosidi, in questo caso la tobramicina, risultino ancora un'efficace opzione di trattamento delle infezioni polmonari da *P. aeruginosa*, l'isolamento di ceppi resistenti ad essi è un fenomeno sempre più frequente. Non bisogna poi dimenticare che i dati riportati si riferiscono a saggi in vitro: è infatti ben nota la discrepanza tra l'efficacia di un determinato antibiotico in vitro e in vivo, condizione in cui la sua attività è influenzata da numerose variabili, che possono influire negativamente su di essa. Inoltre, la MIC della tobramicina è stata valutata anche in presenza della berberina, alla concentrazione fissa di 80 µg/ml. La **Tabella 11** mostra i valori di MIC di tutti i 24 ceppi che sono stati utilizzati in questo lavoro, sia con tobramicina sia in associazione tobramicina- berberina.

<b>CEPPO</b>	<b>MIC(µg/ml)</b>	
	<b>TOBRAMICINA</b>	<b>TOBRA+BERBERINA</b>
NC01	16	8
NC02	32	16
NC04	0.5	0
NC06	2	0.5
NC10	1	0.125
PA01	0.25	0.125
K767	0.25	0.125
PA14	0.125	0.125
C6	2	0.5
C9	2	1
C15	8	8
C25	16	1
C30	8	8
C31	8	8
C54	32	16
C59	64	32
C61	64	16
C76	32	16

<b>C83</b>	<b>128</b>	<b>32</b>
<b>C84</b>	<b>0.5</b>	<b>0.125</b>
<b>C86</b>	<b>128</b>	<b>16</b>
<b>C104</b>	<b>32</b>	<b>8</b>
<b>AR48</b>	<b>32</b>	<b>8</b>
<b>AR51</b>	<b>16</b>	<b>8</b>

*Tabella 11.1 Valori di MIC con tobramicina e in combinazione tobramicina-berberina..*

Dei 24 ceppi totali è possibile osservare che, 12 ceppi (50%) risultano RESISTENTI alla tobramicina, 9 ceppi (37,5%) risultano SENSIBILI alla tobramicina e 3 ceppi (12,5%) risultano avere una sensibilità intermedia all'antibiotico. Molto interessante è la diminuzione del valore di MIC ottenuto in presenza dell'inibitore. In particolare, su 11 ceppi (45,83%) c'è stato un calo del valore di MIC  $\geq$  a 2 diluizioni, su 10 ceppi (41,67%) un calo di una diluizione, su 3 ceppi (12,5 %) non si è osservato nessun calo. Inoltre, sul ceppo C25 la berberina ha modificato il fenotipo da RESISTENTE (16  $\mu\text{g/ml}$ ) a SENSIBILE (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Questi dati, che si vanno a unire a quelli già presenti in letteratura (Laudadio et al.), indicano come la berberina sia in grado di potenziare l'effetto antimicrobico della tobramicina su una buona percentuale di ceppi clinici. Dunque, è possibile affermare una attività sinergica dell'associazione berberina / tobramicina.

Dato che il ruolo della pompa di efflusso MexXY-OprM nella resistenza batterica è ormai appurato, si è cercato di valutare e osservare il contributo di

tale pompa nel fenomeno della persistenza alla tobramicina, effettuando il saggio di persistenza. Il ceppo batterico è stato trattato sia con una concentrazione di antibiotico 20XMIC, sia con la combinazione antibiotico-berberina, al fine di andare a valutare l'abbattimento cellulare dopo 24 h dal trattamento e confrontarlo con la crescita batterica al tempo 0. La **Tabella 7 (Colonna Blu)**, mostra i valori di CFU/ml ottenute dopo 24 h di trattamento con tobramicina 20XMIC. I ventiquattro ceppi hanno mostrato un comportamento molto variabile. In particolare, la tobramicina ha avuto un effetto significativo sul ceppo C25, in cui si può osservare una diminuzione di 3 log delle cellule sopravvissute; su C59, in cui si può osservare una diminuzione di 5 log ed infine su C83, dove il trattamento con tobramicina ha abbattuto completamente la crescita delle cellule batteriche, partendo da una concentrazione iniziale di **1,71E+08 CFU/ml**. Mentre nei ceppi restanti comunque è possibile osservare una diminuzione notevole di uno/due log. Inoltre, è stata valutata anche la capacità *anti-persistenter* della berberina e la sinergia con la tobramicina, precedentemente dimostrata nel fenomeno della resistenza batterica (**Tabella 7**), (**Colonna verde**).

Anche nel fenomeno della persistenza i dati confermano una eccellente attività sinergica tra tobramicina e la berberina, in quanto nella maggior parte dei campioni (circa il 71%) questa combinazione di molecole ha ridotto le cellule persistenti di diversi logaritmi, risultando quindi un ottimo candidato per il trattamento di infezioni persistenti. Degno di nota è stato l'effetto dell'associazione tobramicina-berberina sul ceppo C86, in cui la carica batterica è stata completamente abbattuta, partendo da una concentrazione iniziale di **5,70E+07 CFU/ml**. Questo dato conferma fortemente l'effetto sinergico della berberina con la tobramicina, in quanto il trattamento con il solo antibiotico sul medesimo ceppo non è stato in grado di diminuire la carica batterica.

Un ulteriore lavoro è stato quello di verificare il possibile coinvolgimento della pompa di efflusso MexXY-OprM in un altro importante fattore di virulenza e resistenza: la formazione di biofilm. Dei ceppi in esame è stata quindi valutata la produzione di biofilm, al fine di poter correlare questo valore con l'attività della medesima pompa nella resistenza e persistenza dei ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*. Il test ha rivelato che più della metà dei ceppi clinici (circa il 60%) saggiati produce più biofilm rispetto al ceppo di controllo PA01, confermando la produzione di biofilm come una strategia comunemente adottata tra ceppi che causano infezione; tuttavia, nessuna apparente correlazione è stata rilevata

tra l'attività della pompa di efflusso nella resistenza/persistenza (dedotta dalla riduzione della MIC una volta bloccata la pompa) e la produzione di biofilm. Probabilmente ciò è dovuto al fatto che diverse strutture cellulari concorrono alla formazione di biofilm (come la pompa di efflusso MexAB-OprM, più presente in *P. aeruginosa*), per cui la pompa MexXY-OprM da sola non ne controlla completamente la produzione.

Pur risultando chiaro l'effetto antimicrobico potenziato dell'associazione tobramicina-berberina rispetto al solo antibiotico, se si va ad effettuare un confronto finale tra la resistenza e la persistenza batterica dei ceppi in esame, è possibile osservare che la risposta dei diversi isolati alla combinazione tobramicina-berberina è risultata spesso variabile sia per la resistenza che per la persistenza: il trattamento ha portato a una riduzione di entrambi i fenomeni o di solo uno dei due; infine in 2/24 casi tali molecole non hanno avuto nessun effetto positivo né sulla persistenza né sulla resistenza batterica (**Tabella 12**).

Dato quindi che diversi ceppi appartenenti alla stessa specie hanno mostrato comportamenti estremamente diversi in entrambi i fenomeni, abbiamo selezionato 8 ceppi (C25, C30, C31, C54, C59, C84, C104, NC06) per effettuare un'indagine molecolare a livello della sequenza del gene *mexY*. Lo scopo è stato quello di andare ad osservare se in alcune regioni del gene fossero presenti delle mutazioni che potrebbero riflettere una diversa struttura proteica

della subunità appartenente alla pompa di efflusso MexXY-OprM e perciò spiegare il diverso comportamento nei confronti dell'inibitore. Le 4 coppie di primers utilizzate ci hanno permesso di amplificare due regioni, rispettivamente di 270 bp e 588 bp, che vanno a coprire i siti di legame con la berberina.

<b>CEPPO</b>	<b>RID PERSISTENZA</b>	<b>RID RESISTENZA</b>
<b>PA01</b>	+	-
<b>K767</b>	+	-
<b>PA14</b>	+	-
<b>C6</b>	-	+
<b>C9</b>	-	-
<b>C15</b>	+	-
<b>C25</b>	+	+
<b>C30</b>	+	-
<b>C31</b>	-	-
<b>C54</b>	+	-
<b>C59</b>	-	-
<b>C61</b>	+	+
<b>C76</b>	+	-
<b>C83</b>	-	+
<b>C84</b>	-	+
<b>C86</b>	+	+
<b>C104</b>	+	+
<b>AR48</b>	-	+
<b>AR51</b>	+	-
<b>NC01</b>	+	-
<b>NC02</b>	+	-
<b>NC04</b>	+	+
<b>NC06</b>	+	+
<b>NC10</b>	+	+

*Tabella 12. In giallo vengono mostrati i ceppi in cui è avvenuto una riduzione della persistenza o resistenza batterica.*

I ceppi sono stati scelti in base ai diversi comportamenti nella resistenza e nella persistenza in presenza della combinazione tobramicina-berberina, ovvero abbiamo scelto due ceppi che presentassero lo stesso risultato positivo (C25-NC06: in entrambi è avvenuto una riduzione sia di persistenza che di resistenza); C31-C59, in cui non è avvenuto né una riduzione sulla persistenza né sulla resistenza; C30-C54, in cui è avvenuto solo la riduzione della persistenza e non della resistenza ed infine la coppia di ceppi C84-AR48, in cui è avvenuta la riduzione della resistenza ma non della persistenza. Gli amplificati sono stati sequenziati e le sequenze nucleotidiche ottenute sono state allineate con la sequenza del gene *mexY* del ceppo di riferimento *Pseudomonas aeruginosa* PA01, presente sul database GeneBank. Sorprendentemente il confronto delle sequenze nucleotidiche analizzate ha evidenziato diverse mutazioni soprattutto nella seconda sequenza (588 bp). Al fine di poter valutare l'effetto di queste mutazioni a livello proteico, le sequenze nucleotidiche sono state tradotte in sequenze amminoacidiche e allineate con la relativa sequenza di riferimento di *Pseudomonas aeruginosa* PA01.

A livello amminoacidico si riscontra una sola sostituzione a livello della sequenza 1 (I112Y) comune in tutti i ceppi analizzati. Molto più interessante è l'analisi delle sostituzioni trovate nella sequenza 2 (22 sostituzioni): di queste la maggior parte sono state rilevate in tutti i ceppi, nonostante ciò il numero di

mutazioni trovate in uno o pochi ceppi è stato significativo e potrebbe dunque spiegare il diverso comportamento fenotipico. In particolare, il ceppo *Pseudomonas aeruginosa* C30 è stato quello in cui è stato rilevato il numero più alto di sostituzioni amminoacidiche. Per confermare ulteriormente questa ipotesi, il gruppo di lavoro Modeling Biomolecolare della Professoressa Roberta Galeazzi, ha ricostruito la porzione MexY della pompa di efflusso MexXY-OprM sulla base delle specifiche sequenze amminoacidiche dei tre ceppi C25, C30 e AR48, ed eseguito saggi di docking molecolare per valutare l'affinità di legame della berberina con i siti di legame presenti sulla pompa di efflusso. I valori ottenuti di energia libera di legame confermano innanzitutto la presenza di due siti di legame per la berberina nella porzione MexY, con una particolare preferenza per il sito 2 (in cui si lega anche l'antibiotico), come già citato dalla letteratura (Laudadio et al). In particolare, per questo sito l'affinità maggiore è stata rilevata per il ceppo C25, mentre gli altri due ceppi testati hanno mostrato affinità minore. Ciò potrebbe spiegare l'effetto più evidente che la berberina ha avuto sul ceppo C25 sia per quanto riguarda la persistenza che la resistenza, mentre negli altri due ceppi la berberina è stata in grado di influire solo su uno dei due fenomeni. Questo risultato conferma il possibile ruolo da competitore della berberina per il sito che lega l'antibiotico e apre nuovi scenari nello sviluppo e utilizzo di inibitori delle pompe di efflusso nel trattamento di

infezioni croniche in associazione con antibiotici già utilizzati in ambito clinico.

In conclusione, i risultati forniti in questo studio di tesi hanno dimostrato il ruolo cruciale della pompa di efflusso MexXY-OprM nello sviluppo del fenotipo persistente alla tobramicina e allo stesso tempo hanno evidenziato la spiccata capacità della berberina, la cui attività di inibizione di MexXY-OprM è già stata dimostrata, di contrastare efficacemente la persistenza di *Pseudomonas aeruginosa* in associazione con la tobramicina. Considerato che le pompe di efflusso costituiscono un importante meccanismo di antibiotico resistenza e persistenza, la possibilità di contrastare quest'ultimo fenomeno tramite la loro inibizione rappresenta un importante obiettivo della ricerca microbiologica e una notevole speranza in ambito clinico. In particolare, nei confronti di *P. aeruginosa*, una delle specie batteriche meno sensibili al trattamento antibiotico, l'utilizzo di EPI costituisce una valida alternativa alla scoperta di nuovi antibiotici, rispondendo alle forti esigenze di sviluppo di nuovi protocolli terapeutici. Di conseguenza, i risultati ottenuti in questo lavoro costituiscono una base per ulteriori sviluppi futuri, tra cui:

- Valutare l'effetto della berberina e di nuovi EPI un numero maggiore di ceppi batterici, in modo tale da confermare il loro ruolo contro la persistenza batterica;

- Analizzare l'intera sequenza del gene *mexY* in ulteriori ceppi clinici, al fine di valutare tutte le possibili mutazioni a livello della pompa di efflusso, riconoscere eventuali genotipi ricorrenti di *mexY* e di conseguenza poter testare ed utilizzare inibitori delle pompe di efflusso *ad hoc*.
- Utilizzare lo stesso approccio anche per altre specie batteriche diverse da *P.aeruginosa*, che sono responsabili di infezioni croniche e refrattarie come *S. aureus* o *E. coli*.
- Messa a punto di nuove formulazioni capaci di incrementare l'effetto sinergico dell'associazione berberina + tobramicina e di potenziarne l'attività anti-persisters

Lo sviluppo di questo filone di ricerca e i relativi risultati costituiranno un'ulteriore opzione per lo sviluppo di nuovi protocolli terapeutici, capaci di garantire un miglior controllo delle infezioni batteriche, in particolare quella polmonare sostenuta da *P. aeruginosa* in pazienti affetti da fibrosi cistica, migliorando così la prognosi dei pazienti affetti da questa patologia.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Abel Zur Wiesch P**, Abel S, Gkotzis S, Ocampo P, Engelstadter J, Hinkley T, Magnus C, Waldor MK, Udekwu K, Cohen T, **2015**. Classic reaction kinetics can explain complex patterns of antibiotic action. *Sci. Transl. Med*, vol. 7, 273–287.
2. **Adams KN**, Takaki K, Connolly LE, Wiedenhoft H, Winglee K, Humbert O, Edelstein PH, Cosma CL, Ramakrishnan L, **2011**. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell*, vol. 145, 39–53.
3. **Antonelli G**, Clementi M, Pozzi G & Rossolini GM, **2008**. Farmaci antibatterici. *Principi di microbiologia medica*. Ambrosiana, Milano, 128-142.
4. **Askoura M**, Mottawea W, Turki A, Ibrahim T, **2011**. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, Coaction publishing.
5. **Balaban, N.Q.**, Helaine, S., Lewis, K., 2019. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol*, vol. 17, 441–448.

6. **Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S., 2004.**  
Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305, 1622–1625.
7. **Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO & Piddock L J, 2015.**  
Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol*,  
vol. 13, 42–51.
8. **Blango MG & Mulvey MA, 2010.** Persistence of uro-pathogenic  
*Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. *Antimicrob. Agents  
Chemother*, vol. 54, 1855–1863.
9. **Boerlin P, White DG, 2013.** Antimicrobial resistance and its  
epidemiology. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, vol. 5, 21-  
40.
10. **Bradford P, 2001.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century:  
characterization, epidemiology and detection of this important  
resistance treat. *Clin Microbiol*, vol. 14, 933-951.
11. **Breidenstein EBM, C de la Fuente-Núñez and REW Hancock, 2011.**  
*Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends  
Microbiol*, vol. 19, no. 8: 419–426.
12. **Buckley AM, Webber MA, Cooles S, Randall LP, La Ragione RM,  
Woodward MJ, Piddock LJ, 2006.** The AcrAB-TolC efflux system of

- Salmonella enterica serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol.* Vol. 8, 847–856.
13. **Bush K**, Jacoby GA, Medeiros AA, **1995**. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*; vol. 39, 1211-1233.
  14. **Bush K**, **2013**. The ABCD's of  $\beta$ -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother*, vol.19, 549–59.
  15. **Cantón R**, N Cobos, J de Gracia, F Baquero, J Honorato, S Gartner, A Alvarez, A Salcedo, A Oliver and E García-Quetglas, **2005**. Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* vol. 11, no. 9: 690-703.
  16. CLSI M07-A10- **Clinical and Laboratory Standard Institute, 2015**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition;
  17. **Conlon BP**, Rowe SE, Lewis K, **2015**. Persister cells in biofilm associated infections. *Adv. Exp. Med. Biol*, vol. 831, 1–9.
  18. **Conly J**, Johnston B, **2005**. Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, vol. 16, 159–60.

19. **Connell SR**, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE, **2003**. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 47, 3675–81.
20. **Couce A**, Blázquez J, **2009**. Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiology Reviews*. 33:531.
21. **D’Costa VM**, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD, 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, vol. 477, 457–61.
22. **Davies DG**, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP, **1998**. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998, vol. 280(5361), 295-8
23. **Davies JC**, **2002**. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence, *Paediatric Respiratory Reviews*, 3, 128-134.
24. **De Kievit TR**, Michael D Parkins, Richard J Gillis, Ramakrishnan S, Howard C, Keith P, Barbara H I, Douglas G S, **2001**. Multidrug Efflux Pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and*

*chemiotherapy*, vol.45, No.6.

25. **Department of Health**, 2011. Annual Report of the Chief Medical Officer. Volume 2. Infections and the Rise of Antimicrobial Resistance. Department of Health, 2011.<http://media.dh.gov.uk/network/357/files/2013/03/CMOAnnual-Report-Volume-2-20111>.
26. **Du Toit A**, 2016. Bacterial physiology: persisters are under the pump. *Nat. Rev.Microbiol*, vol.14, 332–333.
27. **El- Halfawy**, OM & Valvano MA, 2015. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clin. Microbiol. Rev*, vol. 28, 191–207.
28. **Ernst J D**, 2018. Mechanisms of *M. tuberculosis* immune evasion as challenges to TB vaccine design. *Cell Host Microbe*, vol. 24, 34–42.
29. **European Commission**, (2011). COMUNICAZIONE DELLA COMMISSIONE AL PARLAMENTO EUROPEO E AL CONSIGLIO, Piano d'azione di lotta ai crescenti rischi di resistenza antimicrobica (AMR) /\* COM/2011/0748. Da [http://ec.europa.eu/dgs/health\\_food-safety/docs/communication\\_amr\\_2011\\_748\\_it.pdf](http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/docs/communication_amr_2011_748_it.pdf). Consultato il [3/10/16](http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/docs/communication_amr_2011_748_it.pdf).

30. **Fernández L**, EBM Breidenstein, REW Hancock, **2011**. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist Updat*, vol. 14, no.1: 1-21.
31. **Fisher R A**, Gollan B & Helaine S, **2017**. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat. Rev. Microbiol*, vol. 15, 453–464.
32. **Gaca AO**, Colomer-Winter C, Lemos JA, **2015**. Many means to a common end:the intricacies of (p) ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis. *J. Bacteriol*, vol. 197, 1146–1156.
33. **Gerdes K**, Semsey S, **2016**. Microbiology: pumping persisters. *Nature*, vol. 534, 41–42.
34. **Guardabassi L**, Kruse H, **2008**. Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals. *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. Blackwell publishing UK. 1-12.
35. **Guenard S**, Muller C, Monlezun C, Benas P, Broutin I, Jeannot K, Plésiat P, **2014**. Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 58, no1.

36. **Hancock REW, 1998.** Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Non-fermentative Gram-Negative Bacteria. *Clin Infect Dis*, vol. 27, S93-S99.
37. **Handwerger S, Tomasz A, 1985.** Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, vol. 25, 349–380.
38. **Hansen S, Lewis K, Vulic M, 2008.** Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 52, 2718–2726.
39. **Hauryliuk GC, Atkinson KS, Murakami T Tenson, Gerdes, 2015.** Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol*, vol. 13, 298–309.
40. **Hirakata Y, Srikumar R, Poole K, Gotoh N, Suematsu T, Kohno S, Kamihira S, Hancock RE, Speert DP, 2002.** Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med*, vol. 196, 109–118.
41. **Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, Lomovskaya O, Plésiat P, 2003.** MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to

- aminoglycosides. *Antimicrob agents and chemotherapy*, vol. 47, no. 4: 1371-1375.)
42. **Intorre L, 2009.** La resistenza microbica ai chemioterapici. *Farmacologia Veterinaria*, 695-700.
43. **Jalal S, Ciofu O, Høiby N, Gotoh N, Wretlind B, 2000.** Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 44, 710-712.
44. **Jerse AE, Sharma ND, Simms AN, Crow ET, Snyder LA, Shafer WM, 2003.** Agonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. *Infect. Immun*, vol. 71, 5576–5582.
45. **Jose M Munita, Cesar A Arias, 2016.** Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, vol. 4, no. 2.
46. **Korch SB, Henderson TA, Hill TM, 2003.** Characterization of the hipA7 allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol*, vol. 50, 1199–1213.
47. **Lambert P A, 2002.** “Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, vol. 95 Suppl 41: 22-6.

48. **Lau CHF**, D Hughes, K Poole, **2014**. MexY-Promoted Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of a Putative Proximal Binding Pocket in Aminoglycoside Recognition. *mBio*, vol. 5, no. 2: e01068-14;).
49. **Laudadio E**, Cedraro N, Mangiaterra G, Citterio B, Mobbili G, Minnelli C, Bizzaro D, Biavasco F, Galeazzi R, **2019**. Natural alkaloid Berberine activity against *Pseudomonas aeruginosa* MexXY-mediated aminoglycoside resistance: in Silico and in Vitro studies. *Journal of Natural Products*.
50. **Lee JH**, Lee J, **2010**. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev*, vol.34, 426–444.
51. **Lee JH**, Wood TK, Lee J, **2015**. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends Microbiol*, vol. 23, 707–718.
52. **Lewis K**, **2007**. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol*, vol. 5, 48–56.
53. **Lewis K**, **2010**. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol*, vol. 64, 357–372.
54. **Li XZ**, Nakaido H, Poole K, **1995**. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, vol. 39, 1948-1953.

55. **Liu K**, Bittner AN, Wang JD, **2015**. Diversity in (p)ppGpp metabolism and effectors. *Curr. Opin. Microbiol*, vol. 24, 72–79.
56. **Livermore DM**, **2002**. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?. *Clin Infect Dis*, vol. 34, 634-640.
57. **Maisonneuve E**, Shakespeare LJ, Jorgensen MG, Gerdes K, **2011**. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, vol. 108,13206–13211.
58. **Maisonneuve E**, Castro-Camargo M, Gerdes K, **2013**. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell*, vol. 154,1140–1150.
59. **Mangiaterra G**, Laudadio E, Cometti M, Mobbili G, Minnelli C, Massaccesi L, Citterio B, Biavasco F, Galeazzi R, **2016**. Inhibitors of multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa* from natural sources: An in silico high-throughput virtual screening and in vitro validation. *Medical Chemistry Research*, DOI 10.1007).
60. **Manson JM**, Hancock LE, Gilmore MS, **2010**. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, 12269–74.

61. **Martinez JL.**, Baquero F., 2014, Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space, *Ups J Med Sci*, 119(2): 68-77
62. **McMurry LM**, Petrucci RE Jr, Levy SB, **1980**. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 77:3974–7.
63. **Michalska AD**, PT Sacha, D Ojdana, A Wieczorek, E Trynieszewska, **2014**. Prevalence of resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones among *Pseudomonas aeruginosa* strains in a University Hospital in Northeastern Poland. *Braz J Microbiol*, vol. 45, no. 4: 1455-1458.
64. **Morita Y**, J Tomida and Y Kawamura, **2012**. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, vol. 3, no. 408: 1-13.
65. **Moyed HS**, Bertrand KP, **1983**. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol*, vol. 155, 768–775.
66. **Nataro**, J. P., Blaser, M. J. & Cunningham- Rundles, S. *Persistent Bacterial Infections* (ASM Press, 2000).

67. **Neill, J. O.** (2015). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*. 5: 9-14.
68. **Nelson ML**, 2002, Modulation of antibiotic efflux in bacteria. *Curr. Med. Chem. Anti-Infect Agents*, 1:35-54).
69. **Nicas TI** and REW Hancock, **1983**. *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Permeability: Isolation of a Porin Protein F-Deficient Mutant. *J. Bacteriol.*, vol. 153, no. 1: 281-285.
70. **Nikaido H.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003 Dec; 67(4):593–656.  
[PubMed: 14665678]
71. **Niu, H., Cui, P., Shi, W., Zhang, S., Feng, J., Wang, Y., Sullivan, D., Zhang, W., Zhu, B.,Zhang, Y.,** 2015. Identification of anti-persister activity against uropathogenic *Escherichia coli* from a clinical drug library. *Antibiotics* 4, 179–187.;
72. **Norton, J.P., Mulvey, M.A.,** 2012. Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 8, e1002954.

73. **Pagès JM**, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Dec; 6(12):893–903.
74. **Piddock LJ**. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Apr; 19(2):382–402.
75. **Poole K**, 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol*, vol. 2, articolo 65: 90-103).
76. **Poole K**. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jul; 56(1):20– 51.
77. **Pu, Y., Zhao, Z., Li, Y., Zou, J., Ma, Q., Zhao, Y., Ke, Y., Zhu, Y., Chen, H., Baker, M.A., Ge, H., Sun, Y., Xie, X.S., Bai, F., 2016.** Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells. *Mol. Cell* 62, 284–294.
78. **Pu Y., Ke Y., Bai F., 2016,** Active efflux in dormant bacterial cells- new insights into antibiotic persistence, *Drug Resistance Updates* 30, 7-14.
79. **Ramage, H.R., Connolly, L.E., Cox, J.S., 2009.** Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin

- systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet.* 5, e1000767.
80. **Ramirez MS**, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 2010 Dec; 13(6):151–71.
81. **Rossolini GM**, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 17-32.
82. **Rotem**, E., Loinger, A., Ronin, I., Levin-Reisman, I., Gabay, C., Shoshitaishvili, N., Biham, O., Balaban, N.Q., 2010. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107,12541–12546.
83. **Sala**, A., Bordes, P., Genevoux, P., 2014. Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxins* 6, 1002–1020.
84. **Schumacher**, M.A., Balani, P., Min, J., Chinnam, N.B., Hansen, S., Vulic, M., Lewis, K., Brennan, R.G., 2015. HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. *Nature* 524, 59–64.
85. **Schumacher**, M.A., Piro, K.M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., Brennan, R.G., 2009. Molecular mechanisms of HipA-mediated

- multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* 323, 396–401.
86. **Schwarz S**, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev.* 2004 Nov; 28(5):519–42.
87. **Spellberg B**, Bartlett JG, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance. *N Engl J Med* 2013;368:299–302).
88. **Stewart**, M.K., Cookson, B.T., 2012. Non-genetic diversity shapes infectious capacity and host resistance. *Trends Microbiol.* 20, 461–466.
89. **Stover CK**, XQ Pham, AL Erwin, SD Mizoguchi, P Warrener, MJ Hickey, FSL Brinkman, WO Hufnagle, DJ Kowalik, M Lagrou, RL Garber, L Goltry, E Tolentino, S Westbrook-Wadman, Y Yuan, LL Brody, SN Coulter, KR Folger, A Kas, K Larbig, R Lim, K Smith, D Spencer, G K-S Wong, Z Wu, IT Paulsen, J Reizer, MH Saier, REW Hancock, S Lory & MV Olson, **2000**. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, vol. 406: 959-964.

90. **Tacconelli, E.** et al. (2002) Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: analysis of trends in prevalence and epidemiology. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 220–221.
91. **Theodore, A.,** Lewis, K., Vulic, M., 2013. Tolerance of *Escherichia coli* to fluoroquinolone antibiotics depends on specific components of the SOS response pathway. *Genetics* 195, 1265–1276.
92. **Tiecco G.** (2000) *Microbiologia degli alimenti di origine animale*” di XII-640, 6 ed., 33-38; 92-98; 170-176, 719-720.).
93. **Tsutsumi K.,** Yonehara R., Ishizaka-Ikeda E., Miyazaki N., Maeda S., Iwasaki K., Nakagawa A., Yamashita E., **2019**, Structures of the wild-type MexAB-OprM tripartite pump reveal its complex formation and drug efflux mechanism, *Nature Communications* 10:1520.
94. **Vega, N.M.,** Allison, K.R., Khalil, A.S., Collins, J.J., 2012. Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nat. Chem. Biol.* 8, 431–433.
95. **Vogwill T.,** Comfort AA., Furiò V., MacLean RC., 2016, Persistence and resistance as complementary bacterial adaptations to antibiotics, *J Evol Biol*, 29(6):1223-1233
96. **Wilson DN.** Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Jan; 12(1):35–48.

97. **Wise R**, Piddock LJV. British Society of Antimicrobial Chemotherapy (BSAC). The BSAC Working Party on the Urgent Need Regenerating Antibacterial Drug Discovery Development. <http://antibiotic-action.com/wp-content/uploads/2011/07/TUN-Report.pdf> (6 September 2015, date last accessed).
98. **Wu, Y.**, Vulic, M., Keren, I., Lewis, K., 2012. Role of oxidative stress in persistertolerance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4922–4926.
99. **Yamane K**, Y Doi, K Yokoyama, T Yagi, H Kurokawa, N Shibata, K Shibayama, H Kato, and Y Arakawa, 2004. Genetic Environments of the *rmtA* Gene in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 48, no. 6: 2069-2074
100. Yum HK., Park IN., Shin BM., Choi SJ., 2014, Recurrent *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic lung diseases: relapse or reinfection?, *Tuberc. Respir. Dis.*, 77(4):
101. **Zavanella M.**, D'Incau M. (2004). “Osservazioni su un patogeno sempre più temibile: *Pseudomonas aeruginosa*”. *Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio*, 10, 2.

## FONTI DELLE IMMAGINI

1. **Askoura** Momen, Mottawea Walid, Turki Abujamel, Ibrahim Taher, 2011, Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, Coaction publishing
2. **Azam** and Asad U. Khan Medical Microbiology and Molecular Biology Laboratory, Interdisciplinary Biotechnology Unit, Aligarh Muslim University, Aligarh 202002, India Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa* Mohd W.
3. **Balaban, N.Q.**, Helaine, S., Lewis, K., 2019. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol*, vol. 17, 441–448.
4. **Department of Microbiology & Immunology, Queen's University**, Kingston, ON, Canada K7L 3N6
5. <https://it.wikipedia.org/wiki/Berberina>
6. <https://upbiotech.wordpress.com/2017/08/31/metodi-di-conta-batterica/>
7. <https://www.chimica-online.it/biologia/batteri.htm>;
8. [https://www.repubblica.it/salute/medicina-e-ricerca/2019/06/07/news/pseudomonas\\_aeruginosa\\_svelato\\_uno\\_dei\\_meccanismi\\_di\\_resistenza\\_agli\\_antibiotici-228163731/](https://www.repubblica.it/salute/medicina-e-ricerca/2019/06/07/news/pseudomonas_aeruginosa_svelato_uno_dei_meccanismi_di_resistenza_agli_antibiotici-228163731/)
9. <https://www.scienceofacne.com/>;

10. **Jose M Munita**, Cesar A Arias, 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, vol. 4, no. 2.
11. **Lau CHF**, D Hughes, K Poole, 2014. MexY-Promoted Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of a Putative Proximal Binding Pocket in Aminoglycoside Recognition. *mBio*, vol. 5, no. 2: e01068-14;
12. **Laudadio E.**, Cedraro N., Mangiaterra G., Citterio B., Mobbili G., Minelli C., Bizzaro D., Biavasco F., Galeazzi R., 2019, Natural alkaloid Berberine activity against *Pseudomonas aeruginosa* MexXY-mediated aminoglycoside resistance: in Silico and in Vitro studies, *Journal of Natural Products*, DOI:10.1021
13. **Lee K.**, Yoon S.S., 2017, *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J. Microbiol. Biotechnol*, vol. 27, no. 6: 1053– 1064.
14. **Meletis G.**, Bagkeri M., 2013, *Pseudomonas aeruginosa*: multi-drug resistance development and treatment options, INTECH, DOI: 10.5772
15. **Yingying Pu**, Yuehua Ke \*, Fan Bai a., 2017. . Active efflux in dormant bacterial cells – New insights into antibiotic persistence, vol 17.