

Relazione finale progetto Short Term Mobility Program 2017

Proponente/Fruitore: Dr. Giovanni Longo

Istituto di afferenza: Istituto di Struttura della Materia – CNR

Ente visitato Ecole Polytechnique Federale Lausanne (EPFL)

Laboratorio visitato: SP – LPMV diretto dal Prof. Giovanni Dietler

Data inizio STM: 05/02/2018 - Data Fine STM: 25/02/2018

Totale giorni: 21

Report scientifico

I primi esperimenti si sono concentrati sullo studio di batteri del tipo *Bacillus Calmette-Guerin*, della famiglia dei Micobatteri bovini. Abbiamo scelto tale ceppo poiché tali batteri non sono pericolosi per gli esseri umani e quindi di richiedere un laboratorio con livello di sicurezza 2 per poterli manipolare.

I batteri sono stati preparati in tubi Lowenstein Jensen dal laboratorio del Dr. Lanfranco Fattorini dell'Istituto Superiore di Sanità. Tali tubi sono stati trasportati presso i laboratori del Prof. Giovanni Dietler dell'Ecole Polytechnique Federale di Losanna. Le misure sono state effettuate con un microscopio AFM commerciale Nanowizard III della JPK Instruments (Germania) e con dei prototipi per misure di movimento nanostrutturato realizzati presso il laboratorio del Prof. Dietler. (Figura 1)

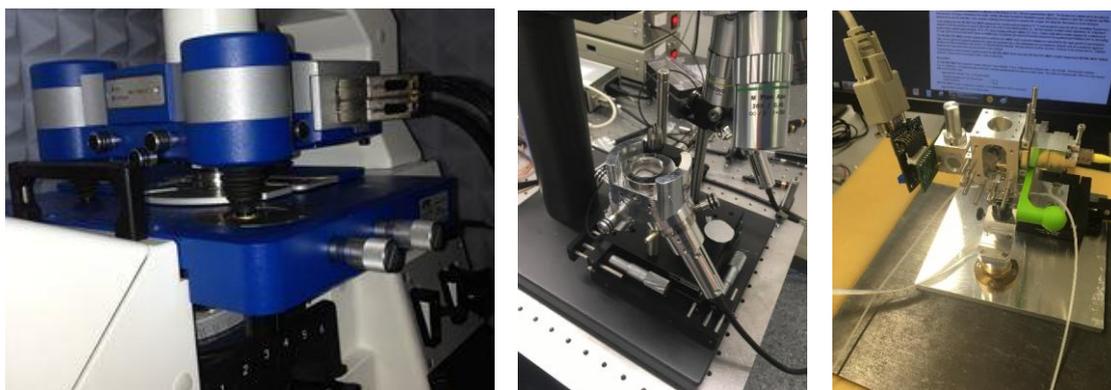


Figura 1. Pannello a: il microscopio AFM Nanowizard III. Pannello b: due esempi di prototipi per effettuare misure di movimento nanostrutturato.

Immobilizzando i batteri su un sensore nanomeccanico, quale un leverino commerciale per AFM, abbiamo studiato il metabolismo dei batteri per diverse ore, monitorando le fluttuazioni del sensore.

Gli esperimenti si sono svolti seguendo un protocollo ben definito:

- 1) Qualche colonia di BCG viene raccolta e diluita in 500 μ l di terreno di coltura (MGIT).

- 2) I batteri vengono agitati per dissolvere gli aggregati (clumps), quindi vengono centrifugati due volte e lavati in PBS.
- 3) Un sensore (sono stati utilizzati sensori DNP-10 della Bruker Probes) viene funzionalizzato con glutaraldeide allo 0.5% per 15 minuti. Al termine di questo periodo, i sensori vengono sciacquati in acqua ultrapura, asciugati ed usati per l'immobilizzazione dei batteri.
- 4) Una aliquota di 20 ml del PBS contenente i batteri viene posta sopra al leverino funzionalizzato ed incubata per almeno 15 minuti.
- 5) Il sensore viene quindi inserito nello strumento di analisi in una camera di analisi contenente 1 ml di terreno MGIT, e la misura ha inizio.
- 6) Le fluttuazioni del leverino danno informazioni riguardo allo stato metabolico dei batteri. Sono state acquisite le fluttuazioni a un ritmo di 10 kHz e la curva fluttuazione/tempo è stata salvata per una analisi successiva.
- 7) Dopo mezz'ora dall'inizio delle misure, nella camera di analisi è introdotto l'antibiotico, con concentrazioni dipendenti dall'esperimento. L'analisi continua per almeno 2 ore per studiare la risposta nel tempo dei batteri all'antibiotico.

Risultati

Dopo i primi esperimenti di controllo, abbiamo effettuato diversi test di risposta dei batteri a dosi battericide di isoniazide e rifampicina, due farmaci comunemente usati per trattare le infezioni da micobatteri.

I risultati di alcuni di questi esperimenti sono descritti in Figura 2. Come mostrato dalle immagini, la tecnica di nanomotion sensing ha permesso di caratterizzare la risposta dei batteri alla pressione antibiotica, e l'indicazione della suscettibilità è stata ottenuta in poche decine di minuti dall'esposizione al farmaco. Questo indica le potenzialità di questa ricerca e della tecnica nello studio di questi batteri a crescita lenta.

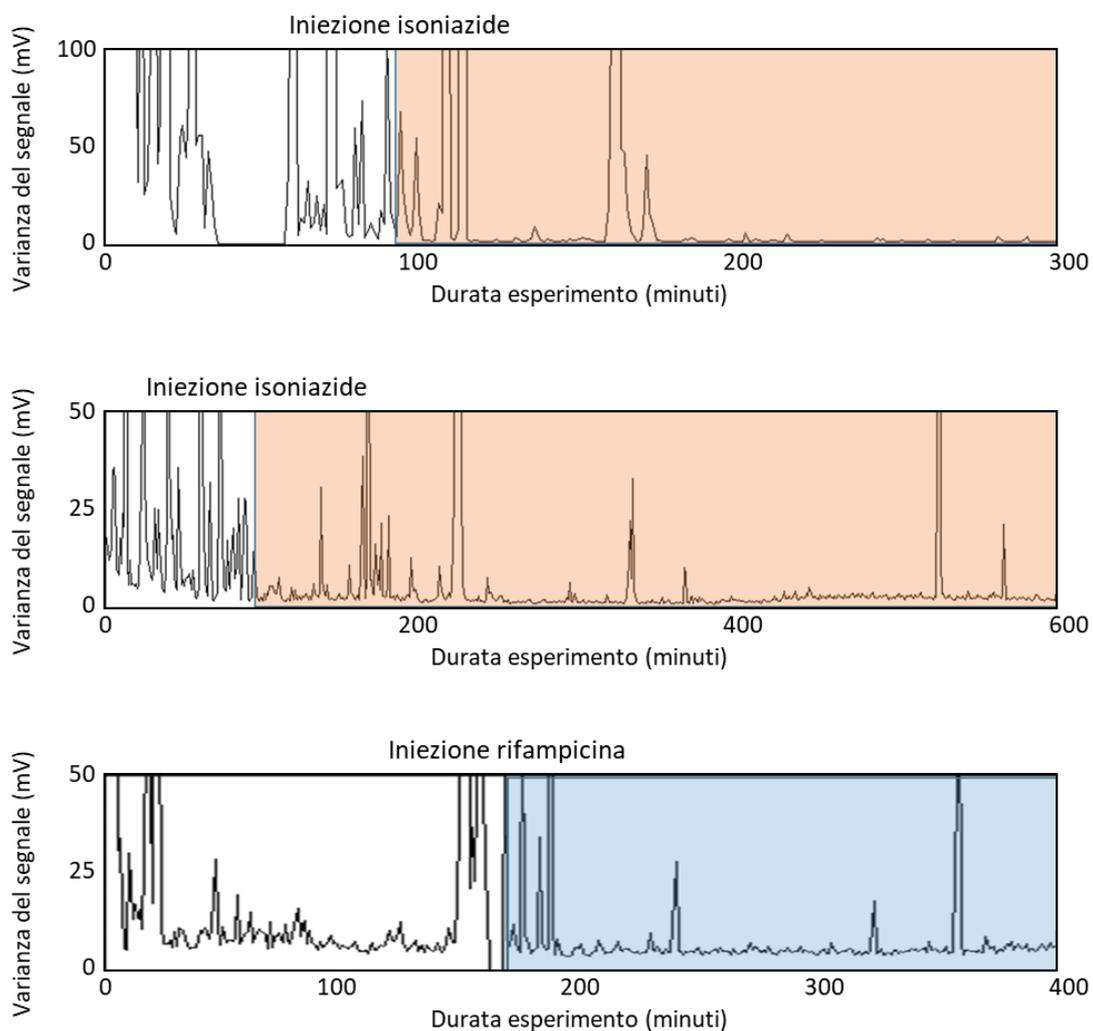


Figura 2. Esempi di esperimenti di movimento nanostrutturato in cui dei batteri BCG sono studiati nel tempo e dopo l'esposizione ad antibiotici: isoniazide e rifampicina.

Una volta terminati questi esperimenti, abbiamo provveduto ad organizzare una serie di analisi per studiare la dose-dipendenza dei batteri agli antibiotici. Abbiamo esposto i batteri a diverse concentrazioni di isoniazide per determinare a quale concentrazione il movimento nanostrutturato fosse ridotto dal farmaco. Tale informazione permette la determinazione dei due parametri

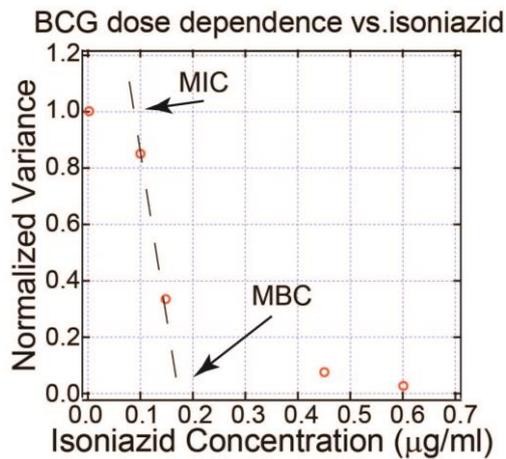


Figura 3. Curva di dose-dipendenza della risposta dei batteri all'isoniazide

fondamentali nello studio clinico di infezioni batteriche: MIC e MBC. Il risultato della analisi è stato un grafico della risposta alle diverse concentrazioni. Per ogni concentrazione abbiamo effettuato diversi esperimenti di durata 2-3 ore ed abbiamo potuto fittare i punti con una curva sigmoide, simile ad un antibiogramma. Tale curva ci ha permesso di determinare le MIC e MBC per questi batteri alla isoniazide, in tempi brevissimi se comparati con le tecniche convenzionali utilizzate in letteratura e nella comune pratica medica.

Al termine di questa analisi, ci siamo rivolti allo studio di un altro batterio a crescita lenta, il *Mycobacterium abscessus*. Tale batterio fa parte dei micobatteri non tubercolari (NTM) e ci ha permesso di completare un quadro d'insieme nello studio dei movimenti nanostrutturati delle diverse categorie di micobatteri.

A causa del breve tempo a disposizione ed alla difficoltà di manipolazione di questi microorganismi, gli esperimenti sono stati più complessi ma hanno prodotto eccellenti risultati. Vista l'innata resistenza di questi batteri all'isoniazide ed alla rifampicina, abbiamo dovuto lavorare con un terzo antibiotico, la kanamicina. Come dimostrato in Figura 4, anche in questo caso la tecnica ha permesso di analizzare e caratterizzare l'effetto di questo farmaco e la risposta circa l'efficacia dell'antibiotico è stata ottenuta in meno di 1 ora.

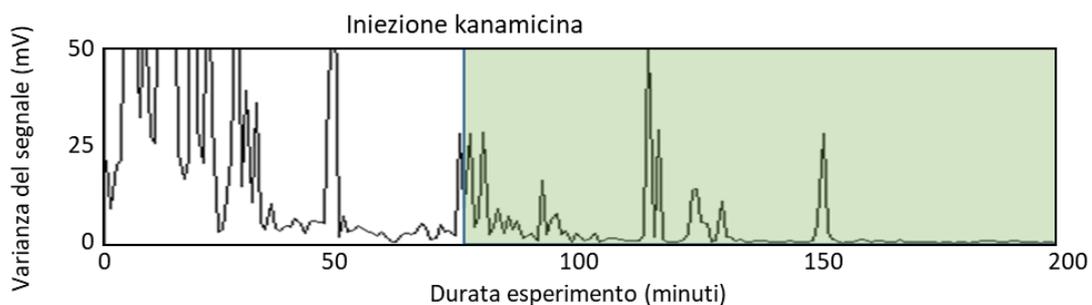


Figura 4 Tipico esperimento di movimento nanostrutturato in cui dei batteri di *Mycobacterium abscessus* sono studiati nel tempo e dopo l'esposizione a kanamicina.

Conclusioni

Il nanomotion sensor, sviluppata nel 2013 dal proponente, proprio per lo studio di batteri e della loro risposta a agenti farmacologici, ha il vantaggio di produrre una caratterizzazione in tempi che non dipendono dal tempo di replicazione del batterio sotto esame; in genere nell'ordine di ore. La famiglia dei Micobatteri è particolarmente importante per la salute umana in quanto ha un tempo di replicazione che varia dalle diverse ore ai diversi giorni e un ceppo, il *Mycobacterium tuberculosis*, causa la tubercolosi, che ancora oggi causa infezioni e morte in paesi in via di sviluppo e industrializzati. Visto che la caratterizzazione della risposta di questi batteri a antibiotici può richiedere anche diverse settimane, tale innovativa analisi ha la potenzialità per ridurre drasticamente i tempi di analisi, con un evidente vantaggio dal punto di vista medico e clinico.

La collaborazione con il prof. Dietler ed il Dr. Kasas ha permesso al proponente di accedere a laboratori con sicurezza P2 e strumentazione dedicata. In particolare, il LPMV ha sviluppato diversi prototipi ottimizzati per svolgere misure di nanomotion sensor, e questo ha permesso di svolgere in parallelo un grande numero di analisi sui diversi batteri sotto investigazione.

In questi esperimenti, finanziati dal programma Short Term Mobility, il proponente ha utilizzato sensori nanomeccanici per monitorare l'attività di batteri a crescita lenta, nello specifico BCG e *Mycobacterium abscessus*. La scelta di questi due batteri è legata alle loro caratteristiche e dal fatto che sono rappresentativi di batteri di tipo tuberculare (il BCG) e non-tuberculare (il *M. abscessus*). Gli antibiotici sono stati scelti in quanto rappresentativi della prima linea di antibiotici contro questi batteri e per il loro uso nella cura di pazienti infettati da diversi tipi di micobatteri.

Roma, 22/03/2018

 Firma