

Effetti antibatterici e anti-biofilm dell'acqua termale radioattiva

A.C. IONESCU¹, R. MATTINA¹, E. BRAMBILLA¹, M. RALLI²,
F.M. PASSALI³, D. PASSALI⁴

¹Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche ed Odontoiatriche, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

²Dipartimento Organi di Senso, Università La Sapienza di Roma, Roma, Italia

³Dipartimento di Otorinolaringoiatria, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma, Italia

⁴Dipartimento di Otorinolaringoiatria, Università degli Studi di Siena, Siena, Italia

Sommario. – **OBIETTIVO:** la maggior parte delle infezioni del tratto respiratorio superiore è causata da microrganismi che formano biofilm e che appartengono al genere *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Enterobacter*. Molti di questi microrganismi sono resistenti agli antibiotici, in parte per via della formazione di biofilm. Il trattamento di queste affezioni può includere terapie inalatorie con acqua termale radioattiva. Il presente studio mira a valutare gli effetti anti-biofilm in vitro dell'acqua termale radioattiva raccolta presso le terme di Merano, in Italia.

MATERIALI E METODI: è stata condotta una serie di esperimenti per valutare gli effetti dell'acqua termale radioattiva sulle colture planctoniche (1 ora di esposizione) e sui biofilm (10 minuti e 1 ora di esposizione) formati da *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. La biomassa vitale è stata vagliata utilizzando un saggio colorimetrico. Per valutare gli effetti anti-biofilm dell'acqua termale radioattiva dal punto di vista morfologico è stato utilizzato un modello basato sull'infezione di un epitelio respiratorio umano ricostituito per mezzo degli stessi ceppi.

RISULTATI: le acque termali radioattive hanno ridotto la vitalità delle colture planctoniche di *S. aureus* e *S. pneumoniae* di circa il 20%. Le acque termali radioattive hanno anche ridotto la vitalità del biofilm di tutti i ceppi ad eccezione dell'*E. coli* in entrambi i periodi di riferimento. Nel modello dell'epitelio respiratorio umano ricostituito, sono state rilevate aderenza e colonizzazione batterica in tutti i campioni, indice di una particolare affi-

nità con le ciglia dell'epitelio. Le infezioni batteriche hanno alterato la struttura dell'epitelio in modo significativo, con un aumento dello spazio intercellulare e danni alla struttura cellulare. I campioni infettati da *S. aureus* hanno mostrato livelli di colonizzazione leggermente inferiori dopo il trattamento con acque termali radioattive.

CONCLUSIONI: i risultati di questo studio in vitro hanno mostrato i significativi effetti delle acque termali radioattive sulle cellule batteriche planctoniche Gram positive e una rilevante attività anti-biofilm.

Parole chiave:

Acqua termale, infezioni del tratto respiratorio, biofilm, epitelio ricostituito, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli.

Introduzione

Le infezioni del tratto respiratorio costituiscono un problema importante per la salute pubblica, in particolare in soggetti più anziani, essendo la principale causa di morbilità. La maggior parte di queste infezioni riguarda il tratto respiratorio superiore e la specie più comune coinvolta appartiene al genere *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, and *Enterobacter*¹⁻⁵. Molti di questi microrganismi sono resistenti agli antibiotici più comunemente usati in medicina generale, quali ampicillina, amoxicillina o kanamicina^{6,7}. Questo problema limita le opzioni di trattamento di tali infezioni^{8,9} e inco-

raggia la ricerca di terapie alternative.

La maggior parte di questi microrganismi forma anche biofilm; la formazione di biofilm favorisce in modo stabile la colonizzazione dell'epitelio del tratto respiratorio, causando infezioni croniche e ricorrenti^{4,10-12}. L'organizzazione del biofilm permette l'implementazione di molte strategie, tra cui la comunicazione intercellulare (quorum sensing) che contribuisce a una resistenza più tenace agli antimicrobici¹⁰. Le strutture cellulari quali i flagelli, i pili e la matrice extracellulare sono fondamentali per l'aderenza e la colonizzazione iniziale, rendendo le specie di *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* particolarmente adatte allo sviluppo di tali infezioni croniche¹³. In più, il biofilm rilascia cellule microbiche planctoniche a seguito dell'attività di disseminazione, permettendo un'ulteriore colonizzazione. Ne consegue che i biofilm possono fungere da nuclei d'infezione che possono creare nuovi nidi metastatici¹⁴, svolgendo quindi anche un ruolo fondamentale nella patogenesi delle infezioni ricorrenti che interessano il tratto respiratorio.

Il radon ²²²Rn è un prodotto del decadimento dell'uranio ²³⁸U con un tempo di dimezzamento relativamente breve (circa 91 h); il ²²²Rn raggiunge la superficie terrestre per mezzo di varie fonti, tra cui le acque termali e contribuisce in modo significativo all'esposizione umana alle radiazioni¹⁵⁻¹⁸. La radioattività di questo elemento si basa sulla generazione di particelle α con un'energia cinetica molto elevata e una bassa capacità di penetrazione, il che permette di agire al contatto con tessuti e biofilm¹⁹.

Le sorgenti termali situate a Merano, in Italia, rappresentano una fonte di radioattività che, secondo quanto riportato, può raggiungere 481 Bq/l^{20,21}. Il trattamento di affezioni croniche del tratto respiratorio superiore, sia in adulti che in bambini, spesso prevede terapie inalatorie con acqua termale radioattiva^{20,22-24}. Ciò nonostante, il meccanismo terapeutico di questo tipo di trattamento non è del tutto chiaro. Il ²²²Rn è noto per la sua attività antiossidante e come inibitore della risposta immunitaria nel corpo umano^{25,26}. La sua azione potrebbe essere dovuta alla sua in-

terazione con i componenti lipidici della membrana delle cellule eucariote. È stato suggerito che il ²²²Rn possa anche interagire con i lipidi delle pareti delle cellule batteriche, influenzandone verosimilmente la crescita²⁶. Attualmente, non esistono linee guida relative all'uso delle acque termali radioattive per il trattamento di infezioni croniche del tratto respiratorio associate a biofilm²⁷.

Con il presente studio si desidera valutare gli effetti anti-biofilm in vitro dell'acqua termale radioattiva di Merano. L'ipotesi nulla è che non vi siano particolari differenze negli effetti anti-biofilm tra l'acqua termale radioattiva e l'acqua delle condotte idriche.

Materiali e metodi

Raccolta di campioni di acqua

L'acqua termale radioattiva in esame è stata raccolta in bottiglie di vetro pyrex tramite getto d'acqua senza turbolenza, evitando così la formazione di bolle d'aria. L'acqua termale è stata esaminata entro quattro ore dal campionamento, quando ancora era presente il 97% dell'attività residua, per ridurre al minimo la perdita di radon per decadimento. L'attività misurata del ²²²Rn presso la fonte di raccolta era pari a 2050 Bq/l e l'attività residua dell'acqua termale testata era di 1988,5 Bq/l. Gli effetti anti-biofilm dell'acqua termale radioattiva sono stati messi a confronto con quelli dell'acqua raccolta dalle condotte idriche, subito prima di iniziare con gli esperimenti. La composizione dell'acqua termale radioattiva e dell'acqua delle condotte idriche è indicata nella tabella I. Tutti i campioni di acqua sono stati sterilizzati per filtrazione (filtro Millipore, 0,2 μ m). È stato eseguito un esperimento preliminare per escludere che le procedure di filtrazione potessero in alcun modo influenzare la radioattività residua dell'acqua termale radioattiva.

Procedure microbiologiche

I terreni di coltura e i reagenti sono stati acquistati presso Becton-Dickinson (BD Diagnostics-Difco, Franklin Lakes, NJ, USA). Le piastre in

polistirene multi-pozzetto trattate per colture di tessuti (Nunc da 96, 48 e 24 pozzetti) sono state acquistate presso Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Lo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e il ceppo di *Streptococcus pneumoniae* isolato da un paziente colpito da infezione del tratto respiratorio superiore e inferiore sono stati coltivati su un terreno Columbia Agar addizionato con un 5% di sangue di montone. Le piastre sono state incubate a 37°C in un'atmosfera con il 5% di CO₂ per 48 ore. Dopo una notte in incubazione a 37°C in un'atmosfera con il 5% di CO₂, per ciascun microrganismo è stata ottenuta una sospensione in infuso di cuore-cervello. Le cellule batteriche sono state raccolte per centrifugazione (2200 giri al minuto, 19°C, 5 minuti), sono state lavate due volte in un tampone fosfato salino e quindi rimesse in sospensione nella stessa soluzione tampone. Ciascuna sospensione è stata sottoposta a ultrasuoni per promuovere la dispersione degli aggregati batterici (Sonifier modello B-15, Branson, Danbury, CT, USA, 7W per 30 s) e è stata regolata a 0,3 unità di assorbanza (densità ottica) utilizzando uno spettrofotometro a 550 nm (Genesys 10-S, ThermoSpectronic,

Rochester, NY, USA). Questo valore corrisponde a una concentrazione microbica di circa 6,00 × 10⁸ cellule/ml.

Valutazione degli effetti dell'acqua termale radioattiva sulle cellule batteriche nella fase planctonica

Per questo test, ad ogni pozzetto delle piastre da 48 pozzetti sono stati aggiunti un totale di 500 µl di ciascuna sospensione batterica e 500 µl di acqua. Per ciascun microrganismo sono stati utilizzati 32 pozzetti; 16 pozzetti sono stati incubati con l'acqua termale radioattiva mentre l'altra metà (n = 16) sono stati incubati con l'acqua delle condotte idriche. Le piastre sono state incubate a 37°C in un'atmosfera con il 5% di CO₂ per un'ora. In ogni pozzetto inoculato con acqua termale, alle cellule batteriche in un'ora è stata fornita una dose di circa 1 Bq, ottenendo circa 3600 disintegrazioni. Successivamente, è stata eseguita la valutazione delle cellule batteriche vitali utilizzando un test colorimetrico basato sulla riduzione di un sale di tetrazolio (saggio MTT)

Valutazione degli effetti dell'acqua termale radioattiva sui biofilm

Per questo test, in ciascun pozzetto delle piastre da 96 pozzetti sono stati inseriti un totale di 20 µl di ciascuna sospensione batterica e 180 µl di infuso di cuore-cervello sterile. Per ciascun microrganismo sono stati utilizzati sessantaquattro (64) pozzetti. Le piastre sono state incubate a 37°C in un'atmosfera con il 5% di CO₂ per 24 ore per sviluppare un biofilm multistrato. Successivamente, il terreno di coltura è stato rimosso, aspirandolo con delicatezza, e i pozzetti sono stati lavati tre volte con 100 µl di tampone fosfato salino sterile. Ai pozzetti sono stati aggiunti 200 µl in totale di acqua sterile per filtrazione (acqua termale radioattiva, n = 32 e acqua condotte idriche, n = 32). Le piastre sono state incubate per altri 10 minuti (n = 16) o un'ora (n = 16) alle stesse condizioni descritte precedentemente.

In ciascun pozzetto inoculato con acqua termale radioattiva, è stata fornita una dose di circa 0,4 Bq in 10 min o un'ora, ottenendo rispettivamente circa 240 e 1440 disintegrazioni. Al ter-

Tabella I. Analisi chimica dell'acqua di controllo (acqua dalle condotte idriche).

Costituente	
pH	7,6
Solidi totali disciolti	384 mg/L
Durezza	31 °F
Conduttività elettrica	591 µS/cm, 20 °C
Ca	83 mg/L
Mg	18,9 mg/L
NH ₄	< 0,10 mg/L
Cl	34 mg/L
SO ₄	54 mg/L
K	2 mg/L
Na	18 mg/L
AS	< 2 µg/L
CO ₃	234 mg/L
F	< 0,5 mg/L
NO ₃	31 mg/L
NO ₂	< 0,20 mg/L
Mn	< 1 µg/L

mine del periodo di incubazione, la sospensione è stata rimossa dai pozzetti, aspirando con delicatezza. Quindi i pozzetti sono stati lavati attentamente per tre volte con tampone fosfato salino sterile per rimuovere le cellule non aderenti. Dopodiché è stata eseguita la valutazione della biomassa vitale utilizzando un saggio MTT.

Questo esperimento è stato ripetuto dopo dieci giorni, utilizzando la stessa configurazione, esponendo i biofilm ai campioni di acqua per un'ora. I biofilm trattati con acqua termale radioattiva sono stati quindi esposti a un'attività residua del ^{222}Rn stimata di circa il 16% rispetto all'attività iniziale (318 Bq/l).

Valutazione delle cellule batteriche vitali

Il saggio MTT è stato eseguito come descritto²⁸ in precedenza. In breve, sono state preparate due soluzioni madre iniziali contenenti l'MTT sciogliendo 5 mg/ml di bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio in tampone fosfato salino sterile e 0,3 mg/ml di N-metilfenazina-metisolfato (PMS) in tampone fosfato salino sterile. Le soluzioni sono state conservate a 2°C in fiale al riparo dalla luce fino al giorno dell'esperimento quando è stata realizzata una soluzione di misurazione fresca (FMS) mischiando 1 ml di soluzione madre di MTT, 1 ml di soluzione madre di PMS e 8 ml di tampone fosfato salino sterile. È stata preparata una soluzione lisante (LS) sciogliendo sodio dodecile solfato al 10% v/v e dimetilformammide al 50% v/v in acqua distillata.

Al termine del periodo di incubazione, le piastre sono state sottoposte al saggio MTT per valutare la biomassa aderente, vitale e metabolicamente attiva come segue: 200 µl di FMS sono stati introdotti per mezzo di una pipetta in ciascun pozzetto delle piastre da 48 pozzetti utilizzate per determinare gli effetti sulle colture planctoniche. In ciascun pozzetto delle piastre da 96 pozzetti utilizzate per gli esperimenti per la formazione di biofilm sono stati introdotti in totale 100 µl di FMS per mezzo di una pipetta. Tutte le piastre sono state incubate a 37°C al riparo dalla luce per un'ora.

Durante l'incubazione, il trasporto di elettro-

ni attraverso la membrana plasmatica microbica e, in misura minore, il sistema microbico di ossidoriduzione hanno convertito il sale giallo MTT in formazano viola insolubile. La conversione è stata agevolata dall'accettore intermedio di elettroni (PMS). Dopodiché, sono stati trasferiti 500 µl in totale da ciascun pozzetto delle piastre da 48 pozzetti in nuove piastre e sono stati aggiunti 500 µl di LS. Nelle piastre da 96 pozzetti, la FMS nella quale non è avvenuta alcuna reazione è stata rimossa con delicatezza dai pozzetti tramite aspirazione e i cristalli di formazano sono stati quindi sciolti aggiungendo 100 µl di LS in ciascun pozzetto. Tutte le piastre sono state quindi incubate a temperatura ambiente, al riparo dalla luce, per un'ora. Da ciascun pozzetto sono stati trasferiti nelle nuove piastre da 96 pozzetti 90 µl di sospensione ed è stata misurata l'assorbanza (densità ottica a 550 nm - Genesys 10-S).

Valutazione degli effetti dell'acqua termale radioattiva sui biofilm sviluppati su un modello di epitelio ricostituito delle vie respiratorie

Per simulare le condizioni cliniche il più accuratamente possibile, è stato preso un modello di epitelio respiratorio umano ricostituito (piastre MucilAir™, Epithelix Sàrl, Plan-les-Ouates, Ginevra, Svizzera) ed è stato infettato con i diversi ceppi per poi essere utilizzato per valutare gli effetti dell'acqua termale radioattiva sulla formazione di biofilm.

Per questo esperimento sono stati utilizzati un totale di 30 epitelii respiratori umani ricostituiti (sei campioni per ciascun microrganismo testato e sei campioni di controllo). I campioni sono stati spediti in piastre da 24 pozzetti contenenti un terreno nutritivo per il trasporto con agarosio. Al momento dell'arrivo in laboratorio, i sacchetti contenenti i campioni sono stati aperti sotto una cappa a flusso laminare. I campioni sono stati estratti dalle piastre di trasporto e l'agarosio è stato rimosso. Quindi i campioni sono stati posizionati in piastre da 6 pozzetti con un terreno nutritivo (terreni di coltura RPMI-1640 con l'aggiunta del 20,0% di siero fetale bovino, 1,0% di L-glutamina e 1,0% penicillina/

streptomycin). Prima di effettuare il test, le piastre con le colture sono state incubate a 37°C in un'atmosfera con il 5% di CO₂ saturata di umidità, per una notte.

Per questo studio è stato utilizzato un bioreattore di flusso a goccia (MDFR) (immagine 1). Il dispositivo è una versione modificata del reattore di flusso a goccia disponibile in commercio (DFR 110, Biosurface Technologies, Bozeman, MT, USA). Il design modificato ha permesso di posizionare vassoi personalizzati sul fondo delle camere di flusso continuo e di immergere le provette di epitelio respiratorio umano ricostituito sottoposte a sostentamento d'aria nel terreno nutritivo circostante a flusso continuo^{29,30}. Tutte le tubazioni e i vassoi contenenti i campioni del MDFR sono stati sterilizzati prima dell'inizio dell'esperimento, utilizzando un sistema di sterilizzazione a base di perossido di idrogeno (Sterrad, ASP, Irvine, Ca, USA). Limitando la temperatura massima a 45°C si evita di danneggiare l'intero sistema a causa del calore. Il MDFR è stato montato all'interno di una cappa sterile. I campioni sono stati posizionati in cinque vassoi in politetrafluoroetilene (PTFE) contenenti sei buchi ciascuno, in grado di fissare i campioni ed esporre le loro superfici al terreno a flusso continuo. Tutti i vassoi sono stati fissati al fondo delle camere di flusso continuo del MDFR e sono

stati immediatamente inoculati con nuovo terreno nutritivo. Il MDFR è stato trasferito in un incubatore in funzione a 37°C, con il 5% di CO₂ e un'atmosfera saturata di umidità. Quindi è stata accesa una pompa peristaltica multicanale con controlli computerizzati (RP-1, Rainin, Emeryville, CA, USA) per fornire un flusso costante di terreno nutritivo attraverso le camere di flusso (9,6 ml/h).

Dopo 24 ore, la pompa si è fermata e un totale di 100 µl di ciascuna sospensione batterica è stata trasferita sulla superficie di ciascuno dei sei campioni nelle prime quattro camere a flusso continuo, utilizzando una pipetta. La camera a flusso continuo rimasta è stata utilizzata come controllo negativo. Il bioreattore è stato lasciato in funzione per altre 24 ore per permettere lo sviluppo di un biofilm multistrato sulle superfici dell'epitelio respiratorio umano ricostituito. Dopodiché, il flusso è stato interrotto, i campioni sono stati estratti con attenzione e i tre campioni per ciascun gruppo sono stati esposti a ciascuna delle acque testate (acqua termale radioattiva e acqua delle condotte idriche). Dopo un'ora, gli aspetti morfologici dei campioni sono stati valutati utilizzando un microscopio elettronico a scansione (SEM).

Analisi morfologica utilizzando un microscopio elettronico a scansione (SEM)

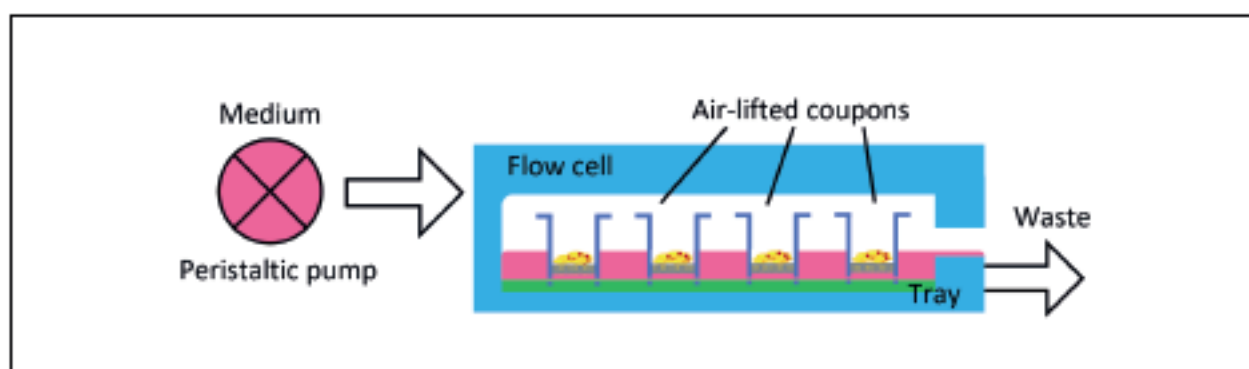


Immagine 1. Diagramma del funzionamento di un bioreattore contenente campioni di epitelio respiratorio umano ricostituito. La pompa peristaltica offre un flusso costante del terreno addizionato alle camere a flusso continuo per l'arco di tempo specificato. È stato possibile infettare i campioni con i ceppi batterici testati rimuovendo il coperchio del bioreattore in condizioni sterili. Allo stesso modo, è stato possibile esporre i campioni all'acqua di controllo o in esame.

I campioni soggetti all'analisi con SEM sono stati risciacquati tre volte con delicatezza con tampone fosfato salino sterile per rimuovere le cellule non aderenti, per poi essere posti in una soluzione fissativa di glutaraldeide al 2% disciolto in una soluzione tampone di cacodilato (pH = 7,4) per 48 ore. I campioni sono stati poi passati attraverso una serie di etanolo graduato (concentrazione del 50, 70, 80, 85, 90, 95 e 100%, v/v). Infine, i campioni sono stati sottoposti al punto critico di essiccazione (impianto essiccatore supercritico, EMS 850, Hatfield, PA, USA), sono stati montati su montanti con colla conduttiva, sono stati sottoposti a sputter coating (JEOL FFC-1100, Japan) per poi essere analizzati con un microscopio elettronico a scansione (JEOL JSM-840A, Japan) con un ingrandimento di $5000 \times 15000 \times$. Per ciascun campione sono stati testati quattro punti selezionati in modo casuale.

Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state effettuate

utilizzando il software JMP 10.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). La normale distribuzione dei dati della biomassa vitale è stata controllata tramite il test di Shapiro-Wilk. L'omogeneità delle varianze è stata verificata tramite il test di Levene. Le medie e gli errori standard sono stati calcolati a partire dai dati non ancora elaborati. L'analisi della varianza a due fattori (ANOVA) è stata effettuata considerando il microrganismo e l'acqua come fattori fissi. Il test HSD di Tukey (honestly significant difference) è stato utilizzato come test post-hoc. Il livello di significatività è stato impostato a $p < 0,05$.

Risultati

Valutazione della biomassa vitale (saggio MTT)

I risultati relativi agli effetti dell'acqua termale radioattiva sulle cellule planctoniche sono indicati nell'immagine 2A. Entrambi i fattori hanno influito in modo molto significativo sul-

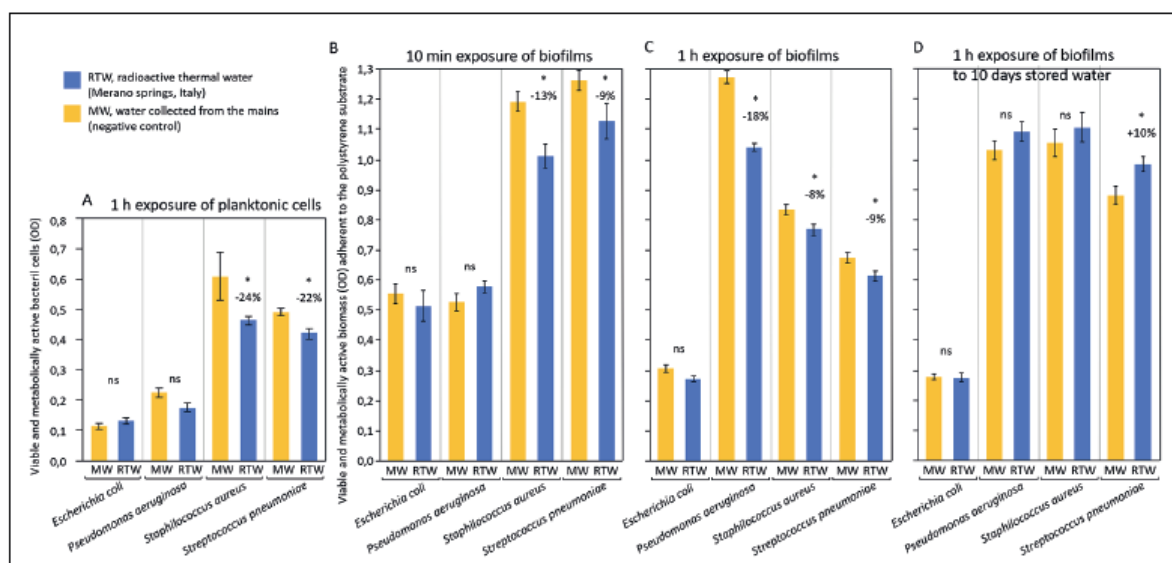


Immagine 2. I risultati del saggio della biomassa vitale sono riportati nel riquadro come medie \pm 1 SE. A, Valutazione degli effetti dell'acqua termale radioattiva sulle cellule batteriche nella fase planctonica; B, Valutazione degli effetti dell'acqua termale radioattiva sui biofilm dopo un'esposizione di 10 minuti o dopo un'esposizione di un'ora (C); D, Valutazione degli effetti residui dell'acqua termale radioattiva conservata per dieci giorni sui biofilm dopo un'esposizione di un'ora. I risultati delle analisi statistiche sono riportati come [ns] = non sono state registrate differenze significative tra l'acqua testata e l'acqua di controllo ($p > 0,05$) o [* , $\pm xx\%$] = è stata rilevata una differenza significativa e viene indicata la percentuale di riduzione o di aumento della vitalità batterica dei gruppi trattati con l'acqua termale radioattiva rispetto all'acqua di controllo.

la vitalità delle cellule e non è stata evidenziata alcuna interazione tra di loro. Dopo essere stati esposti all'acqua termale radioattiva, *S. aureus* e *S. pneumoniae* hanno registrato una considerevole riduzione della vitalità delle cellule (rispettivamente 24%, $p=0,002$ e 22%, $p=0,039$ rispetto all'acqua di controllo delle condotte idriche). Non è stata registrata nessuna differenza significativa per gli altri due microrganismi testati.

Gli effetti dell'acqua termale radioattiva sui biofilm dopo un'esposizione di 10 minuti e di un'ora sono rappresentati rispettivamente nell'immagine 2B e 2C.

Dopo un'esposizione di 10 minuti, l'ANOVA ha mostrato che entrambi i fattori hanno influito sulla formazione di biofilm in modo rilevante, con una significativa interazione tra loro ($p=0,022$). Dopo l'esposizione all'acqua termale radioattiva, *S. aureus* e *S. pneumoniae* hanno registrato una significativa riduzione della vitalità cellulare (rispettivamente 13%, $p<0,001$ e 9%, $p=0,019$ rispetto all'acqua di controllo delle condotte idriche)

Dopo un'esposizione di un'ora, l'ANOVA ha mostrato che entrambi i fattori hanno influito sulla formazione di biofilm in modo rilevante, con una significativa interazione tra loro ($p=0,001$). Dopo l'esposizione all'acqua termale radioattiva, *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *P. aeruginosa* hanno registrato una significativa riduzione della vitalità cellulare (rispettivamente 8%, $p<0,001$, 9%, $p=0,037$ e 18%, $p<0,001$ rispetto all'acqua di controllo delle condotte idriche)

Gli effetti dell'acqua termale radioattiva conservata per 10 giorni sui biofilm (esposizione di un'ora) sono indicati nell'immagine 2D. È stata rilevata un'influenza significativa per quanto riguarda il fattore microrganismo ($p<0,001$), mentre il fattore acqua è da considerarsi non significativo ($p=0,072$). Inoltre non vi è stata alcuna interazione tra i fattori ($p=0,442$). Dopo l'esposizione all'acqua termale radioattiva, *S. pneumoniae* ha registrato un significativo aumento della vitalità cellulare (10%, $p=0,026$, rispetto all'acqua di controllo).

Analisi morfologica (SEM)

Gli aspetti morfologici dell'epitelio ricostituito infettato dai microrganismi in esame ed esposto all'acqua termale radioattiva e all'acqua delle condotte idriche sono indicati nell'immagine 3. Tutte le osservazioni hanno presentato aderenza e colonizzazione batterica, indice di una particolare affinità con le ciglia dell'epitelio. L'infezione batterica ha alterato la struttura dell'epitelio in modo significativo, con un aumento degli spazi intercellulari e danni alla struttura cellulare stessa. I campioni infettati da *S. aureus* hanno mostrato livelli di colonizzazione leggermente inferiori dopo il trattamento con acque termali radioattive, se confrontati con l'acqua di controllo delle condotte idriche, in accordo con i dati sulla biomassa vitale. Non è stato rilevato alcun effetto dell'acqua termale radioattiva sulla colonizzazione degli altri microrganismi. Inoltre non è stato rilevato alcun effetto dell'acqua termale radioattiva sui campioni di epitelio respiratorio umano ricostituito non infettati, i quali hanno tutti conservato pienamente le loro caratteristiche anatomiche.

Discussione

L'epitelio del tratto respiratorio funge da interfaccia complessa con l'ambiente esterno e si trova ad affrontare ripetutamente le sfide poste da patogeni, allergeni e inquinanti²⁰. L'infezione del tratto respiratorio è strettamente collegata a microrganismi patogeni in grado di formare biofilm. Questa caratteristica comporta il confinamento dei batteri in un punto specifico e la possibilità di resistere all'eradicazione per mezzo di terapia antibiotica, nonostante la suscettibilità delle cellule batteriche agli antibiotici durante la fase planctonica¹⁰. Di conseguenza, questo fenomeno è spesso collegato alla cronicizzazione delle infezioni associate a biofilm. I trattamenti di affezioni croniche del tratto respiratorio possono comprendere terapie inalatorie con acqua termale. Tuttavia, attualmente non esistono linee guida a proposito, per via dell'incertezza riguardo alle indicazioni e ai meccanismi di azione²⁷.

La composizione, le proprietà e le possibili indicazioni delle acque termali, anche quelle

radioattive, sono generalmente ben note. Ciò nonostante, non esistono dati certi sugli effetti dell'acqua termale radioattiva sui biofilm e sulle infezioni del tratto respiratorio associate a biofilm.

I nostri risultati hanno mostrato che l'acqua termale radioattiva in esame è stata in grado di ridurre in modo significativo la vitalità delle cellule delle colture planctoniche di alcuni dei patogeni più comuni, coinvolti nelle infezioni del tratto respiratorio. La riduzione varia in base al ceppo. L'acqua termale radioattiva ha avuto effetti significativi sui batteri Gram positivi (*S. aureus*, *S. pneumoniae*) ma non su quelli Gram negativi (*P. aeruginosa*, *E. coli*). L'acqua in esame ha anche ridotto la vitalità del biofilm degli stessi microrganismi su un substrato standard

di polistirene, dopo un'esposizione di 10 minuti. Dopo un'esposizione prolungata (un'ora) è stata rilevata una riduzione della vitalità anche dei biofilm di *P. aeruginosa*. Quindi, l'ipotesi nulla che non vi siano particolari differenze negli effetti anti-biofilm tra l'acqua termale radioattiva e l'acqua delle condotte idriche è stata respinta.

È interessante notare che l'acqua termale radioattiva che è stata ritestata dopo un periodo di conservazione di dieci giorni non ha mostrato alcun effetto di riduzione sulla vitalità del biofilm. Quest'ultimo esperimento prova che gli effetti anti-biofilm dell'acqua termale in esame scompaiono nel tempo, il che suggerisce vi sia un legame con la sua radioattività.

L'acqua termale radioattiva non ha avuto alcun effetto sull'epitelio respiratorio umano

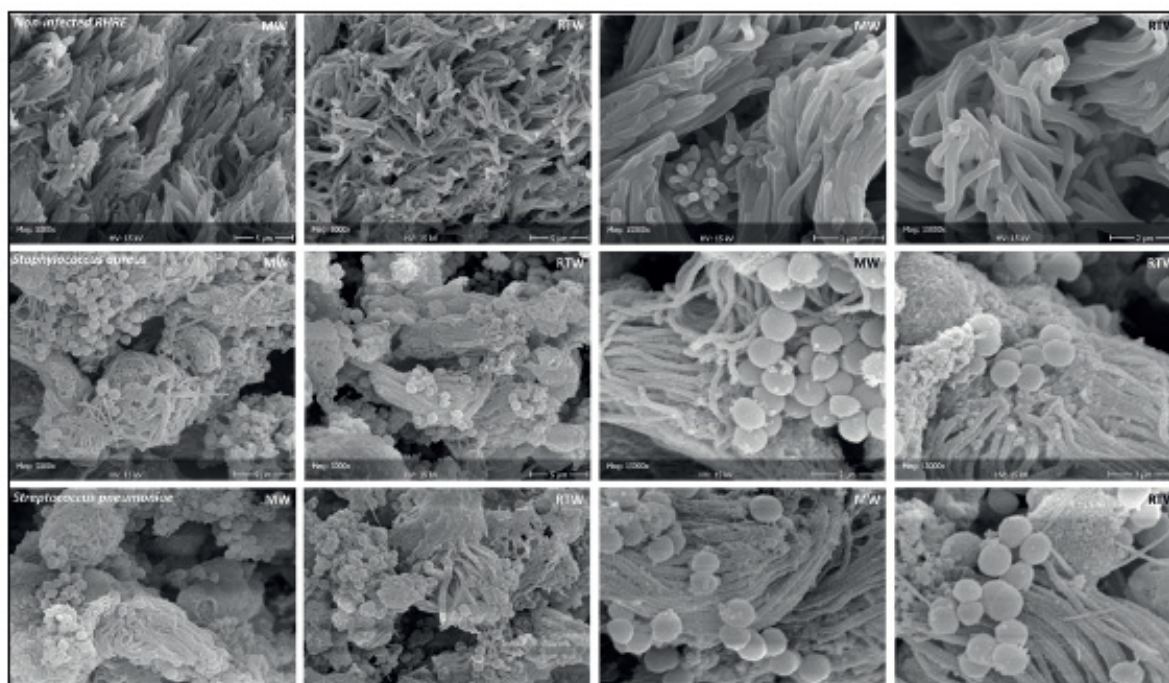


Immagine 3. Analisi SEM del modello di epitelio respiratorio umano ricostituito. Gli epitelii non infettati hanno conservato pienamente le loro caratteristiche anatomiche. Non è stato rilevato alcun effetto dell'esposizione all'acqua termale radioattiva sui campioni di epitelio respiratorio umano ricostituito non infettati. Sono qui presentate le micrografie che riproducono l'infezione dell'epitelio respiratorio umano ricostituito da parte dei batteri Gram positivi in esame. Tutte le osservazioni hanno presentato aderenza e colonizzazione batterica, indice di una particolare affinità con le ciglia dell'epitelio. L'infezione batterica ha alterato la struttura dell'epitelio in modo significativo, con un aumento degli spazi intercellulari e danni alla struttura cellulare stessa. I campioni infettati da *S. aureus* hanno mostrato livelli di colonizzazione leggermente inferiori dopo il trattamento con acque termali radioattive, se confrontati con l'acqua di controllo delle condotte idriche, in accordo con i dati sulla biomassa vitale. Non sono stati rilevati altri effetti dell'acqua termale radioattiva sull'infezione degli altri microrganismi in esame (micrografie non presenti).

ricostituito. Al contrario, i campioni infettati con *S. aureus* hanno mostrato una formazione di biofilm leggermente inferiore dopo il trattamento con l'acqua termale radioattiva rispetto ai campioni di controllo.

La possibilità di coltivare l'epitelio respiratorio umano ricostituito in vitro è una prospettiva davvero promettente, poiché permette di replicare le condizioni cliniche in modo realistico. Ne sono un esempio gli studi sull'efficacia di nuovi farmaci o composti di cui non si conoscono gli effetti sui tessuti umani³¹. Tuttavia, uno svantaggio di questo sistema è che specifiche condizioni, quali la rinite allergica o altre affezioni croniche non possono essere ancora riprodotte in modo adeguato. Nel presente studio, è stato simulato un modello di infezione batterica del tratto respiratorio sviluppando con successo biofilm su un epitelio respiratorio umano ricostituito. Questo modello ha permesso di testare l'efficacia di un trattamento in condizioni il più possibile vicine a quelle cliniche. In questo caso, i metodi per individuare l'infezione non potevano fare affidamento sullo stesso saggio della biomassa vitale (MTT), per via della risposta sia delle cellule umane che dei batteri. Si è quindi deciso di studiare le interazioni batteriche con l'epitelio respiratorio umano ricostituito insieme agli effetti del trattamento in esame su questo modello utilizzando un approccio morfologico (SEM). Questo approccio ha mostrato la colonizzazione dell'epitelio da parte dei ceppi batterici in esame con una particolare affinità con le ciglia dell'epitelio, con un aspetto morfologico con un'elevata somiglianza con quello clinico. La colonizzazione batterica dell'epitelio ha alterato la sua struttura in modo significativo, con un aumento degli spazi intercellulari e danni alla struttura cellulare stessa.

Non è del tutto chiaro il meccanismo di attività del ²²²Rn sui tessuti respiratori umani²⁶. È stato suggerito ed è comunemente riconosciuto che favorisca l'attività antiossidante e funga da inibitore della risposta immunitaria^{25,26}. Le proprietà di questo elemento, inclusa la sua liposolubilità, sono state messe in relazione con le sue interazioni con i componenti lipidici della

membrana cellulare e della parete cellulare batterica. Non ci sono informazioni documentate nella letteratura scientifica sull'attività del ²²²Rn sulle cellule batteriche. Serrano et al.²⁶ hanno ipotizzato che l'interazione di questo elemento con i lipidi della membrana batterica potrebbe influenzare la crescita batterica. I nostri risultati possono fornire informazioni aggiuntive dato che gli effetti del ²²²Rn sono stati rilevati solo su cellule planctoniche Gram positive. Si sa che i batteri Gram positivi hanno pareti cellulari spesse fatte di peptidoglicani. Al contrario, le cellule Gram negative hanno una struttura molto più sottile. Si può speculare che una parete cellulare spessa possa raccogliere una quantità maggiore di ²²²Rn, che a sua volta esercita una maggiore attività su queste cellule, rispetto alle cellule Gram negative. Nella letteratura, gli studi sugli effetti delle radiazioni sui batteri prendono in considerazione gli elementi ²³⁹Pu e ²³⁷Np19, che emettono una radiazione simile a quella del ²²²Rn (particelle α). Diversamente da altri tipi di radiazioni con elevate capacità di penetrazione che depositano la loro energia lungo il percorso, a seconda della densità del materiale, le particelle α hanno una bassa capacità di penetrazione. In questo modo, causano un danno relativamente alto, di solito limitato a poche decine di μm nei tessuti¹⁹. Reed et al.³² hanno dimostrato che un emettitore di particelle α , ²³⁹Pu, può causare una maggiore perdita di vitalità batterica in *Chelatobacterheintzii* rispetto alle radiazioni. Gli autori hanno attribuito questa attività all'associazione biologica del ²³⁹Pu alle colonie batteriche. Questo meccanismo potrebbe spiegare gli effetti del ²²²Rn sui biofilm che sono stati evidenziati nel presente studio.

Il modello di epitelio respiratorio umano ricostituito infettato ha permesso di valutare gli effetti terapeutici dell'acqua termale radioattiva in esame in condizioni controllate, molto simili a quelle in vivo. Ciononostante, sarebbero ancora necessari gli studi in vivo, dato che le simulazioni in vitro, per quanto accurate, riproducono solo parte delle complessissime interazioni che hanno luogo in un ambiente respiratorio umano. Si tratta di un delicato equilibrio tra veloci-

tà, costo e finalità del modello che ne determina la selezione e l'uso.

Conclusioni

I nostri risultati permettono di valutare un'associazione degli effetti dell'acqua termale radioattiva con le terapie antibiotiche solitamente prescritte per combattere le infezioni del tratto respiratorio associate a biofilm. La suscettibilità batterica ai composti antibiotici potrebbe essere modulata da questa associazione, aumentando verosimilmente la loro efficacia e riducendone gli effetti collaterali.

Conflitto d'interesse

Gli autori dichiarano di non avere alcun conflitto d'interesse.

Riconoscimenti

Gli autori desiderano ringraziare il Dott. Lo Cunsolo per il suo aiuto nella raccolta delle acque termali radioattive e nelle misurazioni della radioattività.

Finanziamento

La presente ricerca è stata in parte finanziata da Merano Terme S.P.A. (Italia), la quale non ha avuto alcuno ruolo nella progettazione ed esecuzione dell'esperimento, nella raccolta e nell'analisi dei dati e nella redazione di questa pubblicazione.

Citazioni

- 1) Manikandan CA, Amsath A. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with respiratory tract infections. *Int J Pure Appl Zool* 2013; 1: 61-69.
- 2) Riley C, Riley S. Influenza and pneumococcal disease in the community. *Nurs Stand* 2003; 18: 4551; quiz 52, 55.
- 3) Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bull World*

Health Organ 2008; 86: 408-416.

- 4) Bellussi LM, Passali FM, Ralli M, De Vincentiis M, Greco A, Passali D. An overview on upper respiratory tract infections and bacteriotherapy as innovative therapeutic strategy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 27-38.
- 5) Passali D, Passali GC, Vesperini E, Cocca S, Visconti IC, Ralli M, Bellussi LM. The efficacy and tolerability of *Streptococcus salivarius* 24SMB and *Streptococcus oralis* 89a administered as nasal spray in the treatment of recurrent upper respiratory tract infections in children. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 67-72.
- 6) Vickery K, Hu H, Jacombs AS, Bradshaw DA, Deva AK. A review of bacterial biofilms and their role in device-associated infection. *Healthc Infect* 2013; 18: 61-66.
- 7) Tarantino V, Sa-vaia V, D'Agostino R, Silvestri M, Passali FM, Di Girolamo S, Ciprandi G. Bacteriotherapy in children with recurrent upper respiratory tract infections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 39-43.
- 8) Finch RG. Antibiotic resistance: a view from the prescriber. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 989-994.
- 9) Ascione T, Balato G, Mariconda M, Fantoni M, Giovannenze F, Pagliano P. Clinical and prognostic features of prosthetic joint infections caused by *Enterococcus* spp. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 59-64.
- 10) Morris DP. Bacterial biofilm in upper respiratory tract infections. *Curr Infect Dis Rep* 2007; 9: 186192.
- 11) Hamilos DL. Biofilm formations in pediatric respiratory tract infection: Part 1: biofilm structure, role of innate immunity in protection against and response to biofilm, methods of biofilm detection, pediatric respiratory tract diseases associated with mucosal biofilm formation. *Curr Infect Dis Rep* 2019; 21: 6.
- 12) Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc Inst Mech Eng H* 2014; 228: 1083-1099.

- 13) Pintucci JP, Corno S, Garotta M. Biofilms and infections of the upper respiratory tract. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; 14: 683-690.
- 14) Guilhen C, Forestier C, Balestrino D. Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. *Mol Microbiol* 2017; 105: 188-210.
- 15) Ajrouche R, Ielsch G, Clero E, Roudier C, Gay D, Guillevic J, Laurier D, Le Tertre A. Quantitative health risk assessment of indoor radon: a systematic review. *Radiat Prot Dosimetry* 2017; 177: 69-77.
- 16) Przylibski TA, Domin E, Gorecka J, Kowalska A. ²²²Rn concentration in groundwaters circulating in granitoid massifs of Poland. *Water* 2020; 748: 1-16.
- 17) Chen J, Harley NH. A review of indoor and outdoor radon equilibrium factors-part I: ²²²Rn. *Health Phys* 2018; 115: 490-499.
- 18) Ghernaout D. Aeration process for removing radon from drinking water – A review. *Appl Eng* 2019; 3: 32.
- 19) MacaskieaaJon LE, Lloydbb R. Microbial interactions with radioactive wastes and potential applications. In: Elsevier, ed. *Radioactivity in the Environment*, 2002; pp. 343-381.
- 20) Passali D, De Corso E, Platzgummer S, Streitberger C, Lo Cunsolo S, Nappi G, Passali GC, Bellussi L. Spa therapy of upper respiratory tract inflammations. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013; 270: 565-570.
- 21) Passali D, Gabelli G, Passali GC, Magnato R, Platzgummer S, Salerni L, Lo Cunsolo S, Joos A, Bellussi LM. Radioactive Merano SPA treatment for allergic rhinitis therapy. *Int J Otolaryngol* 2016; 2016: 2801913.
- 22) Keller S, Konig V, Mosges R. Thermal water applications in the treatment of upper respiratory tract diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Allergy (Cairo)* 2014; 2014: 943824.
- 23) De Benedetto M, Arigliani M, Balacchino A, Cassano P, Toraldo DM, Ralli M, Passali FM, Passali D. Obstructive sleep apnea syndrome in the pediatric age: the role of the otorhinolaryngologist. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 3-8.
- 24) Toraldo DM, Di Michele L, Ralli M, Arigliani M, Passali GC, De Benedetto M, Passali D. Obstructive sleep apnea syndrome in the pediatric age: the role of the pneumologist. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 15-18.
- 25) Yamaoka K, Mitsunobu F, Hanamoto K, Shibuya K, Mori S, Tanizaki Y, Sugita K. Biochemical comparison between radon effects and thermal effects on humans in radon hot spring therapy. *J Radiat Res* 2004; 45: 83-88.
- 26) Serrano C, Romero M, Alou L, Sevillano D, Corvillo I, Armijo F, Maraver F. Survival of human pathogenic bacteria in different types of natural mineral water. *J Water Health* 2012; 10: 400405.
- 27) Thomas M, Yawn BP, Price D, Lund V, Mullol J, Fokkens W, European Position Paper on R, Nasal Polyps G. EPOS Primary Care Guidelines: European Position Paper on the Primary Care Diagnosis and Management of Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2007 – a summary. *Prim Care Respir J* 2008; 17: 79-89.
- 28) Brambilla E, Ionescu AC, Cazzaniga G, Ottobelli M, Samaranayake LP. Levorotatory carbohydrates and xylitol subdue *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *J Basic Microbiol* 2016; 56: 480492.
- 29) Ionescu AC, Vezzo-li E, Conte V, Procacci P, Garcia-Godoy F, Brambilla E. Effects of Na-DNA mouthwash solutions on oral soft tissues. A bioreactor-based reconstituted human oral epithelium model. *Am J Dent* 2020; 33: 277-284.
- 30) Gomes IB, Meireles A, Goncalves AL, Goeres DM, Sjollem J, Simoes LC, Simoes M. Standardized reactors for the study of medical biofilms: a review of the principles and latest modifications. *Crit Rev Biotechnol* 2018; 38: 657-670.
- 31) Bishop E, Haswell L, Adamson J, Costigan S, Thorne D, Gaca M. An approach to testing undiluted e-cigarette aerosol in vitro using 3D reconstituted human airway epithelium. *Toxicol In Vitro* 2019; 54: 391-401.

32) Reed DT, Vojta Y, Quinn JW, Richmann MK. Radiotoxicity of plutonium in NTA-degrading *Chelatobacter heintzii* cell suspensions. *Biodegradation* 1999; 10: 251-260.