

ACCORDO DI COLLABORAZIONE SCIENTIFICA FINALIZZATA ALL'ESECUZIONE DI ATTIVITÀ DI RICERCA

L'Associazione Lyme Italia e coinfezioni (di seguito, per brevità, AssoLyme) con sede legale in Via Porta Lodi, 2 - Monza (MB), C.F. 94632980150, rappresentata dal Presidente Dott.ssa Daniela Colombo, nata a ~~Vimercate (MB) 17/16/02/1966~~, autorizzata alla sottoscrizione del presente accordo

E

Gli Istituti Fisioterapici Ospitalieri-Istituto Santa Maria e San Gallicano IRCCS di diritto pubblico (di seguito denominati "IFO - ISG") - P.I. n. 01033011006, Cod. Fisc. n. 0215314583, con sede in Via Elio Chianesi n. 53 - Roma, rappresentato dal Direttore Generale f.f. Laura Figorilli, nata a ~~Roma 23/07/1964~~, d'ora in avanti nominato anche "parti" congiuntamente e "parte" singolarmente,

PREMESSO E CONSIDERATO CHE

- gli IFO-ISG sono un Istituto di Ricerca e di ricovero e Cura a Carattere Scientifico che svolgono attività clinica e di ricerca traslazionale scientifica nella disciplina della Dermatologia e venereologia;
- Associazione Lyme Italia e coinfezioni è interessata a collaborare con IFO-ISG allo scopo di realizzare una ricerca dal titolo "Analisi della produzione di biofilm e della tolleranza agli antibiotici in *Borrelia burgdorferi* sensu stricto e sensu lato" (BABEL)" da compiersi ai sensi del programma indicato nell'Allegato 1 che fa parte integrante del presente accordo;

CONVENGONO E STIPULANO QUANTO SEGUE:

Articolo 1 - Oggetto dell'accordo

AssoLyme accorda a IFO-ISG, Istituto Dermatologico San Gallicano, un contributo finanziario, a titolo di liberalità per l'esecuzione di una ricerca la quale sarà sviluppata secondo il programma dell'Allegato 1. La concessione del contributo finanziario è subordinata al soddisfacimento delle clausole riportate nel presente accordo definito tra le parti.

Articolo 2 - Responsabile scientifico

Responsabile scientifico per IFO-ISG è il Dr. Enea Gino Di Domenico nato a Roma il 06/03/1976. AssoLyme designa quali propri rappresentanti/referenti per ogni attività o questione inerente all'esecuzione della ricerca il Dott. Maurizio Ruscio nato a Gemona del Friuli (UD) il 14/12/1952 e la Dott.ssa Alessandra Panello nata a Sarzana (SP) il 22/03/1967.

Articolo 3 - Contributo

AssoLyme si impegna a versare a IFO-ISG a titolo di contributo liberale la somma di 36.000 euro (trentaseimila euro) per lo svolgimento della ricerca oggetto del presente Accordo, ai sensi dell'articolo 1 della presente convenzione. IFO-ISG si impegna ad avviare l'attività di ricerca entro e non oltre 30 giorni (trenta giorni) dalla firma del presente contratto.

Il contributo viene versato a titolo liberale, è pertanto un'operazione esclusa dal campo di applicazione dell'Iva ai sensi dell'art. 2 c.3 lett.a) DPR 633/72.

IFO-ISG, nell'ambito del contributo sopra specificato, si impegna a compiere gli atti di propria competenza occorrenti per istituire un Bando per l'assegnazione di nr. 1 Borsa di studio dell'importo totale lordo, comprensivo degli oneri a carico Istituto San Gallicano che eroga la borsa, di euro 20.000 annui, di durata pari a 12 mesi a favore di nr. 1 giovane laureato.¹

¹Il candidato dovrà avere un'età inferiore a 40 anni al momento dell'assegnazione della borsa. Titolo di studio o accademici richiesti per l'assegnazione della borsa di studio: Laurea magistrale in Scienze Biologiche, chimica, biomedical engineering, ingegneria biomedica, ingegneria chimica e biochimica,

Resta inteso che:

- a) il godimento della borsa non integra un rapporto di lavoro essendo finalizzato alla sola formazione all'attività di ricerca da parte dei borsisti. Il vincitore durante il periodo di utilizzazione della borsa di studio, non potrà esercitare alcuna altra attività lavorativa e/o professionale e dovrà frequentare i laboratori sede della ricerca a tempo pieno, pena l'immediata decadenza.
- b) la borsa è soggetta al trattamento fiscale e previdenziale previsto dalla legge in vigore al momento della liquidazione dell'importo;
- c) in caso di rinuncia dell'assegnatario o di decadenza per mancata accettazione, la borsa dovrà essere conferita ai candidati classificati idonei, secondo l'ordine di graduatoria.

Articolo 4 – Modalità di pagamento

Il finanziamento sarà corrisposto da AssoLyme a IFO-ISG, secondo le seguenti modalità ed i seguenti termini:

- 40% del contributo complessivo, a titolo di acconto, al momento della sottoscrizione del presente accordo;
- 50% del contributo a seguito di presentazione di una relazione sulle attività svolte da presentare a 12 mesi dalla firma del presente accordo;
- il saldo a seguito di presentazione relazione finale.

L'IFO-ISG in quanto Ente di diritto pubblico non anticipa spese per conto di privati, per tale ragione le tranche del finanziamento devono essere versate a titolo di anticipo delle varie fasi della ricerca ad eccezione del saldo.

AssoLymee verserà a IFO- ISG quanto stabilito solo se i costi sostenuti saranno regolarmente documentati da idonee pezze giustificative (scontrini, fatture, ricevute etc). La seconda rata verrà versata solo dopo che la prima rata verrà debitamente documentata. Lo stesso è da intendersi per la liquidazione del saldo.

Il contributo verrà versato da AssoLyme sul conto corrente intestato agli Istituti Fisioterapici Ospitalieri presso la Banca UNICREDIT BANCA DI ROMA, sede di Roma, Agenzia n. 65 -IFO con le seguenti coordinate bancarie:

IBAN: IT 61 E 03002 03365 000400000886
Cod. BIC SWIFT: BROMITR 1065

Articolo 5 – Durata dell'accordo

Il presente accordo entra in vigore dalla data di sottoscrizione dell'ultimo firmatario e avrà la durata di 18 mesi.

Articolo 6 – Obblighi dell' IFO- ISG

L' IFO- ISG- si impegna a:

- mettere a disposizione, per lo svolgimento delle attività di cui al presente contratto, il proprio personale, nonché le attrezzature ed i mezzi occorrenti, usando tutte le conoscenze e le esperienze in merito;
- permettere al/ai rappresentante/i/referente/i di AssoLyme incaricato/i ed autorizzato/i dall' IFO- ISG l'accesso ai luoghi dove sono eseguiti i lavori, previ accordi, per potere prendere visione dello stato di avanzamento della ricerca. In tal caso il personale di AssoLyme dovrà uniformarsi alle disposizioni di prevenzione e protezione in vigore presso l'IFO - ISG, ivi comprese eventuali misure specifiche,

biologia, biotecnologie, biotecnologie molecolari e industriali, medical biotechnology, Laurea magistrale in biotecnologie animali.

ove necessario (sorveglianza sanitaria, sorveglianza fisica dalle radiazioni ionizzanti). Gli oneri derivanti dall'applicazione di tali misure saranno concordati tra le parti, anche mediante accordi specifici;

- predisporre un report periodico dello stato di avanzamento del progetto di ricerca con cadenza semestrale;
- impegnarsi per la pubblicazione di un abstract congressuale in itinere o alla fine dello studio;
- impegnarsi a diffondere i risultati tramite pubblicazione scientifica su rivista internazionale.
- produrre al termine della ricerca, una relazione sull'attività svolta da sottoporre al responsabile di AssoLyme, entro 60 giorni successivi alla scadenza del contratto.

Articolo 7 – Segretezza

L' IFO- ISG, nella persona del Responsabile scientifico, nel periodo di vigenza del contratto, è tenuta ad osservare il segreto nei confronti di qualsiasi persona non coinvolta nell'attività di ricerca oggetto del presente accordo, per quanto riguarda fatti, informazioni, cognizioni e documenti di cui fosse venuta a conoscenza, o che le fossero comunicati da AssoLyme, in virtù del presente accordo.

AssoLyme, analogamente, è tenuta ad osservare il segreto nei confronti di qualsiasi persona non coinvolta nell'attività di ricerca oggetto del presente accordo, per quanto riguarda fatti, informazioni, cognizioni e documenti di cui fosse venuta a conoscenza, o che le fossero comunicati dal Responsabile scientifico, o dai suoi collaboratori, in virtù del presente contratto e che non costituiscano l'oggetto del contratto stesso.

Articolo 8 – Risultati della ricerca e pubblicazioni

IFO-ISG, nella persona del Responsabile Scientifico, potrà liberamente e gratuitamente utilizzare, esclusivamente per proprio uso interno, i sopra citati risultati.

IFO-ISG potrà, altresì, farne oggetto di pubblicazione scientifica e/o di esposizione e rappresentazione in occasione di congressi, convegni, seminari o simili, salvo citare l'accordo nel cui ambito è stato svolto il lavoro di ricerca, e salvo la preventiva autorizzazione scritta di AssoLyme, che non sarà ragionevolmente negata e sarà legata a strette considerazioni sulla tutelabilità e sfruttamento della proprietà intellettuale e sullo sviluppo industriale di detti risultati.

Articolo 9 – Risultati brevettabili

Eventuali risultati e/o invenzioni brevettabili occasionalmente scaturiti nell'ambito della ricerca, saranno oggetto di accordi successivi per lo sfruttamento industriale e commerciale condiviso degli stessi risultati e/o invenzioni brevettabili, nel rispetto della normativa vigente sulla proprietà industriale e dei regolamenti interni.

Articolo 10 – Recesso anticipato

Le parti potranno recedere dal presente Accordo con comunicazione scritta opportunamente motivata da inviarsi con lettera raccomandata A/R o tramite posta elettronica certificata (PEC) con un preavviso di almeno 30 (trenta) giorni.

In questo caso IFO-ISG farà pervenire ad AssoLyme una relazione dei risultati ottenuti fino al momento dell'interruzione e AssoLyme potrà utilizzare liberamente detti risultati, sempre che salvaguardi le restanti condizioni stipulate in questo Accordo e la contro prestazione finale sia ridotta in proporzione alla riduzione del tempo convenuto.

In caso di recesso anticipato è prevista la copertura da parte di AssoLyme di tutti gli impegni di spesa assunti da IFO-ISG fino al momento della chiusura dell'Accordo a fronte di presentazione di documentazione attestante le spese preventivamente approvate ed impegnate alla data dell'avviso di interruzione. Saranno invece restituite da IFO-ISG eventuali somme ricevute ma non utilizzate fino a quella data.

Articolo 11 – Trattamento dei dati personali

Il trattamento dei dati dovrà avvenire legittimamente, con correttezza e trasparenza nei confronti dell'interessato.

I dati personali saranno trattati nei limiti delle finalità di cui al presente accordo, ovvero per altre finalità affini o simili non incompatibili con quelle che sono state la causa della raccolta dei dati personali.

Le parti del presente accordo assicurano l'attuazione del principio della minimizzazione nell'utilizzo dei dati ossia saranno trattati quelli adeguati, pertinenti e necessari al raggiungimento delle finalità del presente accordo.

I dati saranno conservati per il tempo necessario allo scopo e/o per i casi di eventuale riuso di essi in progetti/studi/protocolli affini, simili e comunque non incompatibili con le ragioni della raccolta.

I dati personali saranno trattati garantendo misure adeguate (art. 32 Reg. Ue 2016/679) di protezione sia in fase di raccolta che di utilizzo e trasmissione degli stessi.

L'IFO e AssoLyme sono da considerarsi ad ogni effetto di legge reciprocamente autonomi nella titolarità del trattamento dei dati personali oggetto del presente accordo.

Tutti i dipendenti dell'IFO e AssoLyme che a vario titolo parteciperanno alle attività di trattamento nell'ambito del presente Accordo e che non sono tenuti in forma di leggi o regolamento al segreto professionale sono soggetti all'obbligo di non divulgazione ed alla massima riservatezza in relazione ai dati personali e più in generale alle informazioni trattate.

L'IFO e AssoLyme per rispettare gli adempimenti di cui all'accordo di collaborazione, potranno comunicare con altri titolari o responsabili del trattamento, i dati personali oggetto del presente accordo nella misura in cui sia indispensabile per la sua realizzazione.

Le Parti del presente accordo si impegnano inoltre alla corretta tenuta, implementazione ed aggiornamento dei Registri delle attività di trattamento ex art. 30, par. 1 e 2 GDPR.

Le parti hanno provveduto a nominare un Data Protection Officer:

- Per IFO: Scudo Privacy Srl, nella persona del Dott. Carlo Villanacci, raggiungibile al seguente indirizzo E-mail: responsabile.protezionedati@iss.it;
- Per AssoLyme: Associazione Lyme Italia e coinfezioni, con sede legale in via Porta Lodi, 2- Monza (MB) c.f. 94632980150, il referente per la privacy è la Dott.ssa Daniela Colombo raggiungibile al seguente indirizzo E-mail: presidente@associazioneelymeitalia.org.

Articolo 12 – Controversie

In caso di controversia nell'interpretazione o esecuzione del presente accordo, la questione verrà in prima istanza definita in via amichevole. Qualora non fosse possibile, il foro competente sarà quello di Roma.

Articolo 13 – Registrazione e spese

Il presente accordo è soggetto a registrazione solo in caso d'uso ai sensi degli artt. 5, comma 2 e 39 D.P.R. n.131/1986. Le spese inerenti al presente contratto sono a carico di AssoLyme.

Roma li, 23.07.2021

Per Associazione Lyme Italia e coinfezioni

Il Legale Rappresentante

Dott.ssa Daniela Colombo

Firmato digitalmente da: Daniela Colombo
Data: 24/07/2021 09:31:53

**Per Istituti Fisioterapici Ospitalieri-
Istituto San Gallicano**

Il Direttore Generale F.F.

Dr.ssa Laura Figoritti

ISTITUTO SAN GALICANO - IFO
IL DIRETTORE IDENTIFICATO

ANALISI DELLA PRODUZIONE DI BIOFILM E DELLA TOLLERANZA AGLI ANTIBIOTICI IN BORRELIA BURGDORFERI SENSU STRICTO E SENSU LATO (BABEL)

Razionale: La Borreliosi di Lyme (BL) è la più diffusa patologia trasmessa da vettore nel Nord America e in Europa, causata dalla spirocheta *Borrelia burgdorferi* sensu stricto e *B. burgdorferi* sensu lato, principalmente *B. garinii* e *B. afzelii* [Steere et al, 2016]. Questo batterio Gram-negativo è un patogeno obbligato, trasmesso dal morso di diverse zecche del genere *Ixodes*. La BL è una patologia multiorgano che colpisce la cute, gli occhi, le articolazioni, i muscoli, il sistema cardiaco e il sistema nervoso [Di Domenico et al, 2018a]. Si presenta in diverse fasi caratterizzate da un'ampia varietà di manifestazioni cliniche [Steere et al, 2017]. L'incubazione varia da 3 a 32 giorni, dopo di che appare una tipica eruzione cutanea, nota come eritema migrante, associata a febbre, mal di testa, malessere e mialgie (stadio 1) [Hengge et al, 2003]. Dopo alcune settimane o mesi, nell'8-15% dei pazienti può essere segnalata la presenza di anomalie neurologiche e cardiache (stadio 2). Entro poche settimane, nei pazienti non trattati o nei casi di trattamento antibiotico ritardato, l'infezione può diffondersi, portando a un'inflammatione sistemica [Wormser et al, 2006 Halperin et al, 2015]. Nell'ultima fase della BL (stadio 3), i pazienti possono manifestare artrite cronica [Stonehouse et al, 2010]. La BL è, in molti casi, trattabile con terapia antimicrobica appropriata. Tuttavia, la persistenza cronica, la frequente ricomparsa e la capacità di *B. burgdorferi* di tollerare cicli multipli di trattamento antibiotico sono fortemente indicative di un germe produttore di biofilm o di strutture protettive simili al biofilm [Berndtson, 2013; Sapi et al, 2012; Sapi et al, 2016]. Diversi studi hanno dimostrato che *B. burgdorferi* può passare da uno stato mobile a uno stato stazionario, in cui le cellule formano una matrice del tutto simile al biofilm [Sapi et al, 2012]. I biofilm batterici sono intrinsecamente più resistenti ai trattamenti antimicrobici rispetto alle cellule in fase planctonica e questo può portare a infezioni croniche e ricorrenti [Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Di Domenico et al, 2017]. Studi *in vitro* e *in vivo* hanno rivelato che aggregati di *B. burgdorferi* sensu stricto e sensu lato (*B. afzelii* e *B. garinii*), presentano i marcatori tipici della matrice del biofilm, inclusi mucopolisaccaridi, in particolare alginato, DNA extracellulare e calcio [Sapi et al, 2012; Sapi et al, 2016; Timmaraju et al, 2015]. Di conseguenza, la presenza di forme latenti di *B. burgdorferi* in fase di biofilm può concorrere a spiegare da un lato il basso tasso di rilevazione di questo batterio nel sangue dei pazienti infetti e, dall'altro la capacità delle spirochete di eludere il sistema immunitario dell'ospite e resistere agli antibiotici, causando forme croniche e recidivanti di BL [Sapi et al, 2019].

Obiettivo principale: Sviluppare un sistema culturale per l'identificazione e la caratterizzazione di ceppi di *Borrelia burgdorferi* produttori di biofilm.

Obiettivo secondario: Valutare l'attività dei principali antibiotici utilizzati per il trattamento della BL contro i ceppi di *B. burgdorferi* sensu stricto e sensu lato, sia in fase planctonica che in biofilm, per definire strategie e protocolli terapeutici mirati.

Dati Preliminari: Per determinare la cinetica di formazione del biofilm di *B. burgdorferi* B31, il protocollo del BioFilm Ring Test® (BRT) è stato adattato alle condizioni di crescita richieste da questo batterio. Il BRT (Fig. 1, A) ha mostrato la presenza di un anello scuro sul fondo dei pozzetti nelle colture al tempo 0' e a 5 ore ad indicare l'assenza di formazione di biofilm. Successivamente, dopo 24 ore di incubazione era possibile osservare una riduzione dell'anello che poi scompare totalmente dopo 48 ore. Questi risultati evidenziano una progressiva formazione di biofilm come riportato nel grafico (figura 1B) dopo l'analisi delle immagini ottenuta con il software del BRT. L'analisi microscopica confocale ha dato risultati coerenti con quelli raccolti con il BRT evidenziando la presenza di aggregati di spirochete simili al biofilm di oltre 10 µm di altezza (Fig. 1C). Nel loro insieme, questi risultati preliminari indicano che il BRT può essere utilizzato come metodo rapido per misurare la formazione del biofilm di *B. burgdorferi* B31.

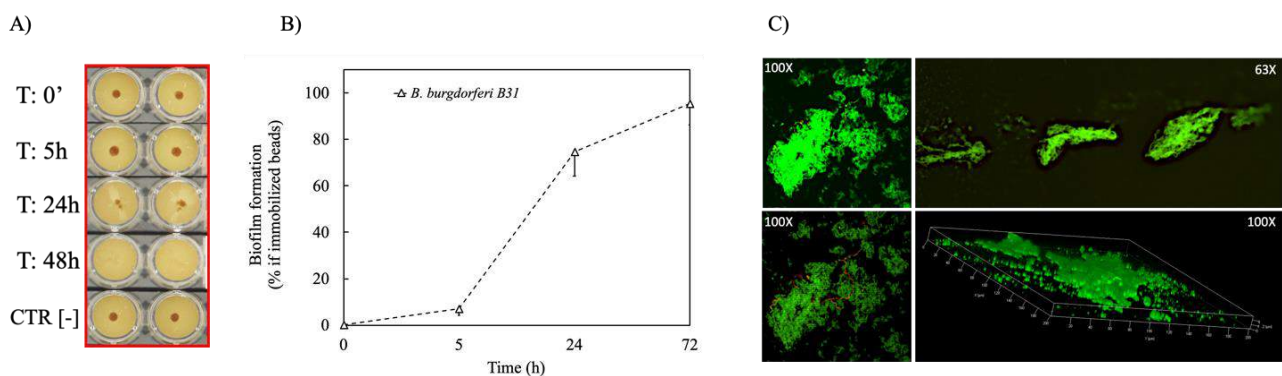


Figura 1. A) Formazione del biofilm con il ceppo *Borrelia burgdorferi* B31 (American Type Tissue Collection 35210) ottenuta tramite BRT a diversi tempi di incubazione in presenza di BSK-H medium contenente 6% di rabbit serum (Sigma-Aldrich). Le immagini sono state ottenute tramite scansione della piastra prima e dopo magnetizzazione su Block Test. Il controllo negativo (CTR [-]) contiene solo il mezzo di coltura e le microparticelle magnetiche **B)** Cinetica della formazione del biofilm misurata usando il BRT: media e deviazione standard di tre saggi di campioni analizzati in duplicato [Tasse et al, 2018]. **C)** Immagini al microscopio del biofilm di *B. burgdorferi* B31 (63X or 100X magnification). I campioni sono stati colorati tramite *BacLight* Live/Dead (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) [Di Domenico et al, 2019]. Immagini rappresentative dei biofilm a 72 ore di incubazione a 37 °C. Le spirochete sono cresciute su µ-Slide 8-well (ibidi, Germany) e coltivate in presenza di BSK-H medium contenente 6% di rabbit serum (Sigma-Aldrich).

Disegno dello studio: In questo studio retrospettivo verranno analizzati 4 ceppi di *B. burgdorferi* sensu stricto e 15 ceppi di *B. burgdorferi* sensu lato (*B. afzelii* e *B. garinii*), provenienti dall'Istituto di Microbiologia e Immunologia della Facoltà di Medicina presso l'Università di Ljubljana (Slovenia), isolati durante il periodo 2013-2014, da pazienti adulti con diagnosi di eritema migrante. Il ceppo di laboratorio *B. burgdorferi* B31 strain (American Type Tissue Collection 35210) verrà utilizzato come riferimento [Di Domenico et al, 2018a].

Le culture di *B. burgdorferi* saranno analizzate per numero, morfologia (lunghezza, spessore, curve) e motilità, mediante microscopia a campo oscuro. I diversi ceppi saranno inoculati nei terreni di coltura Modified Kelly-Pettenkofer (MKP) e Barbour-Stoenner-Kelly (BSK-H) e incubati a 33 °C. Dopo una settimana verrà esaminata e confrontata la crescita batterica [Ružić-Sabljčić et al, 2017].

Cinetica di formazione ed analisi della composizione del biofilm di *B. burgdorferi*.

La cinetica e misurazione della produzione di biofilm saranno valutate tramite BioFilm Ring Test (BRT), come descritto in precedenza [Di Domenico et al, 2016; Tasse et al, 2018] utilizzando MKP e BSK-H come terreni di coltura. Adesione e composizione del biofilm saranno esplorate mediante crescita in presenza di DNasi (100 µg/mL) e proteinasi K (50 µg/mL) [Tasse et al, 2018] e misurate mediante BRT.

Suscettibilità antimicrobica dei ceppi *B. burgdorferi* in fase planctonica e in biofilm.

Il test di suscettibilità antimicrobica (Antimicrobial susceptibility testing - AST) sarà eseguito in fase planctonica tramite microdiluizione in brodo. La suscettibilità dei diversi isolati di *B. burgdorferi* sarà valutata misurando la minima concentrazione inibente (MIC) e contando le spirochete mobili mediante microscopia a campo oscuro dopo 72 ore di incubazione [Koetsveld et al, 2018]. L'anti-biofilm test (ABT) sarà eseguito per la definizione dei criteri di minima concentrazione inibente del biofilm (bMIC), secondo il protocollo descritto in Di Domenico et al. con alcune modifiche [Di Domenico et al, 2018b]. Per i test di suscettibilità verranno analizzati i seguenti antibiotici: amoxicillina, azitromicina, ceftriaxone e doxiciclina a diverse concentrazioni come specificato.

Tempi previsti per la realizzazione dello studio: Diciotto mesi

Principal Investigator:

Dott. Enea Gino Di Domenico, UOSD Microbiologia e Virologia, Istituto Dermatologico San Gallicano

Coordinatore dello studio:

Dott. Fabrizio Ensoli, UOSD Microbiologia e Virologia, Istituto Dermatologico San Gallicano

Partecipanti allo studio:

Dott.ssa Ilaria Cavallo, UOSD Microbiologia e Virologia, IFO - Istituto Dermatologico San Gallicano

Prof.ssa Fiorentina Ascenzioni, Dipartimento di Biologia e Biotecnologia C. Darwin, Università “La Sapienza”, Roma

Prof. Giusto Trevisan, DSM-Dipartimento Scienze Mediche, Università di Trieste.

Prof.ssa Marina Cinco, Laboratorio Spirochete, Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste.

Supporto economico: Lo studio sarà supportato dall'Associazione Lyme Italia e Coinfezioni

Referenze

1. Berndtson K. Review of evidence for immune evasion and persistent infection in Lyme disease. *Int J Gen Med* (2013) 6: 291–306.
2. Di Domenico EG, Cavallo I, Bordignon V, D'Agosto G, Pontone M, Trento E, Gallo MT, Prignano G, Pimpinelli F, Toma L, Ensoli F. The Emerging Role of Microbial Biofilm in Lyme Neuroborreliosis. *Front Neurol.* (2018a) 3: 1048.
3. Di Domenico EG, Cavallo I, Bordignon V, Prignano G, Sperduti I, Gurtner A, et al. Inflammatory cytokines and biofilm production sustain *Staphylococcus aureus* outgrowth and persistence: a pivotal interplay in the pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Sci Rep* (2018b) 8: 9573.
4. Di Domenico EG, Farulla I, Prignano G, Gallo MT, Vespaziani M, Cavallo I, et al. Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype. *Int J Mol Sci.* (2017) 18. pii: E1077.
5. Di Domenico EG, Toma L, Provot C, Ascenzioni F, Sperduti I, Prignano G, et al. Development of an in vitro Assay, Based on the BioFilm Ring Test®, for Rapid Profiling of Biofilm-Growing Bacteria. *Front Microbiol* (2016) 7: 1429.
6. Di Domenico EG, Rimoldi SG, Cavallo I, D'Agosto G, Trento E, Cagnoni G, Palazzin A, Pagani C, Romeri F, De Vecchi E, Schiavini M, Secchi D, Antona C, Rizzardini G, Dichirico RB, Toma L, Kovacs D, Cardinali G, Gallo MT, Gismondo MR, Ensoli F. Microbial biofilm correlates with an increased antibiotic tolerance and poor therapeutic outcome in infective endocarditis. *BMC Microbiol.* (2019) 19: 228.
7. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* (2009) 11: 1034-1043.
8. Hengge UR, Tannapfel A, Tying SK, Erbel R, Arendt G, Ruzicka T. Lyme borreliosis. *Lancet Infect Dis* (2003) 3: 489–500.
9. Koetsveld J, Manger A, Hoornstra D, Draga RO, Oei A, Kolyasnikova NM, Toporkova MG, Sarksyant DS, Wagemakers A, Platonov AE, Hovius JW. In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Clinical Isolates of *Borrelia miyamotoi*. *Antimicrob Agents Chemother.* (2018) 26;62(7).

10. Ružić-Sabljić E, Maraspin V, Stupica D, Rojko T, Bogovič P, Strle F, Cerar T. Comparison of MKP and BSK-H media for the cultivation and isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *PLoS One*. (2017) 12:e0171622.
11. Sapi E, Balasubramanian K, Poruri A, Maghsoudlou JS, Socarras KM, Timmaraju AV, et al. Evidence of In Vivo Existence of *Borrelia* Biofilm in Borrelial Lymphocytomas. *Eur J Microbiol Immunol* (2016) 6: 9-24.
12. Sapi E, Bastian SL, Mpoy CM, Scott S, Rattelle A, Pabbati N, et al. Characterization of biofilm formation by *Borrelia burgdorferi* in vitro. *PLoS One* (2012) 7: e48277.
13. Sapi E, Kasliwala RS, Ismail H, Torres JP, Oldakowski M, Markland S, Gaur G, Melillo A, Eisendle K, Liegner KB, Libien J, Goldman JE. The Long-Term Persistence of *Borrelia burgdorferi* Antigens and DNA in the Tissues of a Patient with Lyme Disease. *Antibiotics (Basel)*. (2019) 8. pii: E183.
14. Steere AC, Strle F, Wormser GP, Hu LT, Branda JA, Hovius JW, et al. Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primers* (2016) 2: 16090.
15. Steere AC, Strle F, Wormser GP, Hu LT, Branda JA, Hovius JW, et al. Correction: Lyme borreliosis. *Mead Nature Reviews Disease Primers* (2017) 3: 17062.
16. Stonehouse A, Studdiford JS, Henry CA. An update on the diagnosis and treatment of early Lyme disease: “focusing on the bull’s eye, you may miss the mark”. *J Emerg Med* (2010) 39: e147-151.
17. Tasse J, Trouillet-Assant S, Josse J, Martins-Simões P, Valour F, Langlois-Jacques C, Badel-Berchoux S, Provot C, Bernardi T, Ferry T, Laurent F. Association between biofilm formation phenotype and clonal lineage in *Staphylococcus aureus* strains from bone and joint infections. *PLoS One*. (2018) 13: e0200064.
18. Timmaraju VA, Theophilus PA, Balasubramanian K, Shakih S, Luecke DF, Sapi E. Biofilm formation by *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *FEMS Microbiol Lett* (2015) 362: fnv120.
19. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klemperer MS, et al. The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* (2006) 43: 1089-1134.

Gantt Chart progetto BABEL

	Project Timeline																	
Mesi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Attività previste																		
Raccolta dei ceppi e definizione delle procedure di coltivazione																		
Analisi della cinetica e misurazione della produzione di biofilm																		
Studio della composizione e della struttura del biofilm																		
Test di suscettibilità antimicrobica in fase planctonica e biofilm																		
Analisi statistica e definizione delle strategie di divulgazione dei risultati																		
Report finale																		