UNIMORE
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento di Scienze della Vita

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Sperimentale ed Applicata

NATURAL GREEN NEGLI STUDI SULL' ANTIBIOTICO RESISTENZA

Veronica Pellesi, Cinzia Provenzano

Team: Prof.ssa Carla Sabia, Dott.ssa Stefania Camellini, Dott.ssa Ramona Iseppi

Uso eccessivo di antibiotici, sia per uso umano che animale

Scoperta di nuovi antibiotici in declino

Antibiotico-resistenza

Sviluppo di batteri MDR multidrug-resistant

Emergenza di trovare nuove entità chimiche attive e non tossiche

PRODOTTI ANTIMICROBICI NATURALI

OLI ESSENZIALI

- TEA-TREE
- EUCALIPTO

FRAZIONI DI *SCHINUS MOLLE*

- L1 ♂ e ♀
- L2 ♂ e ♀

21 ceppi batterici isolati presso Hesperia Hospital

4 ceppi provenienti da collezione ATCC

OLI ESSENZIALI

Combinazione di sostanze organiche volatili ottenute distillando le piante aromatiche in corrente di vapore acqueo.

TEA-TREE

Melaleuca alternifolia

EUCALIPTO

Eucalyptus globulus

PROPRIETA': antibatteriche, antimicotiche, insetticide, antivirali, antiparassitarie, antiossidanti, antiflogistiche, immunostimolanti, cicatrizzanti, drenanti, mucolitiche.

Schinus molle

- Conosciuto comunemente come pepe rosa, o falso pepe, è una specie appartenente alla famiglia delle *Anacardiaceae.*
- Estratti idroalcolici di foglie di piante maschili e femminili.
- Da tutte le parti della pianta si possono ottenere estratti con proprietà antibatteriche, antivirali, antisettiche e antidepressive.

MATERIALI E METODI

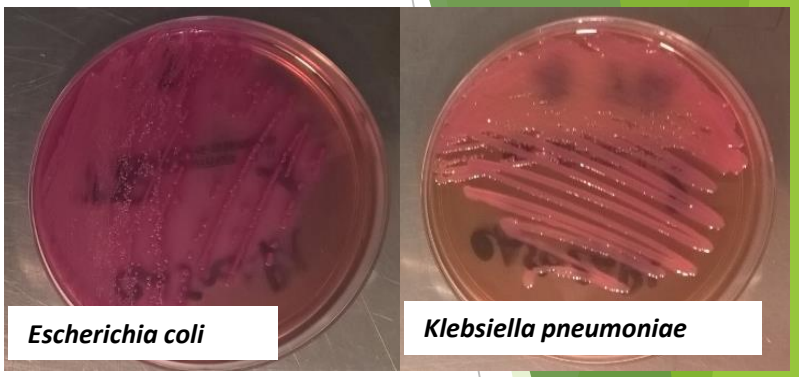
IDENTIFICAZIONE DEI 21 CEPPI ISOLATI PRESSO HESPERIA HOSPITAL

TAMPONE RETTALE

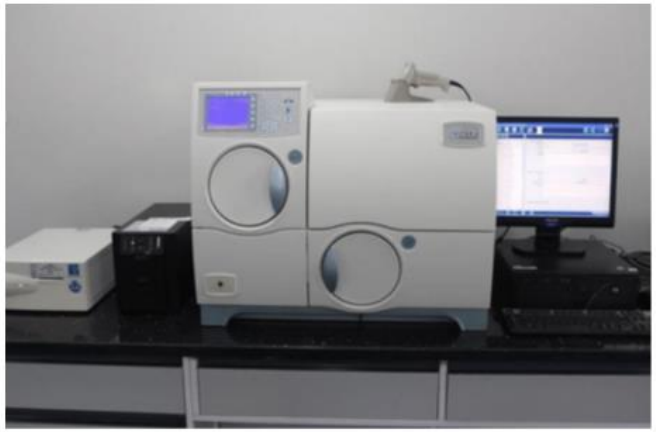
URINA

ASPIRATO TRACHEALE

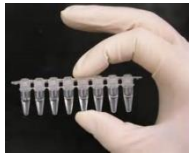
SEMINA ED INCUBAZIONE A 37° C x 24h



Mac Conkey agar



CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE



ISOLAMENTO DNA GENOMICO

PCR

ELETTROFORESI

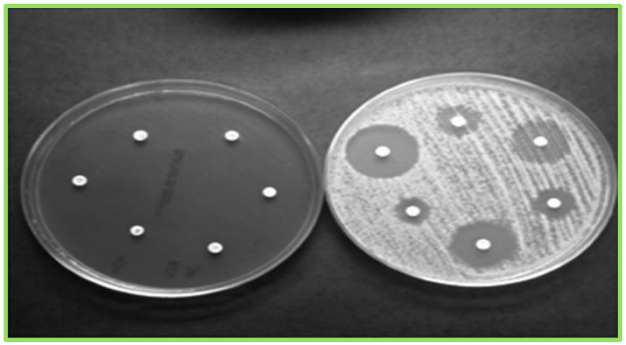
PURFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO

MATERIALI E METODI

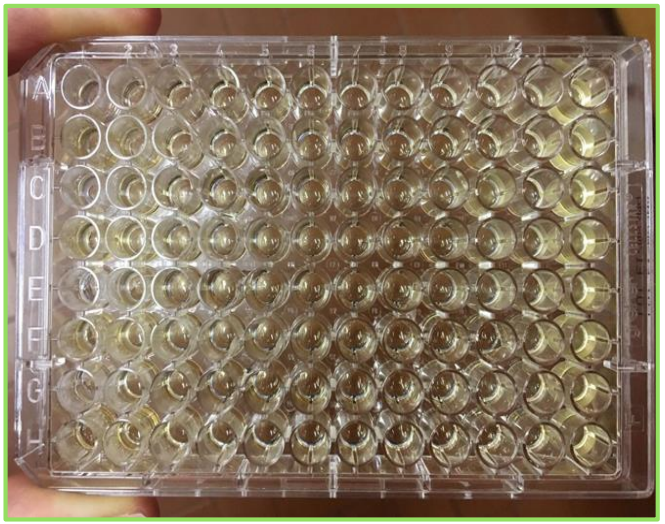
CEPPI BATTERICI ESBL, KPC

OLI ESSENZIALI

- Agar Disk Diffusion



- Microbrododiluizione



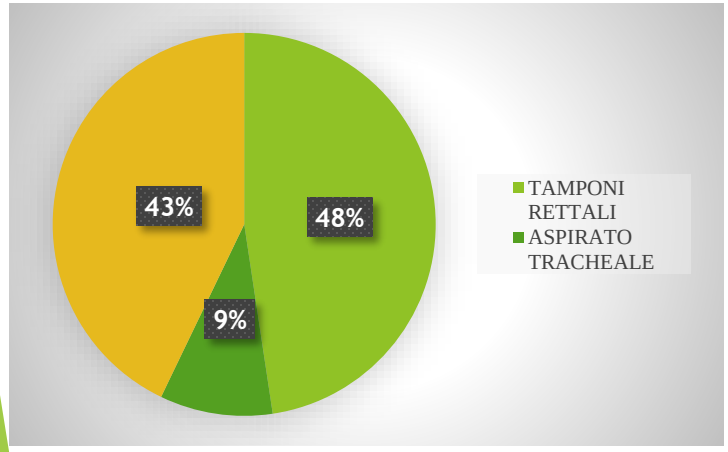
RISULTATI

CEPPI BATTERICI E TEST FENOTIPICI

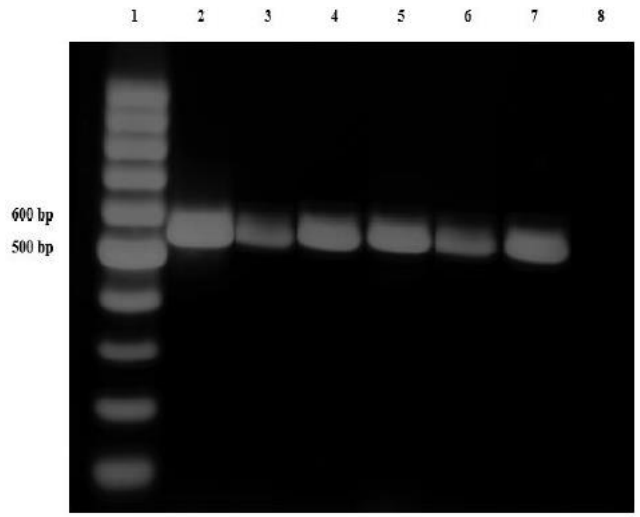
Sono stati isolati 21 ceppi batterici presso il Laboratorio Analisi di Hesperia Hospital e provenienti da:

10 tamponi rettali
9 urine
2 aspirato tracheale

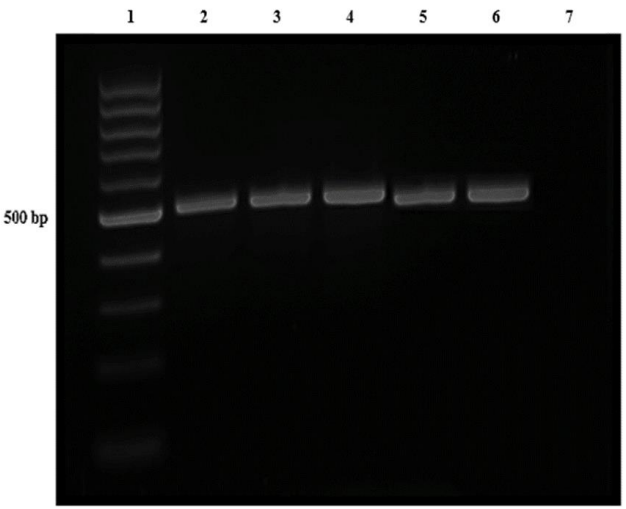
10 *Klebsiella pneumoniae*
11 *Escherichia coli*



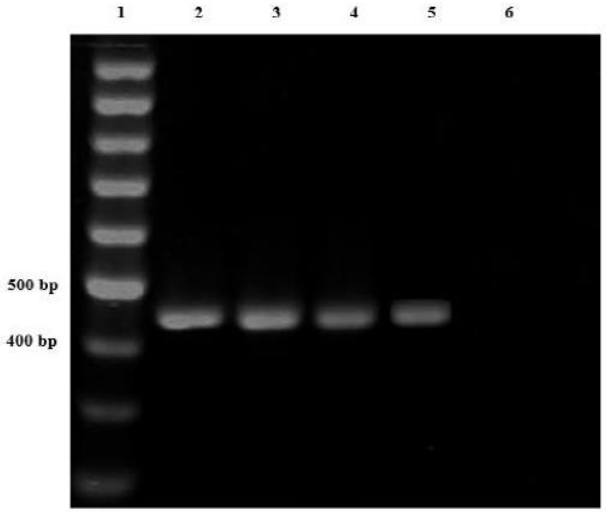
ANALISI MOLECOLARE



Amplificazione mediante PCR dei geni *bla*$_{KPC}$



Amplificazione mediante PCR dei geni *bla*$_{CTX-M}$

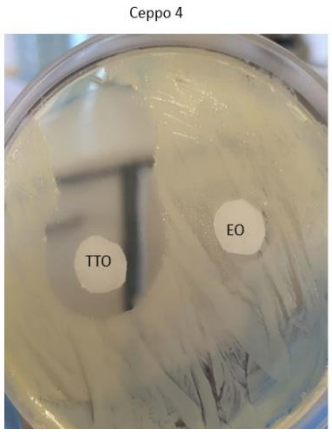


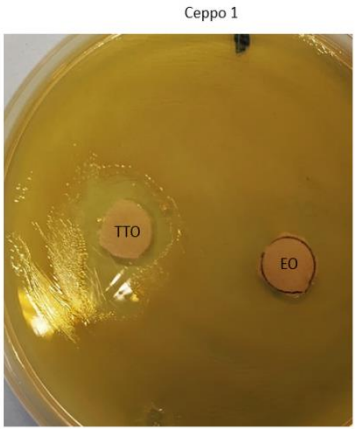
Amplificazione mediante PCR dei geni *bla*$_{TEM}$

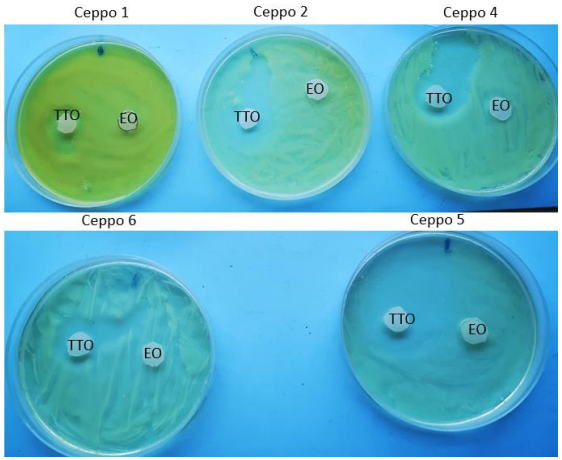
<u>DOPO IL SEQUENZIAMENTO</u> :

- 10 *Klebsiella pneumoniae* → 10 KPC-2
- 11 *Escherichia coli* → 3 TEM-52
  → 8 CTX-M-15

AGAR DISK DIFFUSION







Ceppi	Tea-tree OE	Eucalipto OE
Klebsiella pneumoniae	35 mm	9 mm
Klebsiella pneumoniae	27 mm	14 mm
Klebsiella pneumoniae	43 mm	0 mm
Klebsiella pneumoniae	20 mm	0 mm
Klebsiella pneumoniae	26 mm	10 mm
Klebsiella pneumoniae	24 mm	0 mm
Klebsiella pneumoniae	41 mm	14 mm
Klebsiella pneumoniae	24 mm	0 mm
Klebsiella pneumoniae	34 mm	13 mm
Klebsiella pneumoniae	27 mm	0 mm
Escherichia coli	19 mm	0 mm
Escherichia coli	35 mm	0 mm
Escherichia coli	28 mm	0 mm
Escherichia coli	21 mm	9 mm
Escherichia coli	25 mm	9 mm
Escherichia coli	33 mm	16 mm
Escherichia coli	28 mm	0 mm
Escherichia coli	21 mm	11 mm
Escherichia coli	32 mm	0 mm
Escherichia coli	20mm	9 mm
Escherichia coli	24 mm	10 mm

MIC DEGLI OLI ESSENZIALI

CEPPI	Eucalipto	Tea-tree	Antibiotico
Klebsiella pneumoniae	64 γ	16 γ	Cefotaxime 128 γ
Klebsiella pneumoniae	16 γ	8 γ	Cefotaxime 64 γ
Klebsiella pneumoniae	32 γ	16 γ	Cefotaxime 64 γ
Klebsiella pneumoniae	16 γ	8 γ	Cefotaxime 64 γ
Klebsiella pneumoniae	32 γ	8 γ	Cefotaxime 64 γ
Klebsiella pneumoniae	64 γ	16 γ	Meropenem 32 γ
Klebsiella pneumoniae	64 γ	32 γ	Meropenem 64 γ
Klebsiella pneumoniae	32 γ	16 γ	Meropenem 32 γ
Klebsiella pneumoniae	32 γ	16 γ	Meropenem 16 γ
Klebsiella pneumoniae	16 γ	8 γ	Meropenem 64 γ
Escherichia coli	32 γ	8 γ	Cefotaxime 64 γ
Escherichia coli	64 γ	16 γ	Cefotaxime 32 γ
Escherichia coli	64 γ	16 γ	Cefotaxime 128 γ
Escherichia coli	32 γ	16 γ	Cefotaxime 64 γ
Escherichia coli	32 γ	8 γ	Cefotaxime 64 γ
Escherichia coli	64 γ	16 γ	Cefotaxime 64 γ
Escherichia coli	32 γ	16 γ	Cefotaxime 64 γ
Escherichia coli	32 γ	8 γ	Cefotaxime 64 γ
Escherichia coli	64 γ	16 γ	Cefotaxime 64 γ
Escherichia coli	64 γ	16 γ	Cefotaxime 64 γ
Escherichia coli	64 γ	16 γ	Cefotaxime 64 γ

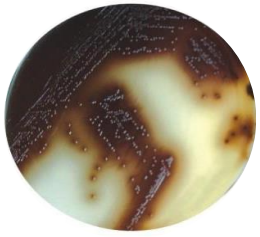
MATERIALI E METODI

CEPPI BATTERICI ATCC

***Bacillus subtilis* ATCC 6633**

***Candida albicans* ATCC 10231**

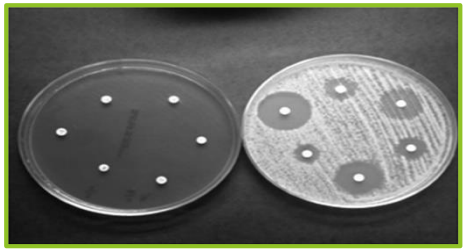
***Staphylococcus aureus* ATCC 6538**



***Enterococcus faecalis* ATCC 29212**

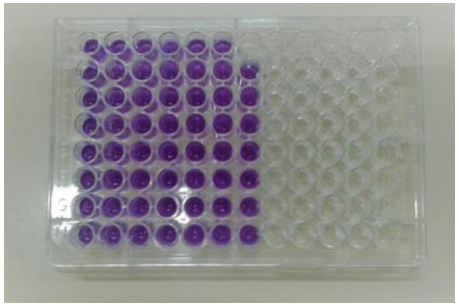
FRAZIONI

- Agar Disk Diffusion



- Microbrododiluizione

- Biofilm



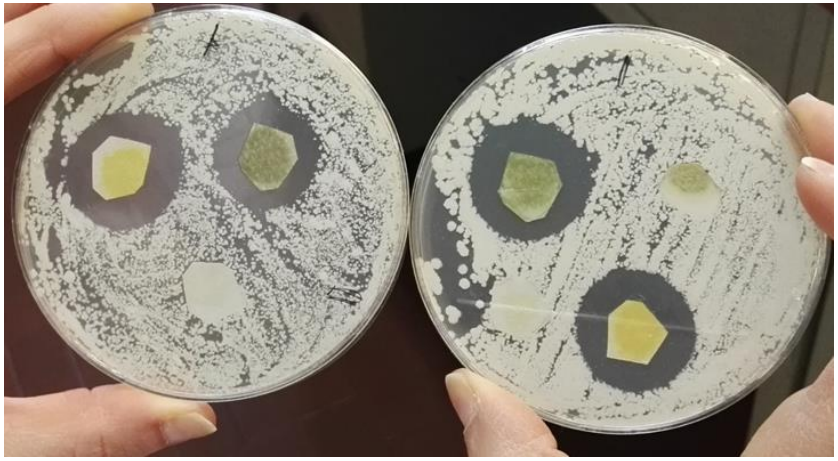
RISULTATI

AGAR DISK DIFFUSION

CEPPO	FRAZIONI SM ♂												
	L1F1	L1F2	L1F3	L1F5	L1F6	L1F7	L1F10	L2F1	L2F2	L2F3	L2F4	L2F6	L2F7
C. albicans ATCC 10231	/	/	/	/	/	/	/	8 mm	6 mm	5 mm	10 mm	12 mm	/
B. subtilis ATCC 6633	26 mm	13 mm	16 mm	13 mm	/	/	/	/	/	/	/	28 mm	30 mm
S. aureus ATCC 6538	13 mm	/	/	/	17 mm	15 mm	15 mm	/	/	/	/	/	/

CEPPO	FRAZIONI ♀						
	L1F4	L1F5	L1F6	L1F7	L2F2	L2F3	L2F4
C. *albicans* ATCC 10231	/	/	/	/	/	/	10 mm
B. subtilis ATCC 6633	13 mm	25 mm	22 mm	/	26 mm	25 mm	/
S. aureus ATCC 6538	12 mm	/	/	20 mm	/	/	18 mm
E. feacalis ATCC 29212	/	/	/	/	/	/	15 mm

AGAR DISK DIFFUSION



Bacillus subtilis ATCC 6633

Staphilococcus aureus ATCC 6538

MIC DELLE FRAZIONI

CEPPO	FRAZIONI SM ♂						ANTIBIOTICO
	L1F1	L1F2	L1F3	L1F5	L2F26	L2F7	
***B. subtilis* ATCC 6633**	128γ	256γ	>512γ	>512γ	16γ	256γ	Ampicillina >512γ (R)

CEPPO	FRAZIONI SM ♂				ANTIBIOTICO
	L1F1	L1F6	L1F7	L1F10	
***S. aureus* ATCC 6538**	128γ	8γ	16γ	128γ	Ciprofloxacina 16γ (R)

CEPPO	FRAZIONI SM ♂					ANTIBIOTICO
	L2F1	L2F2	L2F3	L2F4	L2F6	
***C. albicans* ATCC 10231**	256γ	128γ	128γ	128γ	64γ	Amfotericina > 512γ (R)

MIC DELLE FRAZIONI

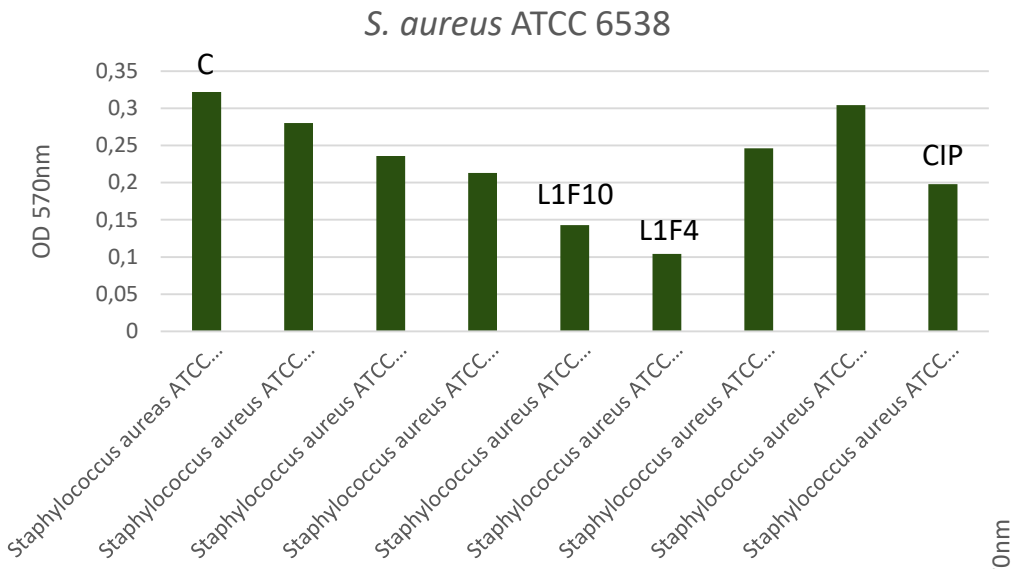
CEPPO	FRAZIONI SM ♀					ANTIBIOTICO
	L1F4	L1F5	L1F6	L2F2	L2F3	
***B. subtilis* ATCC 6633**	16 γ	8 γ	8 γ	1 γ	2 γ	Ampicillina > 512γ (R)

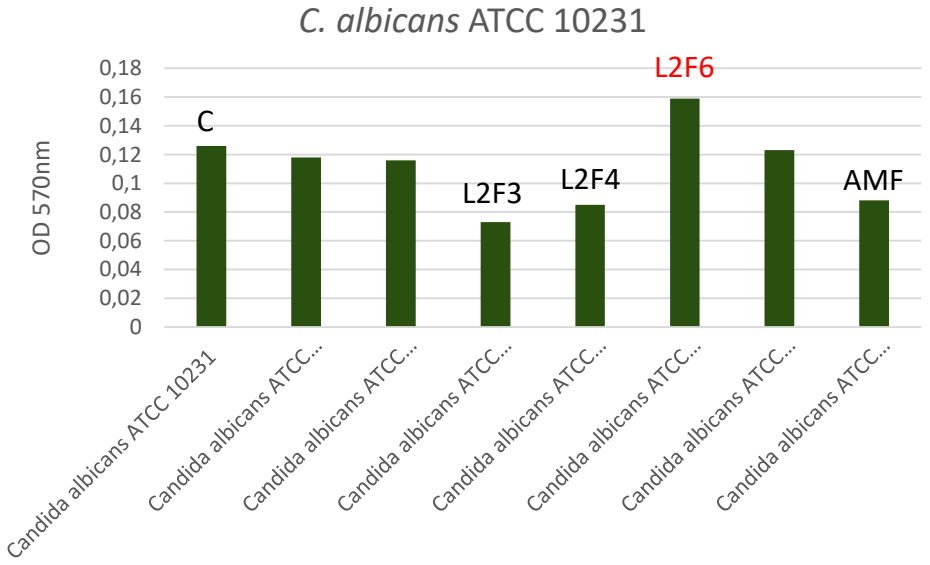
CEPPO	FRAZIONI SM ♀	ANTIBIOTICO
	L2F4	
***C. albicans* ATCC 10231**	32γ	Amfotericina > 512γ (R)

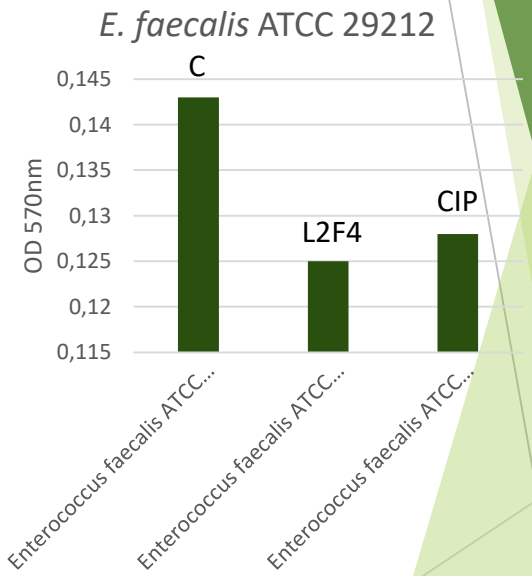
CEPPO	FRAZIONI SM ♀	ANTIBIOTICO
	L2F4	
***E. faecalis* ATCC 20212**	128γ	Ciprofloxacina <4γ (S)

CEPPO	FRAZIONI SM ♀			ANTIBIOTICO
	L1F4	L1F5	L2F4	
***S. aureus* ATCC 6538**	16γ	128γ	64γ	Ciprofloxacina 16γ (R)

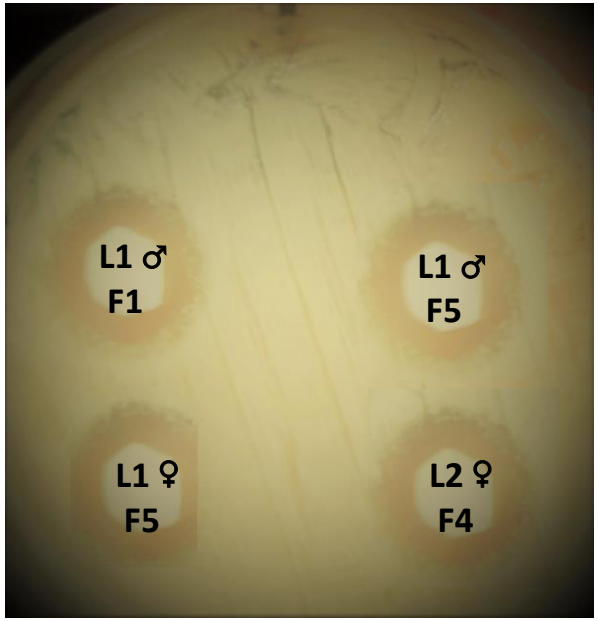
BIOFILM


S. aureus ATCC 6538
OD 570nm
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
C
L1F10
L1F4
CIP
Staphylococcus aureas ATCC...
Staphylococcus aureus ATCC...
Staphylococcus aureus ATCC...
Staphylococcus aureus ATCC...
Staphylococcus aureus ATCC...
Staphylococcus aureus ATCC...
Staphylococcus aureus ATCC...
Staphylococcus aureus ATCC...
Staphylococcus aureus ATCC...

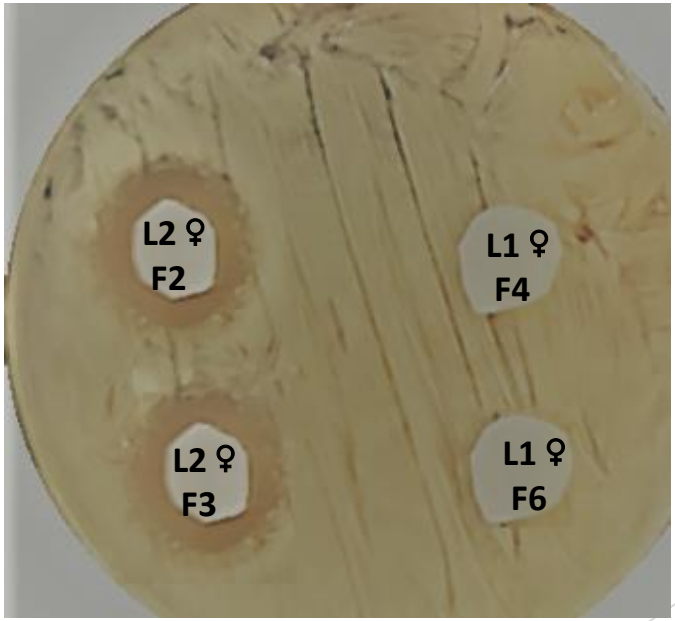

C. albicans ATCC 10231
OD 570nm
0,18
0,16
0,14
0,12
0,1
0,08
0,06
0,04
0,02
0
C
L2F3
L2F4
L2F6
AMF
Candida albicans ATCC 10231
Candida albicans ATCC...
Candida albicans ATCC...
Candida albicans ATCC...
Candida albicans ATCC...
Candida albicans ATCC...
Candida albicans ATCC...
Candida albicans ATCC...
Candida albicans ATCC...


E. faecalis ATCC 29212
OD 570nm
0,145
0,14
0,135
0,13
0,125
0,12
0,115
C
L2F4
CIP
Enterococcus faecalis ATCC...
Enterococcus faecalis ATCC...
Enterococcus faecalis ATCC...

AGAR DISK DIFFUSION DI FRAZIONI DI *Schinus molle* SU CEPPI CLINICI ESBL E KPC



Escherichia coli ESBL



Klebsiella pneumoniae KPC

CONCLUSIONI

- ✓ **Attività antibatterica**
- ✓ **Attività anti-biofilm**
- ✓ **Approccio green alla farmacoresistenza**

GRAZIE PER L'ATTENZIONE