



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia – Nutrizione e Ambiente

Tesi di Laurea

**Valutazione dell'attività di un batteriofago isolato da espettorato e del sinergismo
antimicrobico verso ceppi clinici di *Pseudomonas aeruginosa***

Relatore: Prof.ssa Elisa Bona

Correlatore: Dott. Antonio Curtoni

Candidata: Letizia Bonassin

Matricola: 20041420

Anno Accademico 2024-2025

SOMMARIO

RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	4
1.2 PATOLOGIE DA PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	6
1.3 PATOGENICITÀ E FATTORI DI VIRULENZA.....	8
1.4 BIOFILM	9
1.5 ANTIBIOTICO RESISTENZA	14
1.6 BATTERIOFAGI.....	16
1.7 TERAPIA FAGICA.....	19
2. SCOPO DEL LAVORO.....	20
3. MATERIALI E METODI.....	21
3.1 CEPPI DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA E CRITERI DI SELEZIONE	21
3.2 IDENTIFICAZIONE BATTERICA	21
3.3 TERRENI E ANTIBIOTICI	22
3.4 DETERMINAZIONE DELLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI.....	23
3.5 ISOLAMENTO ED ESTRAZIONE DEL BATTERIOFAGO	24
3.6 TITOLAZIONE	24
3.7 ARRICCHIMENTO	26
3.8 SPETTRO D’OSPITE.....	26
3.9 VALUTAZIONE CINETICA DEL SINERGISMO FAGO-ANTIBIOTICO	27
3.10 VALUTAZIONE DELL’ATTIVITÀ ANTIBIOFILM DEL BATTERIOFAGO.....	29
3.11 ANALISI DEI DATI	31
4. RISULTATI.....	33
4.1 CEPPI DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA E SPETTRO D’OSPITE	33
4.2 DETERMINAZIONE DELLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI.....	37
4.3 VALUTAZIONE CINETICA DEL SINERGISMO FAGO-ANTIBIOTICO	39
4.4 VALUTAZIONE DELL’ATTIVITÀ ANTIBIOFILM DEL BATTERIOFAGO	43

5. DISCUSSIONE.....	45
6. CONCLUSIONI.....	48
7. BIBLIOGRAFIA.....	49
RINGRAZIAMENTI.....	54

RIASSUNTO

Pseudomonas aeruginosa rappresenta uno dei principali patogeni opportunisti responsabili di infezioni nosocomiali, in particolare nei pazienti immunocompromessi o affetti da patologie croniche. La capacità di questo microrganismo di formare biofilm e di sviluppare resistenza a numerose classi di antibiotici contribuisce in modo significativo alla difficoltà terapeutica e all'elevata morbilità associata alle infezioni sostenute da questo patogeno. La crescente diffusione di ceppi multiresistenti (MDR) ha ulteriormente ridotto le opzioni terapeutiche disponibili, rendendo necessario lo sviluppo di strategie alternative o complementari alla terapia antibiotica convenzionale. Negli ultimi anni, la terapia fagica è stata rivalutata come potenziale approccio innovativo nel trattamento delle infezioni batteriche, grazie alla capacità dei batteriofagi litici di infettare selettivamente il batterio bersaglio e determinarne la lisi. Inoltre, l'associazione tra batteriofagi e antibiotici può determinare un effetto sinergico, migliorando l'efficacia antimicrobica e riducendo la probabilità di selezione di ceppi resistenti, soprattutto in presenza di biofilm. Il presente studio, condotto presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'A.O.U. Città Salute e della Scienza di Torino, ha avuto come obiettivo la valutazione dell'attività di un batteriofago isolato da espettorato nei confronti di ceppi clinici di *Pseudomonas aeruginosa*, includendo sia ceppi multisensibili sia multiresistenti. È stata inoltre analizzata la potenziale attività sinergica tra il fago e tre antibiotici di rilevanza clinica (aztreonam, cefepime e imipenem), mediante monitoraggio delle curve di crescita batterica e saggi di quantificazione del biofilm. I risultati ottenuti contribuiscono a fornire ulteriori evidenze sperimentali sul possibile impiego della terapia fagica, singolarmente o in combinazione con antibiotici, come strategia promettente nel trattamento delle infezioni sostenute da *P. aeruginosa*, in particolare nei contesti caratterizzati da limitate opzioni terapeutiche.

1. INTRODUZIONE

1.1 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa è la specie più rappresentativa e clinicamente rilevante del genere *Pseudomonas*, appartenente alla famiglia delle *Pseudomonadaceae*. È un bacillo Gram negativo non fermentante, di lunghezza variabile tra 1,5-5,0 μm e larghezza compresa tra 0,5-1,0 μm . Alcuni ceppi appaiono mucoidi per la presenza di un'ampia capsula polisaccaridica, in grado di produrre un rivestimento extracellulare ricco di alginato che contribuisce alla formazione di biofilm e ad aumentare la resistenza agli antibiotici (1). È mobile solitamente per un solo flagello polare, ma talvolta sono stati riscontrati ceppi privi di flagelli o con più di un flagello. *P. aeruginosa* è un aerobio stretto, tuttavia può crescere in condizioni anaerobiche in presenza di nitrati come accettori finali di elettroni. Si tratta di un microrganismo mesofilo che ha una crescita ottimale a 37°C ma può sopravvivere e svilupparsi in un ampio intervallo di temperature comprese tra i 4°C e i 42°C (2). Molti ceppi producono la piocianina, un pigmento che dona alle colonie una colorazione verdastra. L'osservazione di tale pigmento è una caratteristica specifica, in quanto non è sintetizzato da altri batteri non fermentanti. Alcuni ceppi producono ulteriori pigmenti come la pioverdina e piorubina, o un pigmento fluorescente, la fluoresceina. Un ulteriore elemento diagnostico è la presenza di un caratteristico odore fruttato delle colonie sulle piastre di agar. Questo microrganismo è ampiamente diffuso nell'ambiente, in particolare negli *habitat* acquatici, e anche in ambito ospedaliero. Si può isolare da materiali umidi, lavandini, servizi igienici, attrezzature e dispositivi utilizzati per il supporto respiratorio o la dialisi, addirittura soluzioni disinfettanti mal conservate. È raro che *P. aeruginosa* persista nell'uomo come parte del normale microbiota, fatta eccezione per pazienti ospedalizzati e immunocompromessi. Tale microrganismo è un patogeno opportunista tipico dei pazienti affetti da fibrosi cistica (CF), con infezioni oculari, ustionati e affetti da AIDS. La patogenicità di *P. aeruginosa* è dovuta alla produzione di numerosi fattori di virulenza che favoriscono l'adesione alle cellule dell'ospite, danneggiando i tessuti, inducendo una marcata risposta infiammatoria e compromettendo i meccanismi di difesa immunitaria, consentendo ai batteri di persistere e di sopravvivere. Inoltre, questi microrganismi possiedono numerosi fattori strutturali, enzimi e tossine che contribuiscono ad aumentare la loro virulenza e a renderli resistenti agli antibiotici comunemente utilizzati (3).

Figura 1. *Pseudomonas aeruginosa* al microscopio elettronico a scansione (SEM) (4).

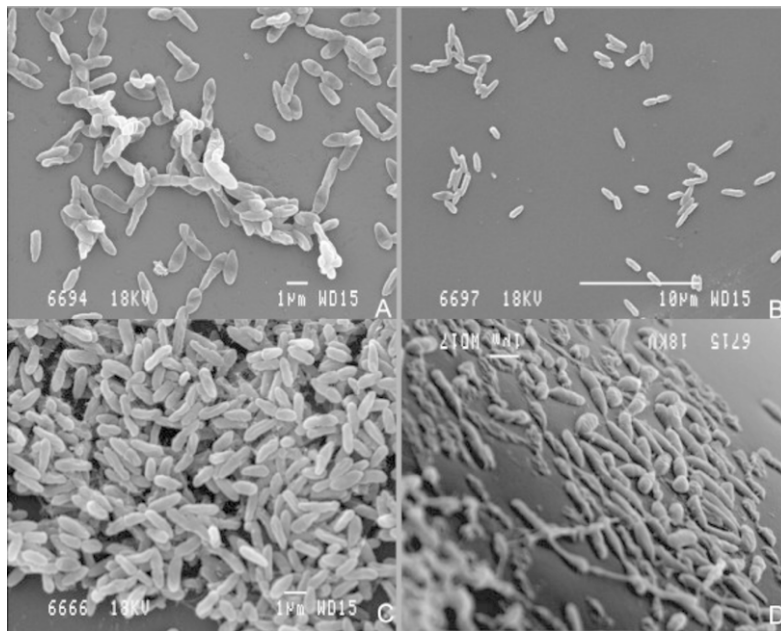
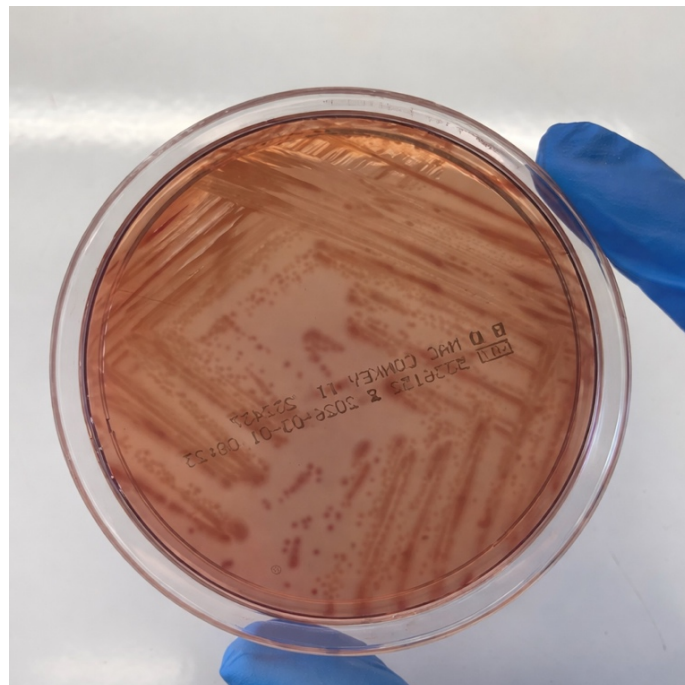


Figura 2. Crescita di *P. aeruginosa* su terreno Mac Conkey. Immagine dell'autore.

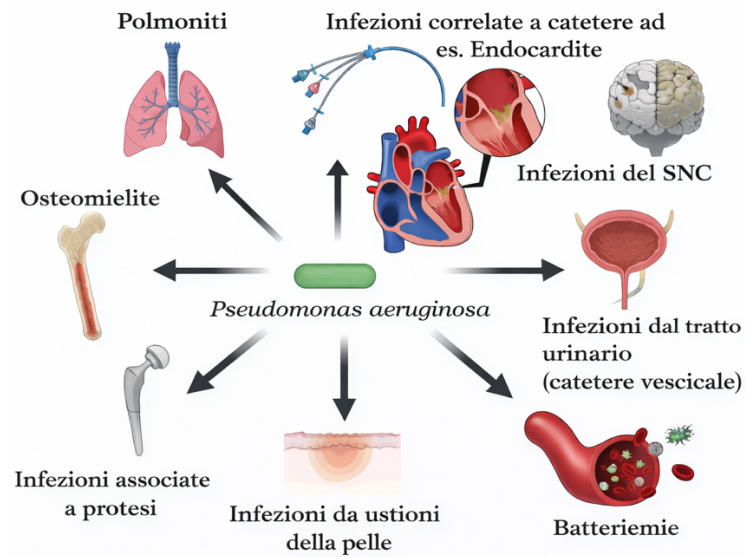


1.2 PATOLOGIE DA PSEUDOMONAS AERUGINOSA

P. aeruginosa rappresenta uno dei principali patogeni opportunisti responsabili di infezioni nosocomiali, con un impatto clinico particolarmente rilevante nei pazienti immunocompromessi, sottoposti a procedure invasive o affetti da patologie croniche. In ambito ospedaliero, si stima che questo microrganismo sia responsabile di una quota significativa delle infezioni acquisite, mentre risulta meno frequentemente coinvolto nelle infezioni comunitarie (1,5). Le infezioni più comunemente sostenute da *P. aeruginosa* interessano l'apparato respiratorio. Le infezioni polmonari includono tracheobronchiti, polmoniti e, in particolare, infezioni croniche nei pazienti affetti da fibrosi cistica (CF). In questi soggetti, l'infezione tende a cronicizzare, risultando difficilmente eradicabile e contribuendo al progressivo deterioramento della funzione polmonare. La persistenza dell'infezione è favorita dalla formazione di biofilm e dalla produzione di ceppi mucoidi, associati ad un decorso clinico sfavorevole (5,6). Un altro ambito di rilevanza clinica è rappresentato dalle infezioni cutanee e dai tessuti molli, in particolare negli ustionati. In tali pazienti, *P. aeruginosa* può causare infezioni localizzate o disseminate, con possibile evoluzione in setticemia. La capacità del microrganismo di sopravvivere nelle escare e di diffondersi per via ematica contribuisce all'elevata mortalità osservata in questi casi (1,5). Le infezioni sistemiche comprendono batteriemie e sepsi, che possono originare da diversi focolai, quali il tratto respiratorio, urinario o ferite chirurgiche. Queste condizioni si osservano più frequentemente nei pazienti con neoplasie, malattie ematologiche o sottoposti a terapie immunosoppressive e sono associate ad un'elevata mortalità (1,7). *P. aeruginosa* è inoltre responsabile di infezioni dell'apparato urinario, spesso correlate a manovre strumentali quali il cateterismo vescicale. In tali casi, l'infezione può evolvere fino a pielonefrite e, nei pazienti più fragili, a batteriemia (5,8). Tra le altre patologie associate si annoverano le infezioni dell'orecchio esterno e medio, caratterizzate dalla presenza di secrezioni purulente di colore verdastro o blu-verde, note come "otite del nuotatore", frequentemente correlate alla presenza di acqua nel canale auricolare. Sono inoltre descritte infezioni oculari, quali ulcere corneali e panoftalmiti, che possono insorgere in seguito a traumi o interventi chirurgici oculari. Più raramente, *P. aeruginosa* può causare endocarditi, soprattutto in soggetti tossicodipendenti per via endovenosa o in pazienti portatori di protesi valvolari, nonché infezioni del sistema nervoso centrale, come meningiti e ascessi cerebrali, generalmente

associate a procedure neurochirurgiche o a diffusione da focolai contigui (5,7). Nel complesso, la varietà e la gravità delle patologie sostenute da *P. aeruginosa* riflettono la sua notevole capacità di adattamento, la produzione di numerosi fattori di virulenza e l'elevata resistenza agli antibiotici, rendendolo uno dei patogeni di maggiore rilevanza clinica in ambito ospedaliero (1,8,9). Questo microrganismo possiede infatti molteplici fattori biologici in grado di favorire l'adesione alle cellule dell'ospite e alle mucine, di indurre danno tissutale, di stimolare una risposta infiammatoria e di interferire con i meccanismi di difesa dell'ospite. Nonostante la diffusione ubiquitaria di *P. aeruginosa* nell'ambiente e la frequente esposizione dell'uomo a questo batterio, nella maggior parte dei casi l'infezione viene efficacemente controllata grazie all'azione del sistema immunitario innato. Tuttavia, condizioni che compromettono tali difese, come la fibrosi cistica (CF), determinano un marcato aumento della suscettibilità alle infezioni da *P. aeruginosa*. A livello molecolare, tale aumentata vulnerabilità è stata associata al ruolo del regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), che può agire da recettore per *P. aeruginosa*. In condizioni fisiologiche, il legame del batterio al CFTR e la sua successiva internalizzazione contribuiscono alla rimozione del patogeno dalle superfici mucose. Al contrario, quando il microrganismo riesce a penetrare in compartimenti epiteliali più profondi, come nel caso di lesioni della superficie oculare, esso può eludere le difese dell'ospite e instaurare un processo infettivo (7).

Figura 3. Principali manifestazioni cliniche e sedi di infezione associate a *Pseudomonas aeruginosa*. Immagine dell'autore.



1.3 PATOGENICITÀ E FATTORI DI VIRULENZA

La capacità patogena di *P. aeruginosa* è strettamente correlata alla riduzione delle difese immunitarie umorali e cellulari dell'ospite oppure all'interruzione delle barriere fisiche, come nel caso di ustioni, ferite chirurgiche, cateteri, protesi ortopediche e ventilazione meccanica (1,5). Uno dei principali fattori di virulenza di *P. aeruginosa* è la capacità di aderire ai tessuti dell'ospite. L'adesività è mediata prevalentemente dalle fimbrie o pili, che consentono al batterio di legarsi alle mucose e alle superfici epiteliali, in particolare quando queste risultano danneggiate da traumi meccanici o da processi infiammatori (5). Un ruolo fondamentale nella colonizzazione è svolto anche dal glicocalice, lo strato polisaccaridico più esterno che riveste la superficie batterica. Il glicocalice facilita l'adesione a substrati biologici e inerti (come cateteri e protesi), favorisce la formazione di biofilm e protegge il batterio dall'azione del sistema immunitario, ostacolando la fagocitosi e l'attacco da parte degli anticorpi. Inoltre, il glicocalice riduce l'efficacia della clearance mucociliare e rallenta l'attività antibiotica (5,10).

P. aeruginosa produce numerosi enzimi extracellulari che contribuiscono al danno tissutale eludendo la risposta immunitaria. Tra questi rivestono particolare importanza:

- Elastasi: degrada l'elastina, i componenti del complemento, e ha un'attività immunoevasiva
- Proteasi: degrada le proteine strutturali dell'ospite
- Fosfolipasi C: distrugge le membrane cellulari, in particolare quelle degli eritrociti e il surfactante polmonare, e anch'essa ha un'azione immunoevasiva (5).

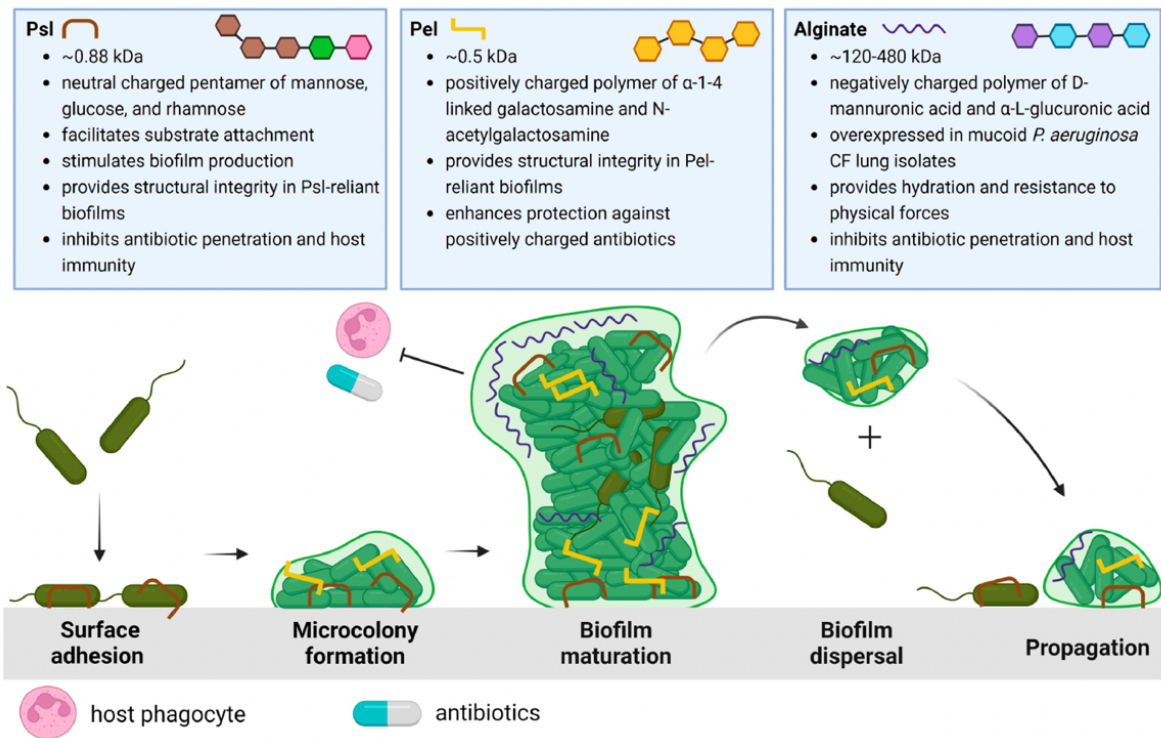
Tra i principali fattori tossinici si distingue l'esotossina A, una tossina ADP-ribosilante che inibisce la sintesi proteica cellulare, causando necrosi tissutale e compromettendo la risposta macrofagica. L'esotossina A rappresenta uno dei principali fattori determinanti la tossicità sistemica del microrganismo (5,11). Il lipopolisaccaride (LPS) della membrana esterna, in particolare il lipide A, agisce come endotossina, inducendo una potente risposta infiammatoria sistemica che può culminare in sepsi, shock settico, coagulazione intravasale disseminata (CID) e insufficienza multiorgano (MODS) (5,9). Un ulteriore fattore di virulenza è la piocianina, un pigmento fenazinicoprodotto da *P. aeruginosa* che induce stress ossidativo mediante meccanismi redox nei confronti di microrganismi competitori. Determina in questo modo il predominio del patogeno nel paziente immunocompromesso ed inibisce inoltre l'attività ciliare dell'epitelio respiratorio, inducendo danno ossidativo ai tessuti dell'ospite (5).

1.4 BIOFILM

I biofilm sono comunità microbiche strutturate costituite da cellule batteriche aderenti a una superficie e inglobate in una matrice polimerica extracellulare autoprodotta. I biofilm sono infatti ubiquitari in natura e possono svilupparsi su una vasta gamma di superfici, comprese quelle abiotiche e in tessuti degli ospiti viventi, nonché su dispositivi medici impiantabili e non impiantabili (12). Durante il processo di formazione del biofilm, le cellule batteriche vanno incontro a profondi cambiamenti fenotipici e fisiologici, accompagnati dalla secrezione di diversi componenti macromolecolari che costituiscono la matrice extracellulare. Questa matrice è composta principalmente da polisaccaridi, proteine, lipidi e acidi nucleici extracellulari (eDNA) e rappresenta l'elemento distintivo di tutti i biofilm batterici. La sua complessa architettura tridimensionale conferisce al biofilm proprietà emergenti che non sono osservabili nelle cellule batteriche in forma planctonica (13). All'interno del biofilm, le

cellule batteriche beneficiano di una maggiore capacità di adesione, colonizzazione e comunicazione intercellulare, mediata anche da sistemi di *quorum sensing*. In particolare, il biofilm svolge una funzione protettiva fondamentale, agendo come una barriera fisica e funzionale nei confronti di numerosi fattori di stress ambientali e biologici, tra cui la disidratazione, i raggi ultravioletti, gli agenti antimicrobici e la risposta immunitaria dell'ospite (14). Di conseguenza, i biofilm rappresentano uno dei principali fattori eziologici delle infezioni croniche, risultando particolarmente difficili da eradicare. È stato dimostrato che i batteri organizzati in biofilm possono mostrare una tolleranza agli antibiotici fino a 100-1000 volte superiore rispetto alle controparti planctoniche (13,15). Tra i microrganismi maggiormente studiati per la loro capacità di formare biofilm vi sono i batteri appartenenti al genere *Pseudomonas*, e in particolare *P. aeruginosa*, considerato un organismo modello per lo studio del biofilm (11). La struttura altamente organizzata e dinamica del biofilm di *P. aeruginosa* contribuisce in modo significativo alla sua patogenicità, favorendo la persistenza del microrganismo nei tessuti dell'ospite, l'evasione della risposta immunitaria e la progressione verso forme di infezione cronica difficilmente trattabili (16). La CF è una patologia genetica multisistemica che provoca un trasporto improprio degli ioni cloruro a livello dell'epitelio (17). Questa disfunzione determina un ambiente polmonare disidratato, una ridotta funzione del sistema mucociliare che porta a produrre muco denso e viscoso, favorendo la colonizzazione delle vie respiratorie da parte di diversi microrganismi patogeni, tra cui *P. aeruginosa*. Numerosi studi in vitro hanno dimostrato come *P. aeruginosa* possieda valori di minime concentrazioni inibenti (MIC) con molti ordini di grandezza, mostrando una marcata tolleranza agli antibiotici. Allo stesso tempo provoca una risposta infiammatoria cronica e disfunzionale, che contribuisce a danneggiare il tessuto polmonare. *P. aeruginosa* accumula gradualmente adattamenti che rafforzano la sua sopravvivenza e le opzioni terapeutiche disponibili si riducono progressivamente. Nei casi in cui i tentativi di eradicazione falliscono, l'infezione diventa cronica con progressivo declino della funzione polmonare, diminuzione della qualità della vita e aumento della mortalità nei pazienti con fibrosi cistica infettati da questo organismo. Le attuali strategie impiegate nella pratica clinica per sradicare e sopprimere i biofilm di *P. aeruginosa* si basano su una terapia antibiotica inalatoria ad alto dosaggio singola o combinata per superare l'elevata tolleranza antibiotica del microrganismo. Tuttavia, questo approccio ha diversi svantaggi, tra cui il rischio di effetti collaterali accumulati e l'emergere di ceppi multiresistenti (MDR).

Figura 4. Ciclo di vita del biofilm (6).



Il ciclo di vita del biofilm di *P. aeruginosa* è caratterizzato da quattro fasi, raffigurate nella Figura 4: adesione iniziale alla superficie, formazione di microcolonie, maturazione del biofilm e dispersione (18). Il ciclo inizia con l'adesione di *P. aeruginosa* a una superficie. In questa fase, il batterio si sposta da uno stato motile e virulento ad un fenotipo sessile, caratterizzato da una riduzione della motilità e dall'avvio della secrezione di esopolisaccaridi (EPS) che ancorano le cellule batteriche. Successivamente, la proliferazione batterica conduce alla formazione di aggregati cellulari, noti come microcolonie, rappresentando la base strutturale per la formazione del biofilm. Successivamente, il biofilm entra nella fase di maturazione, durante la quale si verificano cambiamenti genetici che riguardano la motilità e la secrezione di esopolisaccaridi (EPS) dando origine ad una comunità batterica altamente strutturata. La fase finale del ciclo è data dalla dispersione, quando le condizioni ambientali lo consentono. In questa fase, porzioni del biofilm maturano, disperdono cellule batteriche singole o aggregati, dotati di elevata virulenza, in grado di colonizzare differenti aree, contribuendo alla diffusione dell'infezione (6,18). La capacità di sintetizzare più esopolisaccaridi è uno dei vantaggi che facilitano la sopravvivenza batterica in ambienti diversi. *P. aeruginosa* può produrre diversi esopolisaccaridi, tra cui Psl, Pel, alginato e lipopolisaccaride (19). Gli

esopolisaccaridi Psl e Pel rappresentano due componenti fondamentali della matrice del biofilm di *P. aeruginosa* e svolgono un ruolo cruciale nelle diverse fasi del suo sviluppo.

Psl è un polisaccaride neutro e ramificato, costituito da subunità ripetute di D-mannosio, D-glucosio e L-ramnosio, ed è coinvolto in tutte le fasi della formazione del biofilm. La sua sintesi è regolata dall'operone *psl*, composto da 15 geni cotrascritti (da *pslA* e *pslO*). Durante le fasi iniziali, Psl favorisce l'adesione di *P. aeruginosa* alle superfici e alle cellule adiacenti, facilitando l'ancoraggio batterico e la successiva formazione di microcolonie (19). Inoltre, la deposizione di Psl durante la motilità superficiale contribuisce all'organizzazione spaziale del biofilm, caratterizzato da una forte adesione meccanica e da un'elevata tolleranza agli antibiotici aminoglicosidici. Con la maturazione del biofilm, Psl assume un ruolo strutturale centrale, interagendo con l'adesina extracellulare CdrA e con il DNA extracellulare, formando una matrice reticolata, contribuendo alla stabilità meccanica e alla coesione del biofilm (20). L'interazione tra Psl ed eDNA consente la formazione di una vera e propria impalcatura della matrice extracellulare, che agisce come scheletro del biofilm e ne sostiene l'architettura tridimensionale (21). In questa fase, Psl tende ad accumularsi prevalentemente alla periferia delle microcolonie, contribuendo al mantenimento dell'integrità strutturale della comunità batterica. Psl è inoltre coinvolto nella protezione del biofilm, limitando la penetrazione degli antibiotici e interferendo con i meccanismi di difesa dell'ospite, come l'attivazione del complemento e la fagocitosi. È stato inoltre dimostrato che Psl può legare e sequestrare il ferro, agendo da riserva o canale di stoccaggio all'interno del biofilm, favorendo la persistenza batterica in ambienti caratterizzati da limitata disponibilità di nutrienti. Oltre al ruolo strutturale, Psl svolge anche una funzione regolatoria, agendo come molecola di segnalazione di altri esopolisaccaridi. Dal punto di vista clinico, la produzione di Psl è stata associata a una maggiore tolleranza alla tobramicina e all'aggregazione batterica nell'espettorato in pazienti affetti da CF, contribuendo al fallimento dei tentativi di eradicazione (11). Sebbene sia tipicamente prodotta da ceppi non mucoidi, Psl rimane funzionalmente rilevante anche nei ceppi mucoidi isolati da pazienti con CF.

Pel è un polisaccaride cationico che svolge un ruolo chiave nella formazione del biofilm, in particolare nello sviluppo della pellicola all'interfaccia aria-liquido. È sintetizzato dai geni dell'operone *pel* (*pelA* e *pelG*) ed è costituito da residui di N-galattosamina e N-acetil-

galattosamina. Grazie alla sua carica positiva, Pel media le interazioni cellula-cellula attraverso legami ionici con l'eDNA, contribuendo alla coesione strutturale del biofilm. Inoltre, Pel è in grado di sequestrare antibiotici caricati positivamente, come la tobramicina, aumentando la tolleranza batterica, mentre non sembra esercitare lo stesso effetto su antibiotici a carica neutra. Le interazioni Pel-eDNA proteggono inoltre l'eDNA dalla degradazione enzimatica, riducendo potenzialmente l'efficacia di approcci terapeutici basati su nucleasi. Il contributo relativo di Psl e Pel alla formazione e all'integrità del biofilm varia in funzione del ceppo di *P. aeruginosa*. In entrambi i casi, la perdita del polisaccaride dominante compromette significativamente la formazione del biofilm. La capacità di produrre entrambi i polisaccaridi conferisce a *P. aeruginosa* un'elevata flessibilità adattativa, permettendo meccanismi di compensazione e ridondanza nella matrice del biofilm (6,18).

L'alginato rappresenta l'esopolisaccaride (EPS) più studiato e meglio caratterizzato prodotto da *P. aeruginosa*. A differenza di Psl e Pel, che sono specifici di questa specie, l'alginato è sintetizzato e utilizzato anche da numerose altre specie batteriche. Dal punto di vista strutturale, l'alginato è un polimero lineare anionico ad alto peso molecolare (circa 120-480 kDa), costituito da residui di acido D-mannuronico e α -L-guluronico legati tramite legami β -1,4-glicosidici. La sovrapproduzione di alginato determina l'acquisizione del caratteristico fenotipo mucoido, che rappresenta un importante fattore di virulenza nelle infezioni polmonari sostenute da *P. aeruginosa* nei pazienti affetti da CF. Numerosi studi clinici hanno dimostrato che la colonizzazione da parte di ceppi mucoidi è associata a un declino più rapido della funzione polmonare rispetto alle infezioni causate da ceppi non mucoidi. I biofilm ricchi in alginato presentano una struttura spessa e viscosa, nettamente distinta dalle colonie piatte e uniformi dei ceppi non mucoidi, conferendo una maggiore protezione alle cellule batteriche. Nel muco polmonare disidratato tipico della fibrosi cistica, l'alginato contribuisce inoltre al mantenimento dell'idratazione delle cellule batteriche, favorendone la sopravvivenza a lungo termine. Infine, l'alginato agisce come una barriera protettiva nei confronti sia della terapia antimicrobica sia delle risposte immunitarie dell'ospite, in particolare limitando l'efficacia della fagocitosi mediata dai macrofagi (6).

Il lipopolisaccaride (LPS) è un componente essenziale della membrana esterna dei batteri Gram negativi e rappresenta un importante fattore di virulenza nelle interazioni batterio-

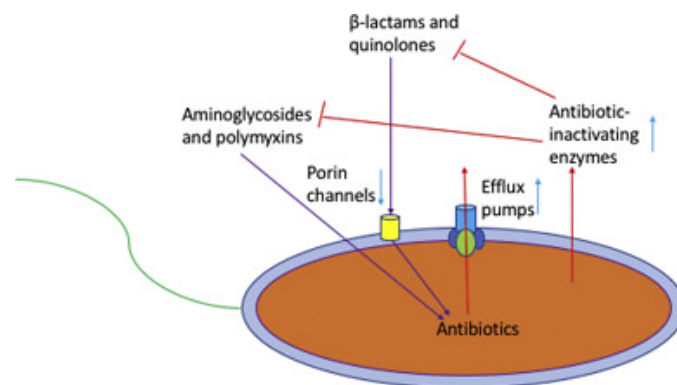
ospite. Sebbene l'LPS non sia considerato un componente strutturale della matrice del biofilm, diversi studi hanno dimostrato il suo coinvolgimento nelle fasi iniziali dello sviluppo del biofilm di *P. aeruginosa*. Il lipopolisaccaride di *P. aeruginosa* è costituito da lipide A, oligosaccaride di base e antigene O. Alterazioni dell'antigene O influenzano le proprietà della superficie cellulare, quali idrofobicità e forze di adesione cellula-cellula e cellula-substrato, con conseguenze sulla motilità flagellare, sull'attaccamento iniziale e sulla formazione delle microcolonie. In particolare, mutanti privi di antigene O mostrano pattern di aggregazione batterica alterati e difetti nella motilità, mentre ceppi isolati da infezioni polmonari croniche nei pazienti affetti da fibrosi cistica presentano frequentemente una riduzione delle catene laterali dell'antigene O. Queste modificazioni sono state associate a modalità di aggregazione simili a quelle osservate *in vivo* nell'espettorato dei pazienti con CF, suggerendo un ruolo dell'LPS nella modulazione dell'architettura del biofilm in condizioni cliniche (19).

1.5 ANTIBIOTICO RESISTENZA

I test di sensibilità agli antibiotici vengono eseguiti nei laboratori di microbiologia clinica per guidare i medici nella scelta della terapia antimicrobica più appropriata per il trattamento delle infezioni. I test di sensibilità includono metodi qualitativi, come il metodo di diffusione su disco, e metodi quantitativi, che forniscono informazioni sulla MIC, molti dei quali sono semi o completamente automatizzati. Oltre a fornire risultati qualitativi (sensibile, intermedio o resistente) per ciascun agente antimicrobico testato, i metodi basati sulla determinazione della MIC permettono di ottenere anche un valore quantitativo della concentrazione minima inibente, generalmente espresso in $\mu\text{g/mL}$ o mg/L . Questo dato risulta particolarmente utile per guidare la posologia degli antimicrobici somministrati. *P. aeruginosa* presenta una resistenza intrinseca nei confronti di numerosi agenti antibatterici ed è inoltre in grado di sviluppare ulteriori meccanismi di resistenza attraverso mutazioni cromosomiche o mediante acquisizione di geni di resistenza tramite trasferimento genico orizzontale (HGT). I principali meccanismi alla base della *resistenza intrinseca* comprendono la ridotta permeabilità della membrana esterna, che limita l'ingresso degli antibiotici attraverso le porine, e l'attivazione costitutiva delle pompe di efflusso, responsabili della loro rapida espulsione dalla cellula batterica. La resistenza ad ulteriori antimicrobici, come gli aminoglicosidici e i beta-lattamici,

può essere acquisita (*resistenza acquisita*) attraverso il trasferimento genico orizzontale. Una terza forma di resistenza (*resistenza adattativa*) è indotta quando *P. aeruginosa* è esposto a stimoli ambientali o a determinati antibiotici. Ad esempio, la formazione di biofilm, può innescare geni regolatori batterici che permettono l'espressione della resistenza. In modo analogo, l'esposizione ad alcuni antibiotici beta-lattamici (ad esempio ceftazidime) attiva l'espressione del gene *ampC* in *P. aeruginosa* che provoca l'inattivazione di molti antibiotici beta-lattamici. In generale gli antimicrobici più attivi contro questo microorganismo sono rappresentati da alcune beta-lattamine (cefalosporine di 3^a generazione, carbapenemici, monobattamici), dagli aminoglicosidi e dai fluorochinoloni. Spesso si ricorre a terapie di associazione per ottenere un effetto sinergico e ridurre l'insorgenza di resistenze (1,8).

Figura 5. Una rappresentazione schematica dei meccanismi di resistenza intrinseca agli antibiotici in *Pseudomonas aeruginosa* (8).



Le opzioni terapeutiche contro ceppi di *P. aeruginosa* multiresistenti (MDR) sono progressivamente sempre più limitate, soprattutto a causa dell'aumento della resistenza ai carbapenemi. I carbapenemi, sono antibiotici β-lattamici ad ampio spettro, inibiscono la sintesi della parete cellulare batterica e rappresentano frequentemente una terapia di ultima linea contro i batteri Gram negativi. La resistenza ai carbapenemi in *P. aeruginosa* è attribuibile a diversi meccanismi, tra cui la produzione di carbapenemasi in grado di idrolizzare il farmaco, la ridotta permeabilità della membrana esterna conseguente a modificazioni o perdita delle porine e l'aumentata attività dei sistemi di efflusso. L'impatto clinico di tale resistenza è rilevante, come evidenziato dagli elevati tassi di mortalità associati alle infezioni da *P. aeruginosa* resistente ai carbapenemi, che possono raggiungere valori compresi tra il 51,2% e il 95%. La progressiva riduzione delle alternative terapeutiche efficaci rende pertanto

necessario lo sviluppo di strategie innovative (22). I β -lattamici costituiscono una delle principali classi impiegate nel trattamento delle infezioni da batteri Gram negativi, inclusa *P. aeruginosa*. Il loro meccanismo d'azione è legato alla presenza dell'anello β -lattamico, struttura essenziale per il legame alle *Penicillin Binding Proteins* (PBPs), enzimi coinvolti nella sintesi del peptidoglicano. L'inibizione delle PBPs determina un'alterazione strutturale della parete cellulare con conseguente lisi e morte batterica (23). Uno dei principali meccanismi di resistenza nei confronti di questa classe antibiotica è rappresentato dalla produzione di β -lattamasi, enzimi in grado di idrolizzare l'anello β -lattamico inattivando la molecola prima che raggiunga il proprio bersaglio (24). Tali enzimi sono classificati in quattro classi molecolari (A-D) in base alla struttura e al meccanismo catalitico (24,25). In *P. aeruginosa*, la β -lattamasi cromosomica di tipo AmpC riveste un ruolo particolarmente rilevante. Essa è espressa fisiologicamente a bassi livelli, ma viene frequentemente sovraregolata in seguito all'esposizione a specifici β -lattamici, contribuendo all'aumento dei valori di MIC e al possibile fallimento terapeutico (26). A differenza di altre β -lattamasi, AmpC non è efficacemente inibita dall'acido clavulanico, limitando l'efficacia di alcune combinazioni antibiotiche tradizionali (27). Oltre alla produzione di AmpC, *P. aeruginosa* può acquisire ulteriori β -lattamasi tramite trasferimento genico orizzontale, incluse carbapenemasi e metallo- β -lattamasi, aggravando ulteriormente il quadro di multiresistenza e restringendo le opzioni terapeutiche disponibili (8).

1.6 BATTERIOFAGI

I batteriofagi sono particelle virali che infettano esclusivamente i batteri e rappresentano uno dei sistemi biologici più studiati in microbiologia. La loro scoperta risale ai primi decenni del Novecento, quando Frederick W. Twort (1915) e successivamente Félix H. d'Hérelle (1917) descrissero l'esistenza di agenti filtrabili capaci di lisare colture batteriche. In seguito, gli studi condotti da Zinder e Lederberg dimostrarono che i batteriofagi possono mediare il trasferimento di materiale genetico tra batteri, fenomeno noto come trasduzione, contribuendo in modo significativo alla comprensione dei meccanismi di variabilità genetica batterica. È stato inoltre osservato che alcuni batteriofagi sono in grado di integrare il proprio genoma nel cromosoma del batterio ospite, instaurando una relazione di tipo lisogenico e

trasmettendo i geni virali alle successive generazioni batteriche. Lo studio dei batteriofagi ha avuto un impatto rilevante nello sviluppo della genetica molecolare e della microbiologia, permettendo di chiarire importanti aspetti dei meccanismi di infezione virale e dell'evoluzione della resistenza agli antibiotici. I batteriofagi litici, in particolare, sono caratterizzati dalla capacità di infettare la cellula batterica attraverso il legame a specifici recettori di superficie e di iniettare il proprio materiale genetico. Una volta all'interno della cellula ospite, il genoma fagico viene replicato sfruttando il metabolismo batterico, portando infine alla lisi della cellula e al rilascio di nuove particelle virali in grado di infettare batteri adiacenti. Dal punto di vista strutturale, i batteriofagi sono costituiti da un capsido proteico (testa) che racchiude il materiale genetico, rappresentato da DNA o RNA a singolo o doppio filamento; molti fagi presentano inoltre un'appendice tubulare (o coda) che consente il riconoscimento e l'adesione a specifici recettori presenti sulla superficie batterica (28). Presenta inoltre appendici caudali con apparato contrattile in grado di iniettare il DNA o l'RNA fagico nel citoplasma del batterio. In base al loro ciclo replicativo, i batteriofagi possono essere distinti in fagi litici e fagi temperati. I fagi litici, una volta infettata la cellula batterica, sfruttano il metabolismo dell'ospite per replicarsi e determinano la lisi della cellula, con rilascio di nuove particelle virali. I fagi temperati, invece, possono integrare il proprio genoma nel cromosoma batterico sotto forma di profago, instaurando una relazione di latenza che può persistere nel tempo; in condizioni appropriate, il profago può riattivarsi ed entrare nel ciclo litico (29). Negli ultimi anni, l'interesse verso i batteriofagi è cresciuto notevolmente in relazione alla diffusione globale della resistenza agli antibiotici. La terapia fagica è stata riscoperta come potenziale strategia alternativa o complementare alla terapia antibiotica tradizionale, in particolare per il trattamento di infezioni causate da batteri multiresistenti. Un vantaggio rilevante dei fagi è la loro elevata specificità d'azione, che consente di colpire selettivamente il patogeno bersaglio riducendo l'impatto sul microbiota commensale (30). Numerosi studi hanno inoltre dimostrato che i batteriofagi possono risultare particolarmente efficaci nei confronti dei batteri organizzati in biofilm. I fagi sono infatti in grado di penetrare la matrice extracellulare del biofilm e, in alcuni casi, di produrre enzimi depolimerizzanti che degradano gli esopolisaccaridi della matrice, favorendo la dispersione delle cellule batteriche. Inoltre, l'utilizzo combinato di fagi e antibiotici può dar luogo a effetti sinergici, migliorando l'efficacia del trattamento e riducendo la probabilità di insorgenza di resistenze (31). Lisando i batteri all'esterno dei biofilm, i fagi litici espongono le cellule all'interno di queste strutture

a nutrienti esogeni e quindi rendono le cellule all'interno del biofilm più metabolicamente attive e quindi più suscettibili all'uccisione da parte degli antibiotici (32).

Figura 6. Rappresentazione schematica del ciclo di replicazione dei batteriofagi litici (30).

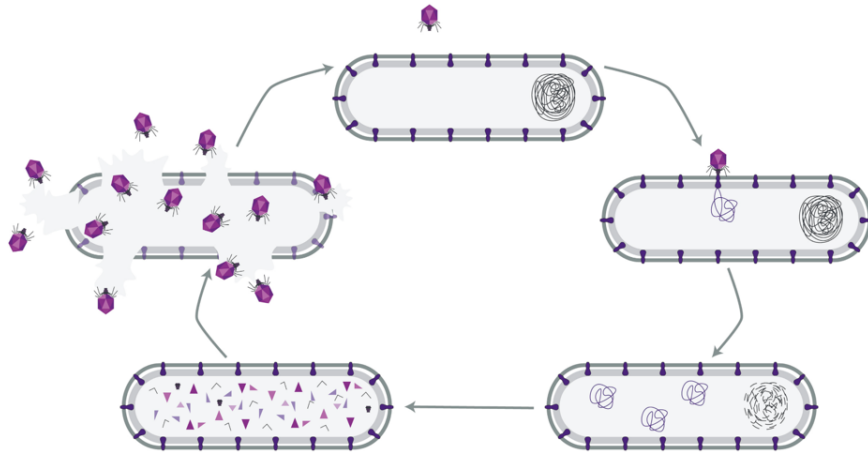
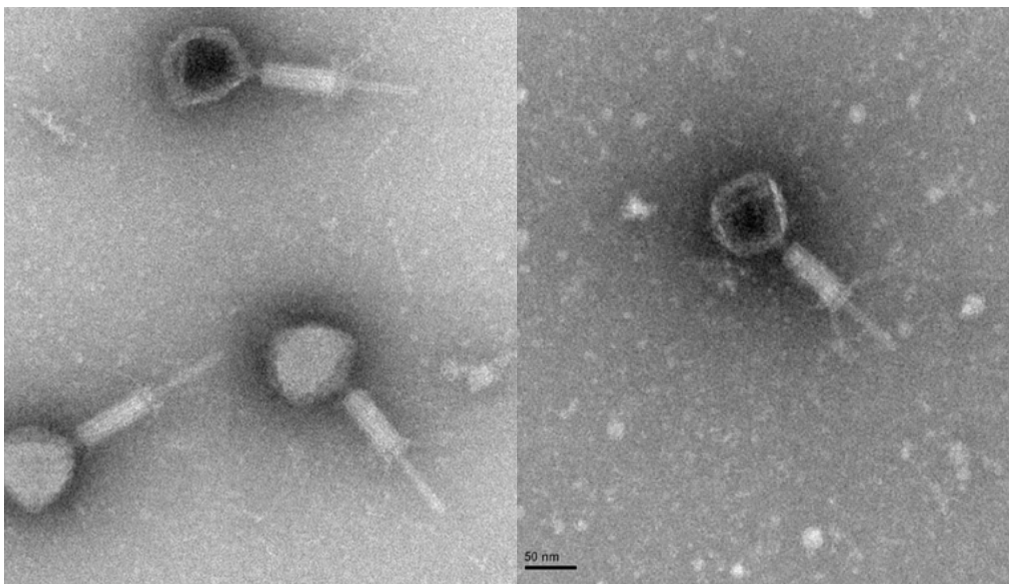


Figura 7. Immagini di batteriofagi osservati al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) (31).



I batteriofagi litici sono predatori virali naturali di batteri che portano alla lisi della cellula ospite come fase finale del ciclo replicativo. Questo tratto ha generato un rinnovato interesse

per la ricerca sui fagi verso lo sviluppo di nuovi strumenti terapeutici per combattere gli agenti patogeni MDR. Vari studi hanno suggerito l'efficacia della terapia fagica contro batteri multiresistenti, comprese le infezioni refrattarie da *P. aeruginosa* del tratto urinario, le articolazioni protesiche e le ferite topiche. È stato inoltre dimostrato che i fagi ripristinano la sensibilità del loro batterio ospite a determinati antibiotici, come parte del compromesso evolutivo tra fago e batterio man mano che si sviluppa la resistenza (22).

1.7 TERAPIA FAGICA

La terapia fagica consiste nell'utilizzo di batteriofagi litici per il trattamento di infezioni batteriche ed è stata sviluppata nei primi decenni del Novecento, prima dell'introduzione degli antibiotici. Sebbene il suo impiego clinico sia stato negli anni progressivamente abbandonato, la diffusione globale della resistenza antimicrobica ha rinnovato l'interesse verso questa strategia terapeutica come possibile alternativa o complemento agli antibiotici convenzionali. Il principio della terapia fagica si basa sulla capacità dei fagi litici di riconoscere selettivamente il batterio bersaglio, infettarlo e determinarne la lisi, con conseguente rilascio di nuove particelle virali in grado di infettare cellule batteriche adiacenti. Tale specificità rappresenta uno dei principali vantaggi della terapia fagica, poiché consente di colpire il patogeno responsabile dell'infezione limitando l'impatto sul microbiota commensale. Inoltre, i batteriofagi sono in grado di autoamplificarsi nel sito di infezione in presenza del batterio bersaglio, caratteristica che può contribuire all'efficacia del trattamento (30). Negli ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia della terapia fagica nei confronti di batteri multiresistenti agli antibiotici, inclusi patogeni opportunisti responsabili di infezioni croniche e nosocomiali. Particolare interesse è rivolto all'impiego dei fagi nel trattamento delle infezioni associate alla formazione di biofilm, poiché i batteriofagi possono penetrare la matrice extracellulare e, in alcuni casi, produrre enzimi depolimerizzanti in grado di degradare gli esopolisaccaridi del biofilm, facilitando la dispersione delle cellule batteriche (32). Nonostante i risultati promettenti, l'applicazione clinica della terapia fagica richiede ulteriori studi per la standardizzazione dei protocolli, la definizione dei criteri di selezione dei fagi e la valutazione della sicurezza e dell'efficacia mediante studi clinici controllati (31).

2. SCOPO DEL LAVORO

Nel contesto delle infezioni sostenute da *P. aeruginosa*, caratterizzate da elevata capacità di sviluppare resistenza agli antibiotici e di formare biofilm, la terapia fagica rappresenta una strategia terapeutica innovativa e potenzialmente efficace.

Il presente studio, condotto presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino, ha come obiettivo:

- valutare l'attività litica del batteriofago nei confronti dei ceppi clinici di *Pseudomonas aeruginosa*, tra cui ceppi MDR
- analizzare il potenziale sinergismo tra fago e antibiotici quali aztreonam, cefepime e imipenem, mediante test di combinazione fago-antibiotico, al fine di evidenziare effetti sinergici, indifferenti o antagonisti
- valutare l'efficacia del fago nella riduzione del biofilm, principale meccanismo di persistenza e resistenza del microrganismo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CEPPI DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA E CRITERI DI SELEZIONE

I ceppi di *P. aeruginosa* inclusi nel presente studio sono stati isolati da campioni clinici di routine analizzati presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia U. dell'Ospedale Molinette di Torino. I ceppi di *P. aeruginosa* inclusi nello studio sono stati selezionati in base al profilo di resistenza antibiotica, includendo sia ceppi multisensibili sia ceppi resistenti, al fine di rappresentare in modo eterogeneo i diversi scenari clinici. In particolare, sono stati considerati MDR i ceppi resistenti ad almeno una molecola di tre o più classi di antibiotici. La selezione dei ceppi multiresistenti è stata effettuata al fine di valutare l'attività litica del fago e del sinergismo fago-antibiotico in ceppi con limitate opzioni terapeutiche. Tutti i ceppi e i relativi dati associati (tipologia di campione, reparto di provenienza) sono stati analizzati in forma anonima, in conformità alle normative vigenti sulla protezione dei dati personali e al puro scopo descrittivo ed epidemiologico. Nella presente tesi non sono stati riportati dati sensibili o informazioni riconducibili ai singoli pazienti.

3.2 IDENTIFICAZIONE BATTERICA

L'identificazione dei ceppi di *P. aeruginosa* è stata effettuata mediante Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex, Bruker Daltonik, Germany), utilizzata come metodica di routine per l'identificazione rapida e accurata dei microrganismi isolati. Il principio della spettrometria di massa si basa sulla misurazione del rapporto massa/carica (m/z) delle molecole ionizzate. I risultati vengono espressi sotto forma di spettro di massa, che rappresenta il segnale ionico in funzione del rapporto massa/carica e consente di ottenere informazioni relative alle particelle, alla loro composizione e all'identità chimica. La strumentazione MALDI-TOF è costituita da tre componenti fondamentali: una sorgente ionica, un analizzatore di massa e un sistema di rilevazione. Il campione, precedentemente miscelato con una matrice in grado di assorbire energia, viene irraggiato dalla sorgente laser con conseguente vaporizzazione e ionizzazione delle molecole, che vengono così trasferite in fase gassosa. Gli ioni generati, aventi la stessa

carica, vengono successivamente separati nell'analizzatore di massa in base al loro tempo di volo (TOF), che dipende dalla massa: gli ioni più leggeri raggiungono il rivelatore in un tempo minore rispetto a quelli più pesanti. Infine, il rivelatore registra il segnale ionico e genera lo spettro di massa caratteristico. In microbiologia clinica, il confronto dello spettro ottenuto con database di riferimento consente l'identificazione rapida ed affidabile dei microrganismi (33).

Figura 8. MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight) (33).



3.3 TERRENI E ANTIBIOTICI

BHI è un terreno di coltura liquido nutrizionalmente ricco consigliato per la coltivazione di una grande varietà di microrganismi patogeni esigenti e non esigenti, inclusi batteri aerobi ed anaerobi. Il brodo BHI utilizzato è costituito da polveri di cuore e cervello di vitello e manzo, peptoni, destrosio e cloruro di sodio. Questa composizione fornisce un'elevata disponibilità di amminoacidi, vitamine, sali minerali e carboidrati, rendendo questo terreno adatto alla crescita rapida ed abbondante di batteri Gram negativi e Gram positivi. Il terreno utilizzato in questo studio è il Brain Heart Infusion BD BBL™ (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) fornito in provette sterili da 8 ml. Il Cation Adjusted Mueller Hinton Broth (MHBCA) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) è un terreno di coltura liquido non selettivo, utilizzato nei laboratori di microbiologia clinica per i test di sensibilità agli antibiotici, secondo le linee guida internazionali dell'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (34). Il Soft agar, o agar semisolido, è un terreno di coltura caratterizzato da una ridotta concentrazione di agar, che conferisce al mezzo una consistenza semisolido. Viene comunemente impiegato nei saggi riguardanti lo studio di batteriofagi come il metodo del Double-Layer Agar (DLA). Nel presente studio, il Soft agar è stato preparato a partire dal

Tryptic Soy Agar (TSA) in polvere (Sharlab Italia S.r.l., Lodi, Italia). Per le semine fresche dei ceppi di *P. aeruginosa* è stato utilizzato il terreno solido Columbia Blood Agar al 5% (Becton, Dickinson and Company). Le prove di titolazione del batteriofago, la valutazione dello spettro d'ospite e i test di sensibilità agli antibiotici mediante ETEST® (Epsilometer test; bioMérieux, France) sono stati eseguiti su terreno Mueller Hinton Agar (MHA) (Becton, Dickinson and Company).

Nel presente studio sono stati selezionati tre antibiotici di rilevanza clinica nel trattamento delle infezioni da *P. aeruginosa*, appartenenti a differenti classi farmacologiche: aztreonam, cefepime e imipenem. L'aztreonam è un antibiotico appartenente alla classe dei monobattami. Agisce inibendo la sintesi della parete cellulare batterica attraverso il legame con specifiche PBPs, determinando un effetto battericida. È attivo principalmente nei confronti dei batteri Gram negativi aerobi, inclusa *P. aeruginosa* (24). Cefepime è una cefalosporina di quarta generazione caratterizzata da ampio spettro d'azione e maggiore stabilità nei confronti delle β -lattamasi rispetto alle cefalosporine di generazione precedente. Agisce anch'esso inibendo la sintesi della parete cellulare batterica e rappresenta uno dei β -lattamici di riferimento nel trattamento delle infezioni gravi sostenute da *P. aeruginosa*, (1,35). Imipenem appartiene alla classe dei carbapenemi, antibiotici β -lattamici a largo spettro considerati farmaci di ultima linea nel trattamento delle infezioni da batteri Gram negativi multiresistenti. È altamente resistente alla maggior parte delle β -lattamasi e presenta un'elevata affinità per diverse PBPs.

3.4 DETERMINAZIONE DELLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI

La valutazione della sensibilità agli antibiotici è stata eseguita mediante sistema automatizzato in microdiluizione in brodo Microscan Walkaway (Beckman Coulter, USA) e secondo i criteri interpretativi EUCAST versione 15.0 (2025) (34). Quando necessario, la MIC è stata determinata mediante ETEST® al fine di ottenere una valutazione quantitativa più accurata della sensibilità agli antibiotici selezionati, con interpretazione dei risultati secondo i medesimi criteri EUCAST (34).

3.5 ISOLAMENTO ED ESTRAZIONE DEL BATTERIOFAGO

L'estrazione del batteriofago è stata eseguita partendo da un ceppo batterico isolato da un campione di espettorato di derivazione clinica. Dopo la fluidificazione mediante SLsolution® (Copan Diagnostics Inc., USA), il campione è stato seminato su diversi terreni di coltura microbiologica e la crescita è stata valutata dopo un'incubazione di 24 ore a 37°C, in condizione di aerobiosi. La morfologia batterica e l'utilizzo del MALDI-TOF hanno consentito di identificare l'isolato come *P. aeruginosa*. Il ceppo presentava aree compatibili con fenomeni di lisi, suggerendo la presenza di un batteriofago. Sono stati prelevati frammenti di agar in corrispondenza delle zone di lisi mediante l'uso di puntali sterili e sono stati trasferiti in provette eppendorf contenenti 1 mL di Tryptic Soy Broth (TSB) o BHI. I campioni sono stati vortexati per permettere il rilascio delle particelle fagiche dall'agar e successivamente centrifugati per 5 minuti a 5000 rpm. Il surnatante ottenuto è stato filtrato mediante apposita siringa con filtro di 0,2 µm con lo scopo di rimuovere eventuali residui batterici ed ottenere un filtrato contenente particelle fagiche. La presenza di batteriofagi litici è stata valutata secondo il metodo del Double-Layer Agar. Brevemente, 100 µL di filtrato sono stati depositati su piastre di MHA, precedentemente allestite con uno strato di TSA (0.75%) semi-solido inoculato con una sospensione batterica di *P. aeruginosa* (36). Le piastre sono state poi incubate *overnight* (o/n) a 37°C e successivamente analizzate per la presenza di placche di lisi, rappresentative dell'attività litica del batteriofago nei confronti del ceppo batterico testato.

3.6 TITOLAZIONE

Per valutare la carica virale in termini di unità formanti placca (PFU) del batteriofago estratto, sono state allestite diluizioni seriali del surnatante precedentemente ottenuto. Tali diluizioni sono state testate con il metodo del DLA (36), utilizzando come ceppo batterico la *P. aeruginosa* di riferimento e contando le placche di lisi formate a differenti diluizioni del fago. La titolazione fagica è stata effettuata secondo la procedura di seguito descritta:

Giorno 1

È stata preparata una coltura fresca del ceppo batterico target mediante semina su piastra e successiva incubazione o/n a 37°C.

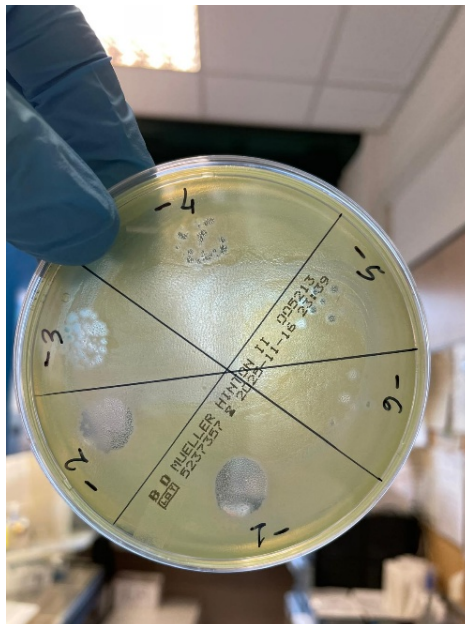
Giorno 2

Una sospensione 0,5 McFarland della *P. aeruginosa* target è stata preparata e inoculata in 4 mL di TSA soft, colato successivamente sulle piastre di MHA, lasciate solidificare poi a temperatura ambiente. Sono state quindi preparate le diluizioni seriali del fago utilizzando provette da 1,5 mL fino al raggiungimento della diluizione desiderata. 10 μ L di ciascuna diluizione sono stati depositati sulle piastre precedentemente preparate. Una volta asciutte, le piastre sono state incubate o/n a 37°C.

Giorno 3

È stata effettuata la valutazione, il conteggio e l'annotazione delle placche di lisi al fine di determinare la titolazione fagica, espressa in PFU/mL.

Figura 9. Titolazione del fago estratto sul ceppo di *P. aeruginosa* di riferimento mediante metodo DLA. Immagine dell'autore.



3.7 ARRICCHIMENTO

Al fine di mantenere la vitalità e l'attività litica del batteriofago, viene effettuata una procedura periodica di arricchimento ogni 20-30 giorni. L'arricchimento viene eseguito utilizzando il ceppo di *P. aeruginosa* di riferimento. La procedura di arricchimento del batteriofago è stata eseguita secondo i seguenti passaggi:

Giorno 1

È stata preparata una coltura fresca del ceppo batterico mediante semina su piastra e successiva incubazione o/n a 37°C.

Giorno 2

In una provetta contenente 10 mL di terreno BHI sono stati aggiunti 100 μ L di una sospensione 0,5 McF del ceppo di riferimento e 100 μ L di sospensione del batteriofago. Il tutto è stato incubato o/n a 37°C.

Giorno 3

La coltura in brodo è stata centrifugata a 5000 rpm per 20 minuti a 4°C. Il surnatante è stato recuperato e filtrato mediante siringa munita di filtro da 0,2 μ m, al fine di rimuovere eventuali residui batterici. Il filtrato è stato conservato a 4°C fino al successivo utilizzo.

Dopo ogni arricchimento, è stata ripetuta la titolazione del filtrato fagico, al fine di valutare la nuova carica virale ottenuta.

3.8 SPETTRO D'OSPITE

Per valutare l'efficacia del fago su ceppi di derivazione clinica di *P. aeruginosa*, è stata valutata la formazione di una placca di lisi su una semina di strato batterico coltivato in agar semisolido (metodo del DLA). Per la definizione dello spettro d'ospite del batteriofago in analisi, le prove sperimentali sono state eseguite secondo il protocollo riportato di seguito:

Giorno 1

Sono state preparate le colture fresche dei ceppi batterici da testare mediante semina su piastra e successiva incubazione o/n a 37°C.

Giorno 2

4 mL di terreno TSA soft, precedentemente inoculato con una sospensione 0,5 McF del ceppo batterico in esame, è stato colato su piastra MHA lasciando poi solidificare a temperatura ambiente. Sono stati quindi dispensati 50 µL di sospensione fagica al centro della piastra, consentendone l'assorbimento completo nel terreno. Le piastre sono state incubate o/n a 37°C.

Giorno 3

È stata valutata la presenza o assenza della placca di lisi per ciascun campione testato, al fine di determinare la sensibilità dei differenti ceppi batterici all'azione litica del batteriofago.

3.9 VALUTAZIONE CINETICA DEL SINERGISMO FAGO-ANTIBIOTICO

La valutazione cinetica dell'attività del batteriofago nei confronti di alcuni dei ceppi di *P. aeruginosa* risultati sensibili all'attività del fago è stata effettuata per un periodo complessivo di 24 ore, con una prima fase di osservazione fino a 10 ore, seguita da una valutazione finale a 24 ore, misurando la densità ottica (Optical Density, O.D.) a 600 nm mediante spettrofotometro Infinite® M Nano (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Il principio di funzionamento si basa sulla legge di Lambert-Beer, secondo la quale l'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione delle specie assorbenti presenti nel campione e al cammino ottico attraversato dalla luce (37). Tale test ha consentito di valutare l'azione del batteriofago nei confronti del ceppo batterico sia singolarmente sia in combinazione con antibiotici. Le analisi sono state condotte in piastre sterili da 96 micropozzetti a fondo conico, incubate a 37°C, con letture spettrofotometriche automatizzate effettuate a intervalli regolari. Il dosaggio degli antibiotici è stato calcolato sulla base del valore di MIC utilizzando la seguente formula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

C_i rappresenta la concentrazione iniziale (soluzione stock di antibiotico), C_f la concentrazione finale corrispondente alla MIC e V_f il volume finale nel quale l'antibiotico viene dispensato. L'interpretazione delle MIC è stata effettuata secondo i criteri clinici EUCAST, che prevedono la classificazione degli isolati in "Sensibile (S)", "Intermedio (I)" ovvero sensibile con aumentata esposizione e "Resistente (R)". Per i ceppi classificati come resistenti è stata utilizzata una concentrazione antibiotica corrispondente al limite superiore della categoria di sensibilità secondo EUCAST (Aztreonam 16 mg/L; Cefepime 8 mg/L; Imipenem 4 mg/L), al fine di impiegare concentrazioni clinicamente rilevanti e realisticamente raggiungibili *in vivo*. Per gli antibiotici con MIC interpretata come intermedia, è stata utilizzata una concentrazione corrispondente alle metà della MIC ($\frac{1}{2}$ MIC), così da creare condizioni sub-inibenti idonee alla valutazione dell'eventuale effetto sinergico tra antibiotico e batteriofago, evitando che la completa inibizione della crescita batterica fosse attribuibile esclusivamente all'azione del farmaco (34).

Per quanto riguarda il batteriofago, è stata impiegata una concentrazione finale pari a 10^8 PFU/mL, in linea con le concentrazioni comunemente utilizzate negli studi sperimentali e clinici considerate compatibili con i dosaggi riportati in letteratura (30,38). Per il ceppo batterico è stata utilizzata una concentrazione standardizzata pari a 10^5 UFC/mL, in conformità alle linee guida EUCAST.

Sono state testate le seguenti condizioni sperimentali:

- Controllo positivo (C+): solo batterio
- C+F: batterio + fago
- C+AZT: batterio + aztreonam
- C+CPE: batterio + cefepime
- C+IMI: batterio + imipenem
- C+AZT+F: batterio + aztreonam + fago
- C+CPE+F: batterio + cefepime + fago
- C+IMI+F: batterio + imipenem + fago

Le prove sperimentali sono state eseguite secondo il protocollo riportato di seguito:

Giorno 1

È stata effettuata la semina fresca del ceppo di *P. aeruginosa* da testare, con successiva incubazione overnight a 37°C.

Giorno 2

È stata preparata una sospensione batterica standardizzata a 0,5 McF. La piastra da 96 micropozzetti a fondo conico è stata allestita secondo le condizioni e le concentrazioni sopra elencate, utilizzando come volume finale 200 µL di MHBCA. La piastra è stata quindi inserita nello spettrofotometro impostato a 37°C, con lettura automatizzata della densità ottica a 600 nm ogni ora per 10 ore consecutive. È stata poi eseguita una ulteriore lettura a 24 ore.

3.10 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIBIOFILM DEL BATTERIOFAGO

La potenziale attività di disgregazione del biofilm del batteriofago è stata valutata esclusivamente sui ceppi clinici di *P. aeruginosa* precedentemente selezionati in base alla loro capacità di produzione di biofilm e risultati sensibili all'attività litica del fago. La quantificazione del biofilm è stata effettuata mediante saggio colorimetrico con cristal violetto in piastre sterili da 96 micropozzetti a fondo piatto. Tale metodica consente la valutazione della biomassa totale del biofilm attraverso la colorazione delle cellule aderenti, seguita dalla solubilizzazione del colorante e dalla misurazione della densità ottica mediante spettrofotometro Infinite® M Nano. Il confronto tra la condizione trattata con il fago e il controllo positivo non trattato, ha permesso di valutare l'efficacia del trattamento nella riduzione del biofilm.

Saggio di formazione del biofilm:

Giorno 1

È stata effettuata la semina dei ceppi di *P. aeruginosa* risultati sensibili al fago, al fine di ottenere colonie fresche da impiegare nei saggi di formazione del biofilm.

Giorno 2

Da colonie isolate è stata preparata una sospensione batterica standardizzata a 0,5 McF. Tale sospensione è stata distribuita in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto, con una concentrazione finale di 10^5 UFC/ml in un volume di 200 μ L di MHBCA. Per favorire la formazione del biofilm, è stato aggiunto glucosio al 2%. Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37°C al fine di consentire la maturazione del biofilm.

Giorno 3

Dopo l'incubazione, il terreno è stato rimosso con cautela per preservare il biofilm adeso al fondo dei pozzetti. È stato quindi aggiunto terreno fresco. Il batteriofago è stato aggiunto ad una concentrazione finale di 10^8 PFU/mL. Le piastre sono state incubate o/n a 37°C.

Giorno 4

Al termine dell'incubazione, il biofilm è stato quantificato mediante saggio con cristal violetto. Il terreno residuo è stato rimosso e i pozzetti sono stati lavati delicatamente con soluzione fisiologica per eliminare le cellule non adese. Il biofilm è stato quindi fissato mediante aggiunta di 200 μ L di metanolo e incubato per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo rimozione del metanolo e asciugatura della piastra, è stata effettuata la colorazione con 200 μ L di cristal violetto per 15 minuti a temperatura ambiente. Il colorante in eccesso è stato eliminato mediante lavaggi con soluzione fisiologica fino a completa rimozione del residuo non legato. Successivamente, il colorante legato al biofilm è stato solubilizzato mediante aggiunta di 100 μ L di etanolo al 95%. La quantificazione del biofilm residuo è stata effettuata mediante lettura spettrofotometrica a 600 nm (37).

Figura 10. Spettrofotometro modello Infinite® M Nano (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).



3.11 ANALISI DEI DATI

I dati sperimentali sono stati raccolti e organizzati mediante il software Microsoft Excel. L'elaborazione è stata condotta mediante statistica descrittiva, al fine di riassumere e confrontare i risultati ottenuti nelle diverse condizioni sperimentali. Ciascun esperimento è stato eseguito ottenendo almeno tre replicati e calcolando la relativa media.

L'effetto inibitorio e l'eventuale sinergismo tra il fago e gli antibiotici sono stati calcolati secondo il modello di indipendenza di Bliss (39,40):

$$E = 1 - \frac{OD_{trattato}}{OD_{controllo}}$$

dove:

- $OD_{trattato}$ rappresenta la densità ottica misurata nel pozzetto sottoposto a trattamento (antibiotico, fago o combinazione);
- $OD_{controllo}$ rappresenta la densità ottica del controllo positivo (batteri non trattati).

Il valore di E esprime la frazione di riduzione della crescita batterica rispetto al controllo non trattato.

Sono stati quindi definiti:

- E_A = effetto dell'antibiotico
- E_F = effetto del batteriofago
- E_{AF} = effetto della combinazione antibiotico + fago

È stato poi calcolato l'effetto inibitorio atteso (39,40).

$$E_{atteso} = E_A + E_F - (E_A \times E_F)$$

Successivamente è stata calcolata la differenza (Δ) tra effetto osservato e atteso:

$$\Delta E = E_{AF} - E_{atteso}$$

L'interpretazione è stata effettuata secondo i seguenti criteri:

- $\Delta E > 0 \rightarrow$ effetto sinergico
- $\Delta E \approx 0 \rightarrow$ effetto additivo / indifferente
- $\Delta E < 0 \rightarrow$ effetto antagonista

Un discostamento dallo zero pari a $\pm 0,05$ (5%) è stato considerato valore soglia per classificare l'effetto come additivo/indifferente, distinguendolo da un'interazione sinergica o antagonista.

Il valore di OD cut-off (OD_c) è stato utilizzato come soglia discriminante per la classificazione della capacità di produzione di biofilm. Il valore di OD_c è stato determinato secondo la seguente formula (41):

$$OD_c = \text{media del controllo negativo} + (3 \times \text{deviazione standard})$$

Sulla base del confronto tra il valore di densità ottica e il valore di OD_c, i ceppi sono stati classificati come segue:

- non produttori di biofilm quando il valore di OD risultava \leq di OD_c
- produttori deboli di biofilm, quando il valore di OD risultava compreso tra OD_c e 2×OD_c
- produttori moderati di biofilm, quando il valore di OD risultava $\geq 2 \times OD_c$, ma minore di 4×OD_c
- produttori forti di biofilm, quando il valore di OD risultava $\geq 4 \times OD_c$.

La percentuale di inibizione del biofilm è stata calcolata secondo la seguente formula (42):

$$\% \text{ Inibizione} = \frac{C^+ - F}{C^+} \times 100$$

dove:

- C⁺ rappresenta il controllo positivo (biofilm non trattato),
- F rappresenta il trattamento con batteriofago.

4. RISULTATI

4.1 CEPPI DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA E SPETTRO D'OSPITE

Nella Tabella 1 sono riportate le caratteristiche dei 78 ceppi di *P. aeruginosa* inclusi nello studio, con indicazione della tipologia di reparto e del materiale biologico di isolamento, del fenotipo e dell'attività del batteriofago. Per quanto riguarda il fenotipo, 8 (10,3%) isolati sono risultati ceppi di *P. aeruginosa* con fenotipo mucoso (PAMU), condizione frequentemente associata a infezioni respiratorie croniche e a maggiore capacità di produzione di biofilm. Tra i ceppi analizzati, 39 (50%) erano MDR. Di questi, 12 *P. aeruginosa* erano produttori di metallo- β -lattamasi VIM (15,4%), 2 produttori di NDM (2,6%) e uno di IMP (1,3%) confermando la presenza di determinanti di resistenza di particolare rilevanza clinica.

Tabella 1. Distribuzione dei ceppi clinici di *P. aeruginosa* (n=78) e relativo profilo di sensibilità al batteriofago isolato.

CEPPO	REPARTO	MATERIALE	FENOTIPO	ATTIVITÀ FAGO
1	Pneumologia	AT	VIM	Si
2	Terapia Intensiva	U		Si
3	Terapia Intensiva	BAL	VIM	Si
4	Chirurgia	EP		Si
5	Chirurgia	SG		Si
6	Medicina Interna	SG		Si
7	Chirurgia	EP		Si
8	Pneumologia	E	PAMU, VIM	No
9	Chirurgia	PROT. ORT.		No
10	Terapia Intensiva	TR		Si
11	Terapia Intensiva	BA	VIM	No
12	Terapia Intensiva	AT	VIM	No
13	Terapia Intensiva	U		No
14	Terapia Intensiva	BAL		Si
15	Pneumologia	AT		Si
16	Cerebrolesioni	U	VIM	No
17	Medicina Interna	U		No
18	Terapia Intensiva	AT		Si
19	Chirurgia	EP		Si
20	Chirurgia	EP	IMP	No
21	Chirurgia	AT		Si
22	Pronto Soccorso	SG		Si
23	Chirurgia	SG		No
24	Pneumologia	TF	PAMU	No

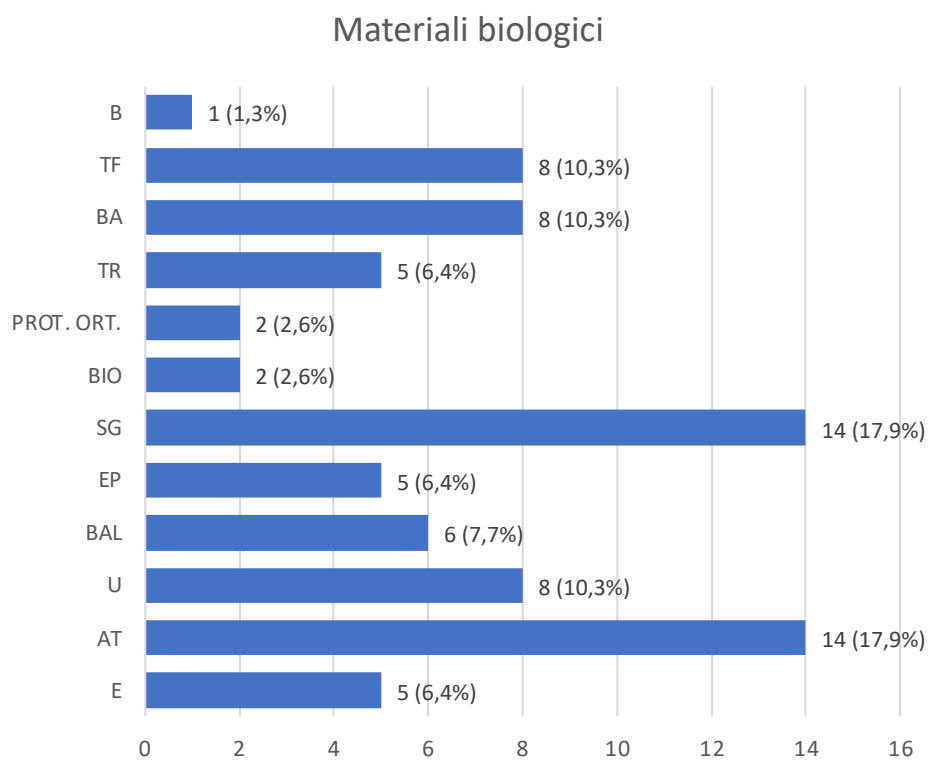
25	Pneumologia	TF	PAMU	No
26	Terapia Intensiva	BA		Si
27	Pneumologia	TF		No
28	Pneumologia	TF		No
29	Terapia Intensiva	AT		Si
30	Terapia Intensiva	AT		Si
31	Chirurgia	BIO		No
32	Chirurgia	BA		Si
33	Terapia Intensiva	SG		No
34	Pronto Soccorso	SG		No
35	Terapia Intensiva	BAL		Si
36	Terapia Intensiva	BA		Si
37	Medicina Del Lavoro	EP		No
38	Chirurgia	U		Si
39	Pneumologia	TF		No
40	Terapia Intensiva	SG		Si
41	Pronto Soccorso	SG		No
42	Terapia Intensiva	SG		No
43	Cerebrolesioni	AT		Si
44	Terapia Intensiva	AT	VIM	Si
45	Chirurgia	SG	NDM	Si
46	Cerebrolesioni	AT		No
47	Cerebrolesioni	AT		No
48	Terapia Intensiva	E		Si
49	Terapia Intensiva	TR	VIM	No
50	Pronto Soccorso	U		Si
51	Cerebrolesioni	AT		Si
52	Medicina Interna	SG		Si
53	Medicina Interna	SG		Si
54	Pneumologia	BA		No
55	Pneumologia	TF	PAMU	Si
56	Terapia Intensiva	BA	VIM	No
57	Pneumologia	TF		Si
58	Pneumologia	TF	PAMU	Si
59	Centro Prelievi	E	PAMU	No
60	Pneumologia	E	PAMU	No
61	Medicina Interna	PROT. ORT.	NDM	Si
62	Chirurgia	B		No
63	Cerebrolesioni	AT		No
64	Chirurgia	U		No
65	Terapia Intensiva	SG	VIM	Si
66	Terapia Intensiva	AT		No
67	Terapia Intensiva	BA	VIM	Si

68	Terapia Intensiva	BAL	VIM	Si
69	Terapia Intensiva	TR		No
70	Terapia Intensiva	TR		No
71	Chirurgia	SG		Si
72	Medicina Interna	BA		No
73	Pneumologia	BAL		Si
74	Chirurgia	TR		No
75	Chirurgia	BIO		No
76	Pneumologia	BAL		Si
77	Cerebrolesioni	U		No
78	Pneumologia	E	PAMU	No

AT= aspirato tracheale; B= bile; BA= broncoaspirato; BAL= lavaggio broncoalveolare; BIO= agobiopsia/biopsia; E= espettorato; EP= essudato/pus; IMP= Imipenemase; NDM= New Delhi Metallo- β -lattamasi; PAMU= *P. aeruginosa* fenotipo mucoso; PROT.ORT= protesi ortopedica; SG= sangue; TF= tampone faringeo; TR= tampone rettale; U= urine; VIM= Verona Integron-encoded Metallo- β -lattamasi.

Al fine di descrivere la distribuzione dei ceppi inclusi nello studio, è stata analizzata la provenienza dei materiali clinici da cui sono stati isolati i 78 ceppi di *P. aeruginosa*. Come mostrato in *Figura 11*, la maggior parte degli isolati provengono da infezioni invasive (sangue, biopsie, protesi) e da infezioni respiratorie (espettorati, aspirati tracheali, broncoaspirati, BAL) con percentuali rispettivamente del 16,7% e 42,3%. La prevalenza di campioni provenienti da distretti respiratori e da infezioni invasive è associata a contesti assistenziali critici, in particolare reparti di terapia intensiva (33,3%) e pneumologia (20,5%). Dei 78 ceppi clinici, 40 (51,3%) sono risultati sensibili all'attività del batteriofago isolato, mentre 38 (48,7%) non hanno mostrato sensibilità.

Figura 11. Distribuzione numerica e percentuale dei materiali biologici da cui sono stati isolati i 78 ceppi di *P. aeruginosa*.



AT= aspirato tracheale; B= bile; BA= broncoaspirato; BAL= lavaggio broncoalveolare; BIO= agobiopsia/biopsia; E= espettorato; EP= essudato/pus; PROT.ORT= protesi ortopedica; SG= sangue; TF= tampone faringeo; TR= tampone rettale; U= urine.

4.2 DETERMINAZIONE DELLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI

I 40 ceppi sensibili al batteriofago mostrano un'elevata eterogeneità fenotipica, comprendendo sia isolati multisensibili, sia ceppi con caratteristiche MDR. La sensibilità al fago non risulta associata esclusivamente a un fenotipo antibiotico favorevole, ma anche a isolati clinicamente rilevanti. I profili di sensibilità agli antibiotici dei 40 ceppi di *P. aeruginosa* sono sintetizzati nella Tabella 2. In breve, 21 (52,5%) hanno presentato un profilo MDR (43). In particolare, un numero consistente di isolati ha mostrato resistenza ai carbapenemi, specialmente meropenem. Sei (15%) dei ceppi sono risultati produttori di VIM, 2 (5%) di NDM. Per quanto riguarda i ceppi con fenotipo mucoso, 2 (5%) sono risultati sensibili al fago.

Tabella 2. Profilo di sensibilità agli antibiotici dei ceppi di *P. aeruginosa* risultati sensibili all'attività del batteriofago (n=40).

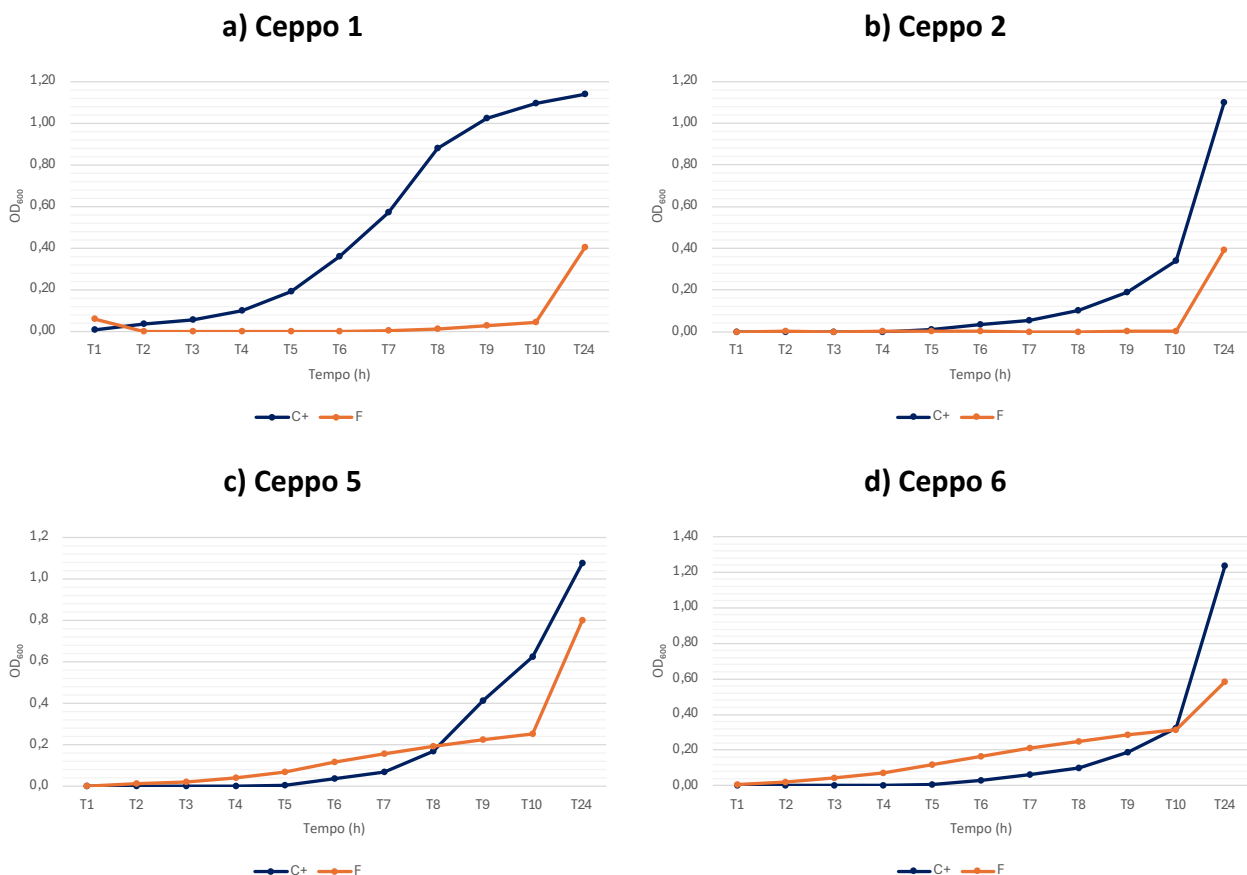
CEPPO	RESISTENZE	CARBAPENEMASI	ATM (RSI; MIC mg/L)	FEP (RSI; MIC mg/L)	IPM (RSI; MIC mg/L)
1	AG	VIM	I 4	R >8	R >8
2	CP, MER, IPM, F		I 6	R >8	R >8
3	CAZ, FEP, IPM, MER, CIP, AMK, TOB, CZA, C/T	VIM	I 4	R >8	R >8
4	P/T, CP, MER, IPM, CZA, F		/	R >8	R 8
5	/		I 3	I 2	I <=1
6	/		I 2	I 8	I <=1
7	/		I 8	I 4	I <=1
10	MER, IPM		/	/	R >8
14	CIP, IPM, FEP		I 2	R >8	R >8
15	/		I 3	I 2	I 2
18	P/T, CP, IPM, CZA, C/T		R >64	R >8	R >8
19	P/T, CP, MER, IPM, CIP, C/T		R >256	R >8	R >8
21	P/T, IPM, MER		/	I 8	R 8
22	P/T, CP, IPM, MER, AG, C/T		R >24	R >8	R 8
26	IPM, MER, P/T, CP		I 6	R >8	R >8
29	IPM, MER		R >24	R 8	R >8
30	P/T, IPM, MER, CIP, FEP		R >24	R >8	R >8
32	P/T, CAZ, FEP, IPM, MER, CZA, IMI/REL		R >64	R >8	R >8
35	IPM, MER, CIP, P/T, CP, CZA, C/T		R >256	R >8	R 8
36	IPM, MER, P/T, CP, CZA, C/T		I 1,5	R >8	R >8
38	P/T, MER, IPM, CZA, MEV, CP, F, AG, C/T		/	R >8	R >8
40	CZA, CFD		/	R >8	I 4
43	MER, IPM, CZA, IMI/REL		/	R >8	R >8
44	IMI/REL	VIM	/	R >8	R >8
45	IMI/REL	NDM	/	R >8	R >8
48	CAZ, FEP, IPM, MER, CIP, AMK, TOB		/	R >8	R >8
50	MER, IPM, CZA, IMI/REL, CFD		/	R >8	R >8
51	IPM, AMK, TOB		/	I 4	R >8
52	MER		/	R >8	R >8
53	CP		/	R >8	I 2
55	/		I 4	I <=1	I <=1
57	/		I <=1	I <=0,5	I 4
58	/		I 4	I 2	I 2
61	/	NDM	/	R >8	R >8
65	/	VIM	/	R >8	R >8
67	AG, C/T, CZA, IMI/REL	VIM	/	R >8	R >8
68	P/T, CP, IPM, MER, C/T, CZA, TOB	VIM	I 4	R >8	R >8
71	P/T, CP, ATM		/	R >8	I <=1
73	MER, IPM, CIP		/	I 4	R >8
76	P/T, CP, MER, IPM		/	R >8	R >8

AG: Aminoglicosidi, AMK: Amikacin, ATM: Aztreonam, C/T: Ceftolozane/Tazobactam, CAZ: Ceftazidime, CFD: Cefiderocol, CIP: Ciprofloxacin, CP: Cefalosporine, CZA: Ceftazidime/Avibactam, F: Fluorochinoloni, FEP: Cefepime, IMI/REL: Imipenem/Relebactam, IPM: Imipenem, MER: Meropenem, MEV: Meropenem/Vaborbactam, NDM: New Delhi Metallo- β -lattamasi, P/T: Piperacillin/Tazobactam, TOB: Tobramycin, VIM: Verona Integron-encoded Metallo- β -lattamasi.

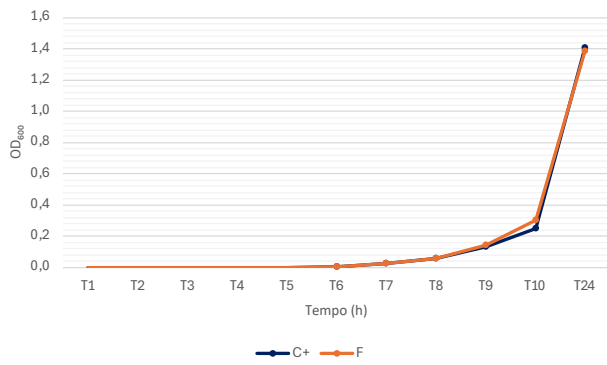
4.3 VALUTAZIONE CINETICA DEL SINERGISMO FAGO-ANTIBIOTICO

La valutazione cinetica del sinergismo fago-antibiotico è stata eseguita su 12 ceppi di *P. aeruginosa* precedentemente risultati sensibili al batteriofago. Per ciascun ceppo è riportato l'andamento della crescita batterica (OD_{600}) nel tempo, mettendo in evidenza il confronto tra controllo positivo e trattamento con batteriofago. Nel ceppo 1 (Figura 12a) e nel ceppo 2 (Figura 12b) si osserva una riduzione della crescita batterica in presenza del batteriofago rispetto al controllo positivo. Analogamente, nel ceppo 14 (Figura 12f), ceppo 19 (Figura 12h), ceppo 22 (Figura 12i), ceppo 29 (Figura 12m) e nel ceppo 32 (Figura 12n) la curva relativa al trattamento con fago risulta inferiore rispetto al controllo, indicando un effetto inibitorio evidente. Nel ceppo 5 (Figura 12c) e nel ceppo 6 (Figura 12d) si osserva una riduzione parziale della crescita batterica, più evidente nelle fasi tardive dell'incubazione. Nel ceppo 7 (Figura 12e), nel ceppo 18 (Figura 12g) e nel ceppo 26 (Figura 12l) le curve di crescita risultano sovrapponibili tra controllo e trattamento con batteriofago.

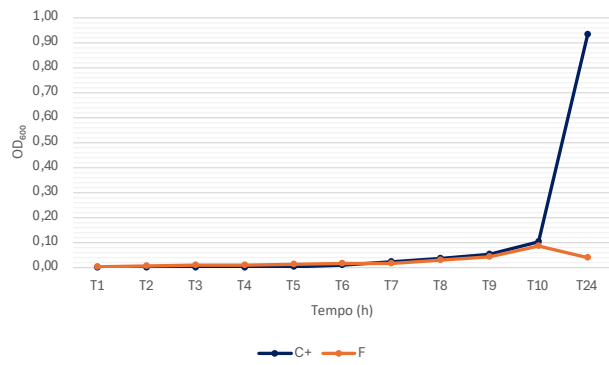
Figura 12. Profilo cinetico di crescita dei 12 ceppi sensibili al fago in assenza (C+) e presenza del batteriofago (F).



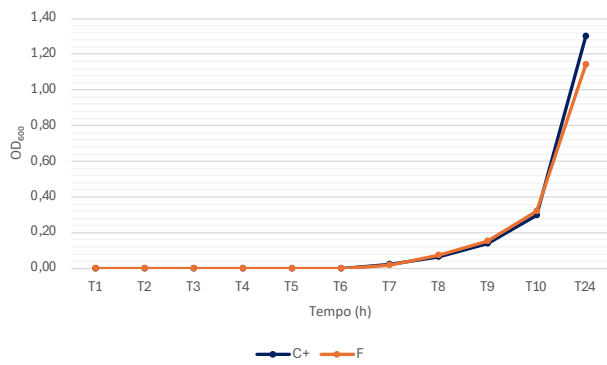
e) Ceppo 7



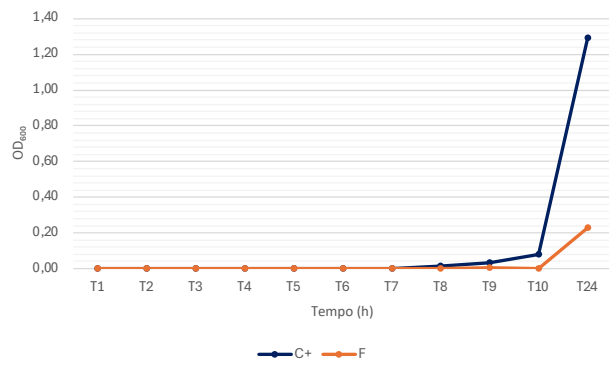
f) Ceppo 14



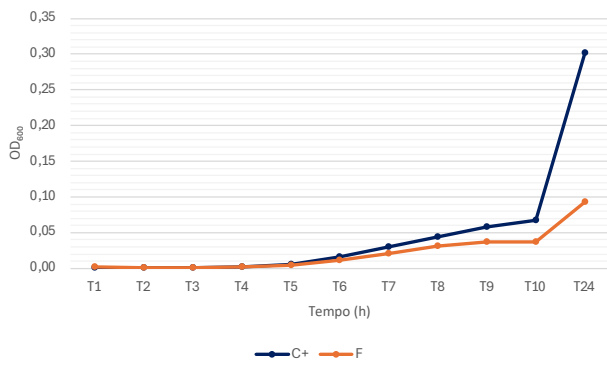
g) Ceppo 18



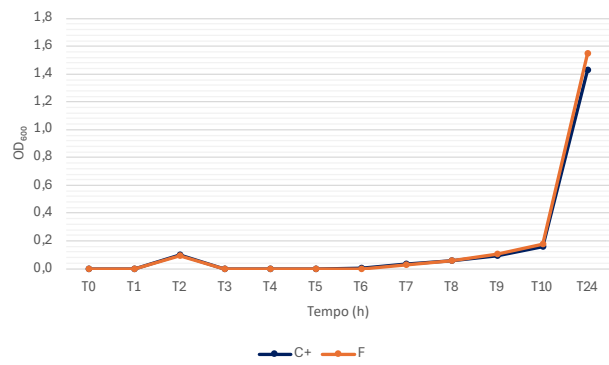
h) Ceppo 19



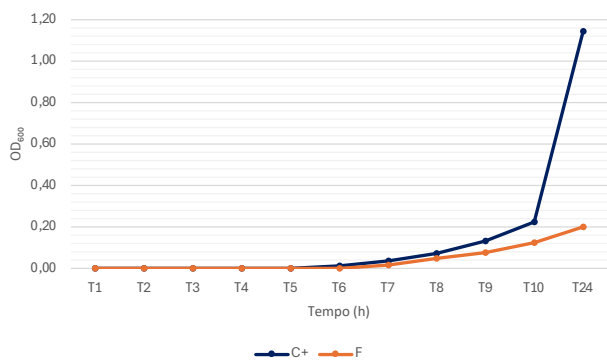
i) Ceppo 22



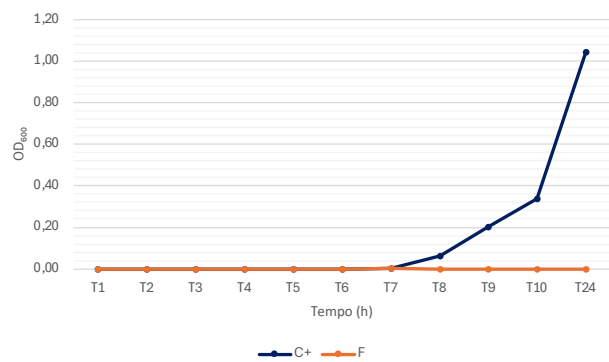
l) Ceppo 26



m) Ceppo 29



n) Ceppo 32



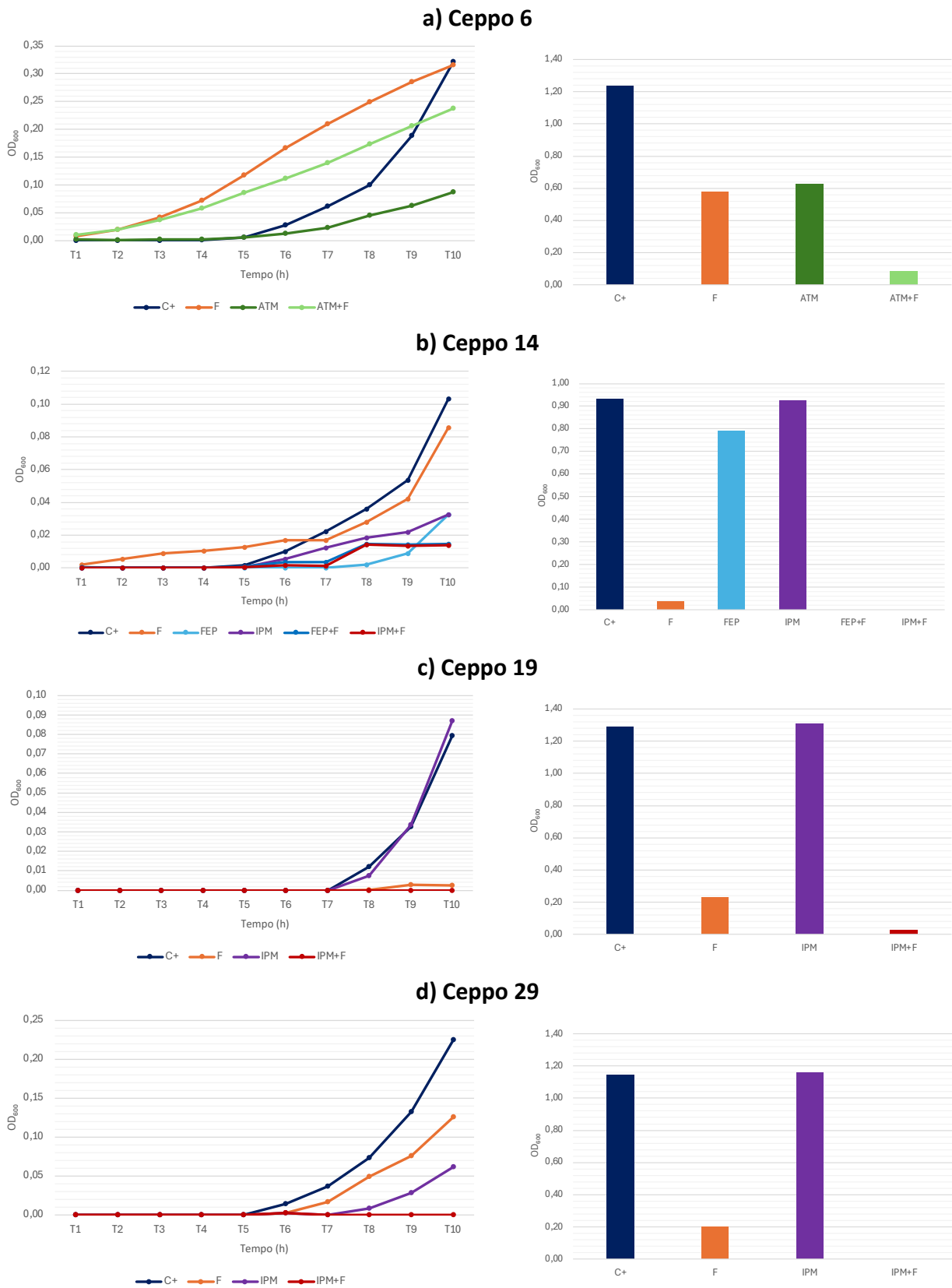
L'analisi dell'interazione tra batteriofago e antibiotici (ATM, FEP, IPM) è stata valutata secondo il metodo descritto nel paragrafo 3.11 dei Materiali e Metodi. I valori di ΔE e la relativa classificazione dell'interazione per ciascun ceppo sono riportati nella Tabella 3. I ceppi 6, 14, 19 e 29 hanno mostrato un'interazione di tipo sinergico in associazione ad almeno uno degli antibiotici testati, mentre nei restanti ceppi l'interazione è risultata di tipo indifferente. Non sono stati osservati casi di antagonismo. I dati riportati si riferiscono alla valutazione effettuata al tempo T24.

Tabella 3. Valutazione dell'interazione tra batteriofago e antibiotici (ATM, FEP, IPM).

CEPPO	ΔE ATM	ATM INTERAZIONE	ΔE FEP	FEP INTERAZIONE	ΔE IPM	IPM INTERAZIONE
1	0	Indifferente	-0,04	Indifferente	-0,05	Indifferente
2	0,01	Indifferente	-0,02	Indifferente	-0,04	Indifferente
5	-0,04	Indifferente	0,01	Indifferente	-0,03	Indifferente
6	0,17	Sinergico	-0,04	Indifferente	-0,01	Indifferente
7	0	Indifferente	0	Indifferente	0	Indifferente
14	-0,01	Indifferente	0,11	Sinergico	0,11	Sinergico
18	0	Indifferente	-0,01	Indifferente	-0,02	Indifferente
19	0	Indifferente	-0,01	Indifferente	0,16	Sinergico
22	0,01	Indifferente	0,01	Indifferente	-0,01	Indifferente
26	0	Indifferente	0	Indifferente	0	Indifferente
29	0,01	Indifferente	0	Indifferente	0,18	Sinergico
32	0	Indifferente	0	Indifferente	0	Indifferente

Di seguito sono riportati i grafici (*Figure 13a-13d*) relativi ai ceppi nei quali l'interazione tra batteriofago e almeno un antibiotico ha mostrato un effetto sinergico (ceppi 6, 14, 19, 29). Per tali ceppi è presentato l'andamento della crescita batterica (OD_{600}), rappresentando graficamente gli antibiotici per cui è stato osservato il sinergismo. È stata osservata un'interazione sinergica nel ceppo 6 in associazione ad ATM (*Figura 13a*), nel ceppo 14 in associazione a FEP e IPM (*Figura 13b*) e nei ceppi 19 e 29 in associazione a IPM (*Figura 13c e Figura 13d*).

Figura 13. Ceppi con interazione fago-antibiotico: andamento della crescita batterica nelle diverse condizioni sperimentali fino a T10 (colonna di sinistra) e valutazione dell'interazione fago-antibiotico rilevata a 24 ore (T24) (colonna di destra).



4.4 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIBIOFILM DEL BATTERIOFAGO

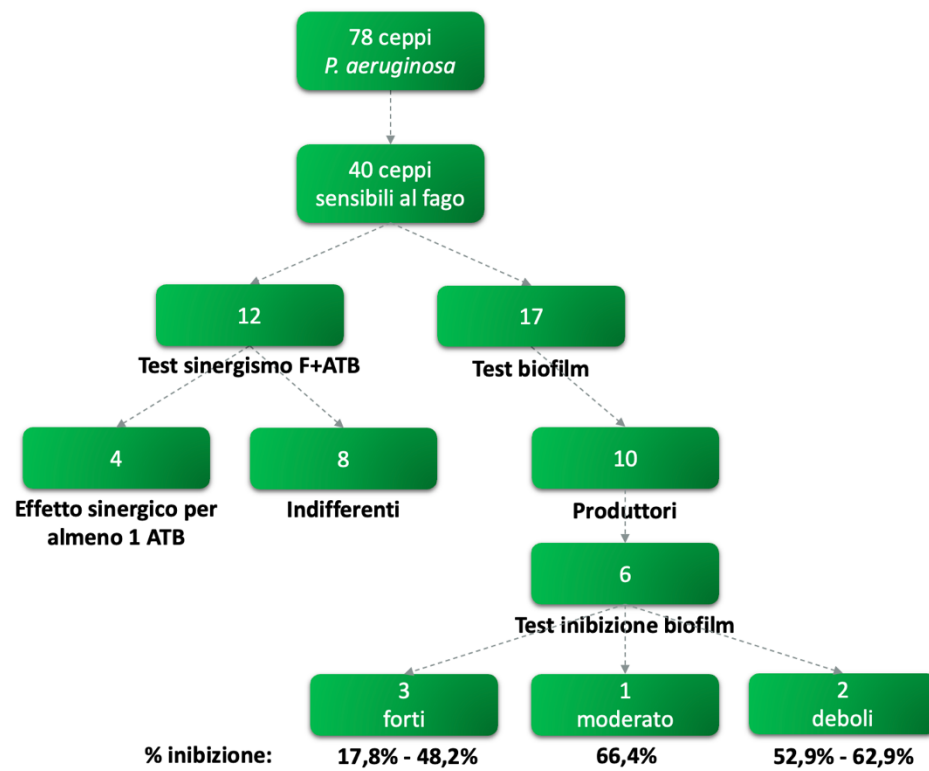
Mediante saggio colorimetrico con cristal violetto, è stata valutata la capacità di produzione del biofilm per 17 (42,5%) ceppi all'interno del pool di 40 sensibili al fago. I 10 (58,8%) ceppi produttori di biofilm sono stati classificati in 6 forti (+++), 2 produttori moderati (++) e 2 deboli (+). I risultati sono stati riportati nella Tabella 4. Di 6 ceppi risultati produttori, è stata testata la capacità del fago di inibire il biofilm prodotto ed è stata calcolata la percentuale di inibizione del biofilm dovuta all'azione del batteriofago. All'interno dei forti produttori la percentuale di inibizione varia tra 17,8% e 48,2%, tra i deboli e moderati produttori la percentuale varia tra 52,9% e 66,4%.

Tabella 4. Valutazione preliminare della capacità di produzione di biofilm nei ceppi clinici analizzati (n=17).

CEPPO	PRODUZIONE BIOFILM	INIBIZIONE (%)
1	-	
2	+	62,9%
3	++	
5	+++	48,2%
6	-	
7	+++	
14	-	
15	-	
18	-	
19	+++	
22	+	52,9%
26	+++	36,2%
29	+++	17,8%
30	++	66,4%
32	+++	
35	-	
36	-	

Non produttore: (-); debole produttore: (+); moderato produttore (++); forte produttore: (+++).

Figura 14. Rappresentazione schematica dei risultati ottenuti dallo studio sui ceppi di *P. aeruginosa*.



ATB: antibiotico; F: fago.

5. DISCUSSIONE

Nel presente studio sono stati analizzati 78 ceppi clinici di *P. aeruginosa*, isolati da differenti materiali biologici presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia U. dell'Ospedale Molinette di Torino. Gli isolati presentavano un profilo antimicrobico e caratteristiche fenotipiche eterogenee, comprendenti ceppi multisensibili, MDR, produttori di MBL e ceppi con fenotipo mucoside. Dei 78 ceppi, 40 (51,3%) sono risultati suscettibili all'attività del fago. Tale percentuale, suggerisce l'elevata specificità del batteriofago nei confronti di isolati batterici appartenenti alla stessa specie microbiologica, rimarcando l'importanza di effettuare test *in vitro* nell'ambito di una possibile applicazione clinica della terapia fagica (28,30,38). Tuttavia, l'efficacia del fago in oltre la metà dei ceppi testati assume particolare rilevanza clinica, soprattutto per quanto riguarda gli isolati MDR (8,9), per i quali potrebbe non essere disponibile un'alternativa terapeutica. Tra i 12 ceppi VIM analizzati, il 50% (n= 6/12) è risultato suscettibile al fago, indicando da una parte la terapia fagica come possibile opzione per ceppi con profilo antimicrobico altamente resistente, dall'altra sottolineando nuovamente come i test *in vitro* rimangano fondamentali. Per quanto riguarda i ceppi NDM (n=2), entrambi sono risultati sensibili al fago (100% di efficacia); nonostante il numero di NDM testati sia troppo basso per conferire all'efficacia del fago una significatività statistica su tale categoria di MBL, questo risultato è certamente incoraggiante. Per quanto riguarda i ceppi resistenti al MER, 19 su 35 isolati (54,3%) sono risultati suscettibili all'attività del batteriofago. Tale dato assume particolare rilevanza clinica, considerando che il meropenem rappresenta uno dei farmaci ad elevata attività nel trattamento delle infezioni gravi da *P. aeruginosa* (24). La resistenza a tale antibiotico, frequentemente associata a produzione di carbapenemasi, non sembra compromettere necessariamente la suscettibilità all'infezione fagica. Questo risultato suggerisce come la terapia fagica potrebbe rappresentare un'opzione complementare o alternativa nei confronti di ceppi resistenti ai carbapenemi, per i quali le opzioni terapeutiche risultano fortemente limitate. Per quanto riguarda il fenotipo mucoside, solo nel 25% dei ceppi (n= 2/8) è stata evidenziata l'attività litica del fago. Tale dato potrebbe suggerire come la capsula mucosa, fattore di virulenza che contraddistingue il suddetto fenotipo di *P. aeruginosa*, ostacoli l'attività litica del fago in esame (11,16,17). Tuttavia, è necessario testare un maggiore numero di PAMU per verificare tale ipotesi. La valutazione cinetica dell'attività

fagica è stata eseguita su 12 ceppi precedentemente classificati come suscettibili. In 9 ceppi (75%) è stata osservata una riduzione della crescita batterica, nell'arco delle 24 ore, dovuta all'attività fagica, mentre per 3 ceppi (25%) tale diminuzione non è stata riscontrata. Per gli isolati 5, 6, 14, 19, 22, 29 e 32 la diminuzione dell'OD è risultata particolarmente evidente nelle ultime misurazioni, soprattutto a T24. Questo andamento potrebbe essere dovuto non tanto alla mancata azione del fago nelle ore precedenti, quanto alla crescita lenta di *P. aeruginosa*, che non ha reso evidenziabile l'attività litica del batteriofago nelle prime ore del test. Per i ceppi 5 e 6 nelle prime ore l'OD del fago si è dimostrata addirittura superiore al controllo, per poi abbassarsi nelle ore successive, evidenziando probabilmente la necessità del fago di un periodo di incubazione per espletare la sua azione nei confronti di questi due isolati. Inoltre, per i ceppi 5, 6, 19, 22 e 29 a T24 si è osservata una parziale ricrescita batterica in presenza del fago, pur rimanendo al di sotto dei valori di OD del controllo positivo. Al contrario, nei ceppi 14 e 32 l'OD in presenza del fago è rimasta prossima allo zero per l'intera durata dell'esperimento, evidenziando una marcata suscettibilità e un'efficacia del fago persistente. Nei ceppi 1 e 2 l'azione del fago è risultata evidente già nelle prime ore (rispettivamente a T2 e T6), in quanto il batterio ha avuto una crescita più rapida. La riduzione dell'OD, prossima allo zero, si è mantenuta stabile fino a T10. A T24 è stata tuttavia rilevata una leggera ricrescita batterica insieme al fago, pur rimanendo al di sotto del controllo positivo. Nei ceppi 7, 18 e 26 non è stata osservata un'attività fagica significativa nelle 24 ore. Questo potrebbe essere riconducibile alla selezione di mutanti resistenti all'interno della popolazione batterica o ad una apparente sensibilità iniziale al fago degli isolati, indotta dal fenomeno di *lysis from without* causato da un elevato titolo fagico, e non riproducibile nel saggio in terreno liquido (44). Analizzando l'eventuale sinergismo tra il fago e gli antibiotici in esame, non è stato evidenziato alcun effetto antagonista, indicando la compatibilità dei due trattamenti (31,39,40). Inoltre, per alcuni ceppi è stato osservato un effetto sinergico, per uno o più antibiotici. In particolare, per il ceppo 6 si è evidenziato sinergismo con aztreonam ($\Delta E = 0,17$); il ceppo 14 ha mostrato attività sinergica con cefepime ed imipenem ($\Delta E \text{ FEP} = 0,11$; $\Delta E \text{ IPM} = 0,11$). Infine, per i ceppi 19 e 29 si è osservata sinergia con imipenem ($\Delta E = 0,16$; $\Delta E = 0,18$, rispettivamente). Per quanto riguarda lo studio inerente alla produzione di biofilm nei 17 ceppi testati, è stata evidenziata una distribuzione eterogenea tra non produttori, produttori deboli, moderati e forti, in linea con la nota variabilità fenotipica di *P. aeruginosa* (12–15). Nei ceppi produttori sottoposti a trattamento fagico, la riduzione della biomassa è

risultata variabile. In particolare, nei ceppi classificati come deboli o moderati produttori (ceppi 2, 22 e 30), si evidenziano percentuali di inibizione elevate (62,9%, 52,9% e 66,4%, rispettivamente), mentre nei ceppi forti produttori (ceppi 5, 26 e 29) la riduzione oscilla tra valori più elevati e valori più contenuti (48,2%, 36,2% e 17,8%, rispettivamente), rimarcando la variabilità del dato. Questi dati suggeriscono una possibile tendenza a una minore efficacia del fago nei biofilm più strutturati, sebbene il numero limitato di campioni analizzati non consenta, allo stato attuale, di trarre conclusioni definitive. Per i restanti ceppi, la percentuale di inibizione verrà calcolata in una fase successiva dell'analisi, al fine di consentire una valutazione più completa e statisticamente robusta dell'eventuale correlazione tra classe di produzione del biofilm ed efficacia del trattamento fagico. In definitiva, il fago sembra ridurre il biofilm ma non eradicarlo completamente. Questo è coerente con la struttura tridimensionale del biofilm e la limitata diffusione del fago negli strati profondi (12–15,32). In conclusione, per il presente studio, i limiti da considerare comprendono un numero esiguo di ceppi sensibili testati, l'assenza di caratterizzazione molecolare del meccanismo di adesione e penetrazione fago-ospite, nonché un modello *in vitro* che non riproduce completamente le condizioni *in vivo* (28,30). Ulteriori prospettive future potrebbero includere: un incremento del numero di ceppi in esame, per rafforzare la significatività statistica dei risultati ottenuti; l'analisi dell'espressione di recettori superficiali coinvolti nell'adsorbimento fagico (28,29); l'integrazione di studi *in vitro* con modelli *in vivo* o *ex vivo*; la valutazione del sinergismo tra fago e antibiotici in condizioni di biofilm, considerando che tale struttura rappresenta un microambiente caratterizzato da ridotta penetrazione antibiotica (15). La capacità del batteriofago di ridurre la biomassa potrebbe teoricamente favorire l'azione combinata con antibiotici, suggerendo un potenziale beneficio nelle infezioni croniche sostenute da *P. aeruginosa*.

6. CONCLUSIONI

L'analisi di un batteriofago isolato da un campione di espettorato conferisce un elevato valore traslazionale allo studio, in quanto riflette un'interazione fago-ospite già consolidata *in vivo* nel contesto fisiopatologico dell'ambiente polmonare umano. Inoltre, il presente studio conferma il potenziale terapeutico del trattamento fagico nei confronti di isolati clinici di *P. aeruginosa*, dimostrando come una quota significativa dei campioni analizzati risulti sensibile all'attività litica del batteriofago. La variabilità osservata nella risposta evidenzia la natura intrinsecamente specifica dell'interazione fago-ospite e ribadisce la necessità di una caratterizzazione preliminare dello spettro d'azione in un'ottica di applicazione clinica personalizzata. L'analisi del profilo di resistenza antibiotica ha messo in evidenza la presenza di ceppi MDR e produttori di metallo- β -lattamasi, confermando la complessità del contesto clinico in cui tali strategie alternative si inseriscono. In questo scenario, l'associazione fago-antibiotico ha mostrato risultati particolarmente promettenti: l'assenza di antagonismo e la presenza di interazioni sinergiche in specifici ceppi suggeriscono che la terapia combinata possa rappresentare una strategia razionale per potenziare l'efficacia antimicrobica, anche in presenza di meccanismi di resistenza consolidati. Il batteriofago ha mostrato una capacità variabile di riduzione della biomassa di biofilm, nonostante l'eterogeneità fenotipica dei ceppi, pur senza determinare un'eradicazione completa, dato coerente con la complessa struttura tridimensionale del biofilm e con la limitata diffusione negli strati più profondi. Nel complesso, i dati ottenuti supportano il potenziale utilizzo del batteriofago isolato come strumento complementare alla terapia antibiotica tradizionale, in particolare nel trattamento di infezioni sostenute da *P. aeruginosa* multiresistente e associate a biofilm. L'approccio combinato potrebbe contribuire a superare alcuni meccanismi di resistenza e a migliorare l'efficacia terapeutica in contesti clinici complessi. Nonostante i limiti già citati, tale studio fornisce evidenze sperimentali rilevanti e un solido razionale biologico per ulteriori sviluppi al fine di contribuire a definire il reale impatto clinico della terapia fagica combinata, aprendo la strada a strategie antimicrobiche più personalizzate e mirate nel contrasto delle infezioni da *P. aeruginosa* MDR.

7. BIBLIOGRAFIA

1. R. Murray P, S. Rosenthal K, A. Pfaller M. *Microbiologia medica*. Nona edizione. 2021.
2. Barbier M, Damron FH, Bielecki P, Suárez-Diez M, Puchałka J, Albertí S, et al. From the Environment to the Host: Re-Wiring of the Transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* from 22°C to 37°C. Roop RM, curatore. *PLoS ONE*. 24 febbraio 2014;9(2):e89941. doi:10.1371/journal.pone.0089941
3. Zago A, Chugani S. *Pseudomonas*. *Encyclopedia of Microbiology*. Third edition. Elsevier; 2009.
4. Deligianni E, Pattison S, Berrar D, Ternan NG, Haylock RW, Moore JE, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro. *BMC Microbiol*. dicembre 2010;10(1):38. doi:10.1186/1471-2180-10-38
5. Antonelli G, Galli R, Lazzarin C. *Microbiologia e Microbiologia Clinica*. Elsevier; 2018.
6. Chung J, Eisha S, Park S, Morris AJ, Martin I. How Three Self-Secreted Biofilm Exopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*, Psl, Pel, and Alginate, Can Each Be Exploited for Antibiotic Adjuvant Effects in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Int J Mol Sci*. 13 maggio 2023;24(10):8709. doi:10.3390/ijms24108709
7. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*. luglio 2000;2(9):1051–60. doi:10.1016/S1286-4579(00)01259-4
8. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. gennaio 2019;37(1):177–92. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
9. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant

- bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* marzo 2018;18(3):318–27. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3
10. Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. Fifth edition. 2020.
 11. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence*. *Front Cell Infect Microbiol.* 15 febbraio 2017;7. doi:10.3389/fcimb.2017.00039
 12. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. *Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections*. *Science.* 21 maggio 1999;284(5418):1318–22. doi:10.1126/science.284.5418.1318
 13. Flemming HC, Wingender J. *The biofilm matrix*. *Nat Rev Microbiol.* settembre 2010;8(9):623–33. doi:10.1038/nrmicro2415
 14. Donlan RM, Costerton JW. *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*. *Clin Microbiol Rev.* aprile 2002;15(2):167–93. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
 15. Stewart PS, William Costerton J. *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. *The Lancet.* luglio 2001;358(9276):135–8. doi:10.1016/S0140-6736(01)05321-1
 16. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. *Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis*. *Clin Microbiol Rev.* aprile 2002;15(2):194–222. doi:10.1128/CMR.15.2.194-222.2002
 17. Ciofu O, Tolker-Nielsen T, Jensen PØ, Wang H, Høiby N. *Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients*. *Adv Drug Deliv Rev.* maggio 2015;85:7–23. doi:10.1016/j.addr.2014.11.017
 18. O’Toole G, Kaplan HB, Kolter R. *Biofilm Formation as Microbial Development*. *Annu Rev Microbiol.* ottobre 2000;54(1):49–79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49

19. Ma LZ, Wang D, Liu Y, Zhang Z, Wozniak DJ. Regulation of Biofilm Exopolysaccharide Biosynthesis and Degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annu Rev Microbiol*. 8 settembre 2022;76(1):413–33. doi:10.1146/annurev-micro-041320-111355
20. Chew SC, Kundukad B, Seviour T, Van Der Maarel JRC, Yang L, Rice SA, et al. Erratum for “Dynamic Remodeling of Microbial Biofilms by Functionally Distinct Exopolysaccharides”. *mBio*. luglio 2015;6(3):e00688-15. doi:10.1128/mBio.00688-15
21. Wang S, Liu X, Liu H, Zhang L, Guo Y, Yu S, et al. The exopolysaccharide PSL–eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep*. aprile 2015;7(2):330–40. doi:10.1111/1758-2229.12252
22. Kovacs CJ, Rapp EM, Rankin WR, McKenzie SM, Brasko BK, Hebert KE, et al. Combinations of Bacteriophage Are Efficacious against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and Enhance Sensitivity to Carbapenem Antibiotics. *Viruses*. 21 giugno 2024;16(7):1000. doi:10.3390/v16071000
23. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*. marzo 2008;32(2):234–58. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x
24. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. agosto 2016;6(8):a025247. doi:10.1101/cshperspect.a025247
25. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. marzo 2010;54(3):969–76. doi:10.1128/AAC.01009-09
26. Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. gennaio 2009;22(1):161–82. doi:10.1128/CMR.00036-08
27. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-Spectrum Cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. maggio 2009;53(5):1766–71. doi:10.1128/AAC.01410-08
28. Clokie MRJ, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage*. gennaio 2011;1(1):31–45. doi:10.4161/bact.1.1.14942

29. Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST, Sullivan MB. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J.* 1 luglio 2017;11(7):1511–20. doi:10.1038/ismej.2017.16
30. Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe.* febbraio 2019;25(2):219–32. doi:10.1016/j.chom.2019.01.014
31. Chaudhry WN, Concepción-Acevedo J, Park T, Andleeb S, Bull JJ, Levin BR. Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Rozen DE, curatore. *PLOS ONE.* 11 gennaio 2017;12(1):e0168615. doi:10.1371/journal.pone.0168615
32. Harper D, Parracho H, Walker J, Sharp R, Hughes G, Werthén M, et al. Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics.* 25 giugno 2014;3(3):270–84. doi:10.3390/antibiotics3030270
33. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev.* luglio 2013;26(3):547–603. doi:10.1128/CMR.00072-12
34. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15.0, 2025 [Internet]. Sweden: EUCAST; 2025. Report No. Disponibile su: <https://www.eucast.org/>
35. Talon D. Activity of cefepime against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 1 dicembre 1997;40(6):909–10. doi:10.1093/jac/40.6.909
36. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, curatori. *Bacteriophages* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [citato 16 febbraio 2026]. p. 69–76. (Walker JM, ed. *Methods in Molecular Biology*). Disponibile su: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-164-6_7 doi:10.1007/978-1-60327-164-6_7

37. Wang H, Gu CM, Xu S, Wang H, Zhao X, Gu L. Measurement of optical density of microbes by multi-light path transmission method. *mLife*. dicembre 2024;3(4):565–72. doi:10.1002/mlf2.12147
38. Aslam S, Lampley E, Wooten D, Karris M, Benson C, Strathdee S, et al. Lessons Learned From the First 10 Consecutive Cases of Intravenous Bacteriophage Therapy to Treat Multidrug-Resistant Bacterial Infections at a Single Center in the United States. *Open Forum Infect Dis*. 1 settembre 2020;7(9):ofaa389. doi:10.1093/ofid/ofaa389
39. Fouquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect*. giugno 2015;3(3):e00149. doi:10.1002/prp2.149
40. Tang J, Wennerberg K, Aittokallio T. What is synergy? The Saariselkä agreement revisited. *Front Pharmacol*. 1 settembre 2015;6. doi:10.3389/fphar.2015.00181
41. Gupta N, Chaudhry R, Thakur C. Determination of cutoff of ELISA and immunofluorescence assay for scrub typhus. *J Glob Infect Dis*. 2016;8(3):97. doi:10.4103/0974-777X.188584
42. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*. 4 maggio 2017;43(3):313–51. doi:10.1080/1040841X.2016.1208146
43. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. marzo 2012;18(3):268–81. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
44. Abedon ST. Lysis from without. *Bacteriophage*. gennaio 2011;1(1):46–9. doi:10.4161/bact.1.1.13980

RINGRAZIAMENTI