



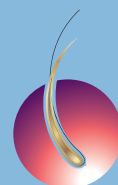
# *icf* Bulletin

RICERCA SCIENTIFICA E INFORMAZIONE VETERINARIA

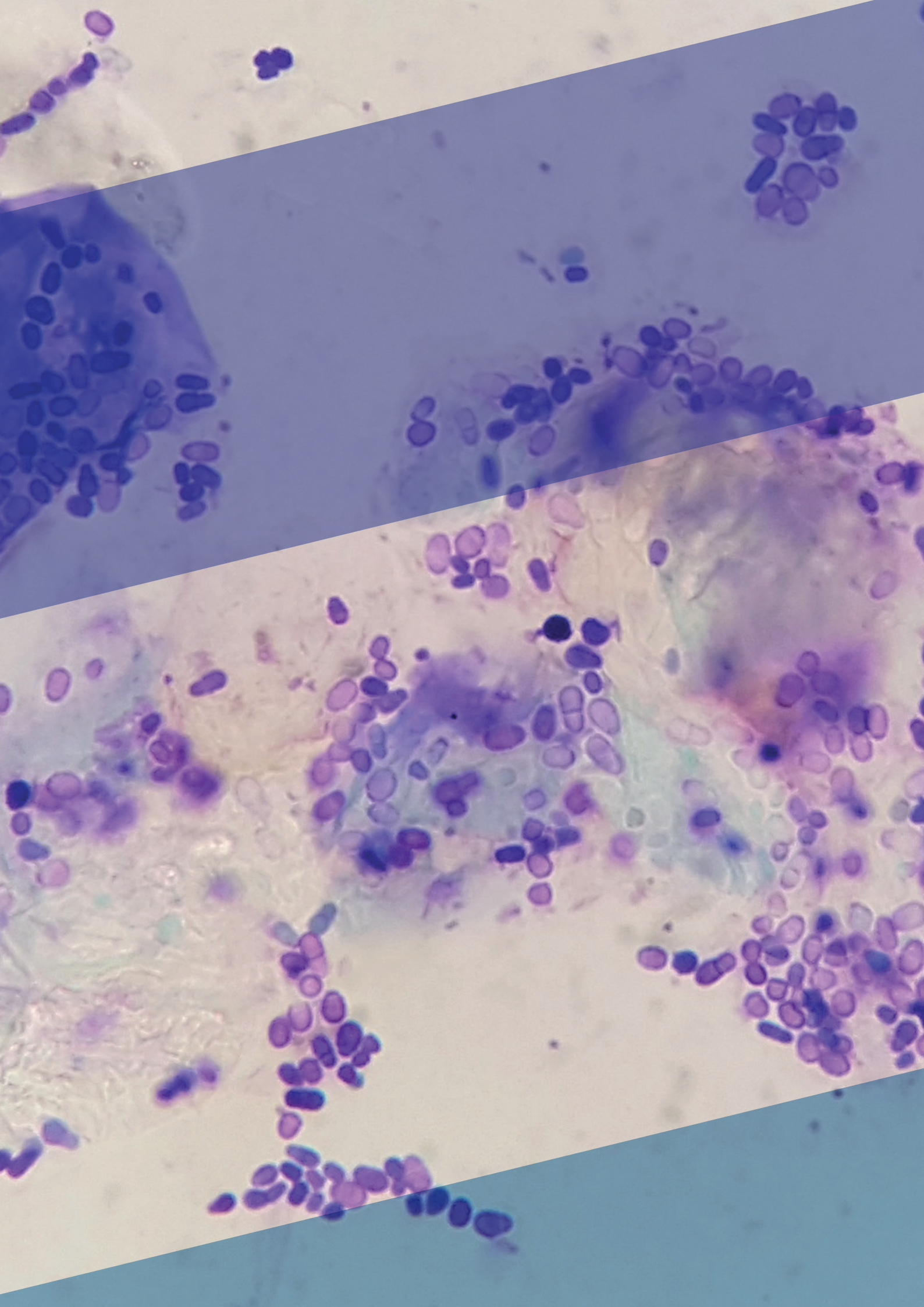
## **Biofilm: i microrganismi al lavoro in modo cooperativo**

**Dr.ssa Chiara Noli DVM, Dip ECVD**

 **nextmune** Italy



**ICF**  
Evolution of  
Knowledge



# Biofilm: i microrganismi al lavoro in modo cooperativo

Dr.ssa Chiara Noli, DVM, Dip ECVD

Nel mondo dei microrganismi, la sopravvivenza è spesso un risultato di cooperazione e interazione. Un esempio perfetto di questo tipo di lavoro di squadra si trova nei biofilm, strutture complesse formate da colonie di microrganismi. Un biofilm è una comunità di microrganismi, principalmente batteri ma anche lieviti, che crescono su una superficie e si circondano di un materiale mucoso autoprodotta, composto principalmente da polisaccaridi, proteine e DNA. Questa struttura stratificata permette ai microrganismi di aderire a diverse superfici - sia inerti come il vetro o l'acciaio, sia organiche come le cellule viventi delle mucose o della cute. Il biofilm fornisce una sorta di scudo protettivo ai microrganismi che ospita, offrendo un'efficace difesa contro le condizioni ambientali avverse e gli agenti antimicrobici, inclusi i disinfettanti e gli antibiotici sistemici e topici.

Tuttavia, in molti ambienti, i biofilm svolgono ruoli ecologici cruciali. Ad esempio, essi sono responsabili della biodegradazione di molte sostanze inquinanti negli ecosistemi acquatici, come nel trattamento delle acque reflue.

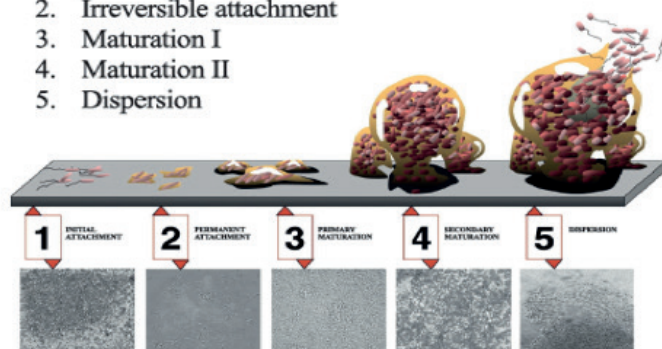
## Come si forma un biofilm? (Figura 1)

I biofilm si formano quando i microrganismi in fase planctonica (singole cellule fluttuanti) percepiscono di avere raggiunto una densità elevata (*quorum sensing*). In queste situazioni si attivano dei meccanismi di comunicazione chimica intercellulare che ne cambiano il comportamento. Il primo stadio di formazione del biofilm è l'adesione dei batteri planctonici su un substrato, inizialmente tramite legami deboli e reversibili e poi tramite strutture adesive più potenti, quali ad esempio i pili. Queste prime cellule forniscono siti di adesione per altri microrganismi, anche di specie differenti, e iniziano la produzione di una matrice mucinosa ricca di acqua, che può rappresentare dal 50 al 90% della massa. Questa protegge i membri della colonia dall'aggressione di agenti esterni (essiccamento, virus batteriofagi, agenti antimicrobici naturali o sintetici, anticorpi e fagocitosi da parte delle cellule del sistema immunitario) e ne favorisce la moltiplicazione e la comunicazione intercellulare. Ogni tanto alcuni microrganismi possono staccarsi dal biofilm per disperdersi nell'ambiente e trovare altre nicchie da colonizzare.

## The 5 phases of the development of a biofilm.

Five phases can be distinguished in the development of a biofilm:

1. Initial attachment
2. Irreversible attachment
3. Maturation I
4. Maturation II
5. Dispersion



**Figura 1.** I diversi stadi di formazione del biofilm, dall'adesione dei primi batteri planctonici alla dispersione dalle colonie mature.  
(foto Dr. Giovanni Ghibaudo)

## Il ruolo dei biofilm in medicina

Nel contesto medico, i biofilm sono presenti in diverse situazioni patologiche e possono presentare una sfida significativa, poiché la loro struttura unica offre una importante resistenza agli antibiotici. Essi sono spesso responsabili di infezioni croniche e persistenti, quali sinusiti, tonsilliti, endocarditi, polmoniti, osteomieliti, placca dentaria, infezioni di vie urinarie e ferite e otiti.

## Biofilm in corso di otite

Nell'ambito veterinario, uno dei problemi più comuni nei cani è l'otite, un'infezione dell'orecchio multifattoriale, dovuta ad infezioni batteriche o fungine, allergie, parassiti o problemi anatomici. Recentemente, è stato rilevato il ruolo importante dei biofilm nelle infezioni dell'orecchio del cane ed è stato dimostrato che molti comuni batteri e lieviti responsabili dell'otite, come *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *S. aureus*, ma anche *Malassezia pachydermatis*, sono in grado di formare biofilm. In uno studio su ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* isolati da casi di otite nel cane, ben il 40% erano in grado di produrre biofilm <sup>(10)</sup>.

Questi complessi aggregati di microrganismi possono complicare la gestione dell'otite, rappresentando un ostacolo significativo al trattamento, poiché rendono le infezioni più resistenti alla terapia e ne favoriscono le ricadute. Gli antibiotici stentano a penetrare la matrice del biofilm e ad uccidere i batteri al suo interno, tanto che i batteri in condizione di biofilm necessitano di concentrazioni antibiotiche da 2 a 4000 volte superiori rispetto ai batteri in forma planctonica (non in biofilm) per essere inibiti<sup>(5-7)</sup>. Molti antibiotici sono attivi principalmente sulla fase replicativa dei microrganismi, ma la maggior parte dei batteri presenti nel biofilm è in uno stadio di quiescenza, e le sostanze antimicrobiche che riescono a penetrare lo fanno in concentrazione limitata, favorendo lo sviluppo di resistenza batterica e predisponendo ad una ricaduta dell'infezione con i ceppi resistenti.

### Come identificare un biofilm in corso di otite

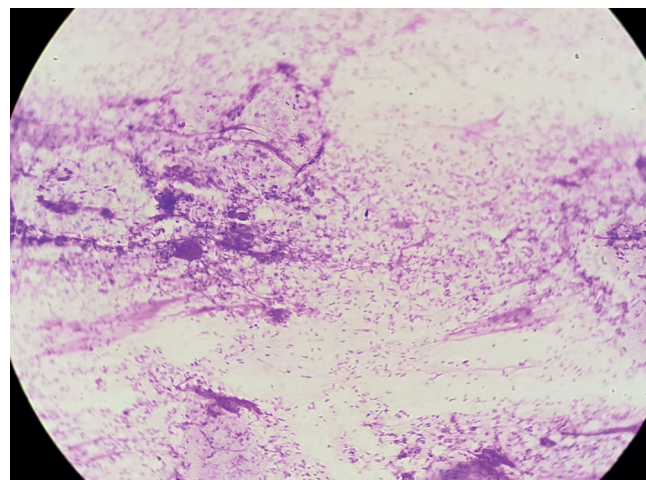
La presenza di biofilm va sospettata in corso di otiti refrattarie alla comune terapia e/o recidivanti, soprattutto se le colture batteriche e gli antibiogrammi ripetuti riportano sempre lo stesso microorganismo con lo stesso profilo di sensibilità. Anche un essudato mucinoso scuro è spia di presenza di biofilm (Figura 2).



**Figura 2.** Essudato auricolare scuro e mucinoso spia di presenza di biofilm (foto Dr. Giovanni Ghibaudo)

L'esame citologico di questo essudato spesso è confermativo. I campioni si ottengono con un cotton fioc dalla profondità del dotto auricolare verticale. Il cotton fioc va poi rotolato delicatamente sulla superficie del vetrino per depositare il materiale, evitando di strisciarlo, poiché si potrebbero produrre artefatti da rottura cellulare (strie nucleari).

Dopo la colorazione il biofilm si presenta come strie di mucina sullo sfondo, con batteri e/o lieviti per lo più in aggregati. Si ricorda che anche *Malassezia* è spesso in grado di produrre un biofilm, e pertanto il ritrovamento di questo lievito nel campione citologico non ne esclude la presenza. (Figura 3)



**Figura 3.** Numerosi batteri e strie mucinose in un preparato da essudato auricolare di un cane con otite e presenza di biofilm.

### Gestione e trattamento del biofilm auricolare

È però stato recentemente riportato che il biofilm auricolare viene spesso sottostimato e identificato meno frequentemente rispetto alla sua vera presenza<sup>(8)</sup>, e va invece sospettato in tutti i casi di otite con presenza di microrganismi.

Per gestire un'otite con presenza di biofilm, è necessario adottare un approccio multimodale. Innanzitutto, è fondamentale rimuovere meccanicamente la patina mucinosa mediante l'uso dei cosiddetti "disgregatori di biofilm", prima di intervenire con agenti disinfettanti e/o antibiotici. I disgregatori di biofilm rompono la struttura del biofilm e rendono i microrganismi più suscettibili agli antibiotici. Fra questi i più noti sono la N-acetilcisteina (NAC) e il tris-EDTA, entrambi sicuri per la terapia endoauricolare. Interessantemente entrambe le sostanze sono state descritte avere anche una propria attività antimicrobica intrinseca, sia nei confronti dei batteri che della *Malassezia*<sup>(1)</sup>.

L'NAC è usata comunemente per dissolvere il catarro in corso di bronchiti, e diversi studi ne hanno provato l'efficacia anche nel dissolvere i biofilm e favorirne la penetrazione da parte degli antibiotici<sup>(2)</sup>. Inoltre, l'NAC ha mostrato anche sinergismo d'azione con alcuni antibiotici betalattamici e chinolonici<sup>(3,11)</sup>.

Il Tris-EDTA è in grado di favorire la penetrazione degli antibiotici nella parete dei batteri Gram-negativi, quale ad esempio *Pseudomonas spp.*<sup>(4,12)</sup>, anche organizzati in biofilm<sup>(9)</sup>, e potenziarne l'effetto.

Nei casi più gravi Tris-EDTA e NAC devono venire lasciati in situ per almeno 5 minuti, con cicli di lavaggio e aspirazione ripetuta, meglio se in anestesia generale e con intubazione tracheale, sino a che la massa di biofilm ed essudato non venga completamente rimossa dal canale auricolare (Figura 4).



**Figura 4.** I liquidi di lavaggio vengono instillati e ri-aspirati dal canale auricolare diverse volte sino a che il dotto non risulti ben pulito. Poi si possono instillare gocce antibiotiche/antifungine con steroidi.

Successivamente si può procedere al lavaggio con prodotti disinfettanti ed essiccanti, in genere a base di cloressidina, prima di instillare gocce antibiotiche e/o antifungine, sempre accompagnate da uno steroide topico. Questo procedimento va poi ripetuto a casa dal proprietario quotidianamente, sino a che non si osservi più formazione di biofilm.

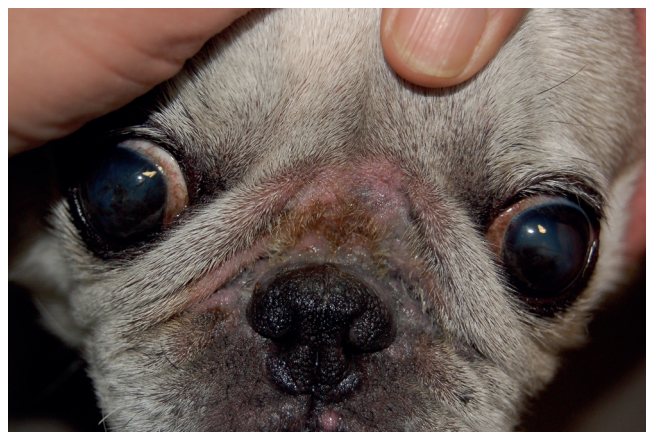
Nelle situazioni meno gravi, Tris-EDTA e NAC si possono applicare nel canale auricolare nel soggetto vigile, dopo una corretta pulizia, massaggiando la base dell'orecchio, con un tempo di contatto di 5 minuti, rimuovendo poi il liquido in eccesso con una garza sterile e aspettare almeno 30 minuti prima di applicare gocce antibiotiche e/o antifungine, sempre accompagnate da uno steroide topico. Un lavoro in vitro ha dimostrato che la presenza di Tris-EDTA e NAC non compromette né l'efficacia né la stabilità degli steroidi topici <sup>(13)</sup>.

### Il biofilm cutaneo

È forse meno conosciuto il fatto che i biofilm si possono formare anche in altre aree corporee e non solo nelle orecchie, ad esempio nelle pliche cutanee. Fra queste ricordiamo gli spazi interdigitali, le pliche del muso nei cani brachicefalici, la plica vulvare, quella labiale, nel collo ventrale dei cani con abbondanti pieghe cutanee e salivazione (cocker, dogue de Bordeaux), le pliche ombelicali, sottocaudale o pericaudale dei cani con coda a cavatappi.

La colonizzazione da parte di batteri e/o lieviti di queste aree è patologica, e avviene solo se ci sono fattori predisponenti: ad esempio uno stato allergico della cute per gli spazi interdigitali con conseguente lambimento e aumento dell'umidità; nella plica del muso eccessiva lacrimazione; nella plica vulvare incontinenza urinaria, eccetera. Sicuramente la conformazione anatomica "a plica" di questi distretti corporei non permette una corretta aereazione della cute e favorisce un aumento di umidità, che può venire peggiorato dal leccamento o dal ristagno di urine, saliva o feci.

L'aspetto clinico in questi casi è rappresentato dalla presenza di materiale cremoso nella plica in questione (Figure 5 a,b,c), che all'esame citologico mostra una popolazione abbondante e uniforme di microorganismi, in assenza di cellule infiammatorie (non si tratta dunque di pus) (Figura 6).



**Figura 5a.** Presenza di materiale umido, mucinoso e maleodorante nella plica nasale di un cane brachicefalico.

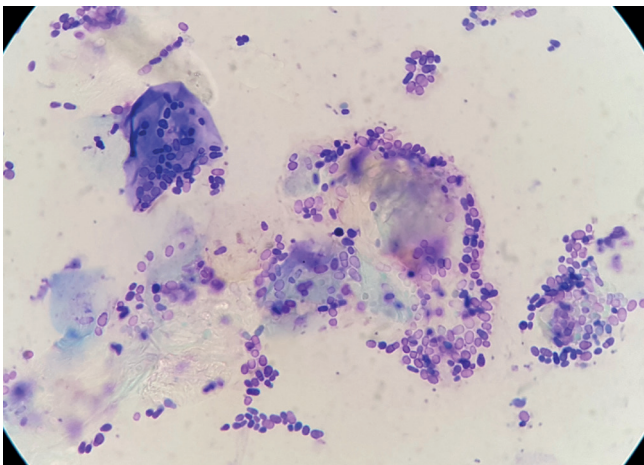


**Figura 5b.** Presenza di materiale cremoso in uno spazio interdigitale di un cane affetto da dermatite atopica.



**Figura 5c.** Materiale maleodorante nella plica ombelicale di un molossoide.

Questi possono essere batteri, ma è bene ricordare che anche *Malassezia* è in grado di formare un biofilm (Figura 6), spesso difficile da eradicare con le comuni terapie.



**Figura 6.** Campione citologico in cui si rileva la presenza esclusiva di lieviti *Malassezia* in grandi quantità, adesi ai corneociti della superficie cutanea.

Spesso la terapia topica con creme antibiotiche o spray o gel disinfettanti può non dare i risultati sperati, a causa della presenza del biofilm. Come per le orecchie, la terapia in questi casi si basa sulla disgregazione del biofilm con soluzioni a base di Tris-EDTA e NAC, la successiva disinfezione della parte e l'applicazione di una crema o gel antimicrobici per l'inibizione della formazione di nuovo biofilm. È però anche indispensabile identificare e risolvere i fattori predisponenti (conformazioni anatomiche a pliche particolarmente accentuate, bagni frequenti, etc) o primari (condizione allergica sottostante, incontinenza urinaria, diarrea, etc) per una risoluzione definitiva del problema.

## Conclusione

L'otite e la dermatite delle pliche sono condizioni comuni nei cani e la presenza di biofilm può renderle un problema complicato da gestire. Riconoscere l'importanza dei biofilm nelle infezioni dell'orecchio e nelle intertrigini dei cani è un passo fondamentale per sviluppare strategie di trattamento più efficaci, quali l'utilizzo di agenti disgreganti a base di Tris-EDTA e NAC.

## Il biofilm esiste e riduce l'efficacia della terapia!

# Tris-NAC®

**MIGLIORA LE PERFORMANCE DELLE TERAPIE.**

**SOLUZIONE STERILE CON TRIS-EDTA+ N-ACETILCISTEINA (NAC) PER CANI E GATTI**

Tris-NAC applicato nel canale auricolare e sulla cute prima dell'applicazione di prodotti topici (clorossidina, peptidi antimicrobici di sintesi, antibiotici), disgrega il biofilm maturo e ne previene la formazione!

## Riferimenti bibliografici

1. Chan WY, Khazandi M, Hickey EE, et al. In vitro antimicrobial activity of seven adjuvants against common pathogens associated with canine otitis externa. *Vet Dermatol* 2018, DOI: 10.1111/vde.12712
2. Dinicola S, De Grazia S, Carlomagno G, Pintucci JP. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014; 18:2942-2948.
3. El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA. Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. *Pol J Microbiol* 2009; 58:261-267.
4. Farca AM, Piromalli G, Maffei F, Re G. Potentiating effect of EDTA-Tris on the activity of antibiotics against resistant bacteria associated with otitis, dermatitis and cystitis. *J Small Anim Pract*. 1997; 38:243-245.
5. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 2005; 436:1171-1175.
6. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35: 322-332.
7. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Molecular Biol Rev* 2009; 73:310-347.
8. Luciani L, Stefanetti V, Rampacci E et al. Comparison between clinical evaluations and laboratory findings and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro in canine otitis externa. *Vet Dermatol* 2023; DOI: 10.1111/vde.13197, e-pub ahead of print.
9. Pye CC, Singh A, Weese JS. Evaluation of the impact of tromethamine edetate disodium dihydrate on antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm in vitro. *Vet Dermatol* 2014; 25:120-123.
10. Pye CC, Yu AA, Weese JS. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro. *Vet Dermatol* 2013; 24:446-449.
11. Roberts D, Cole P. N-acetylcysteine potentiates the anti-pseudomonas activity of carbenicillin in vitro. *J Infect* 1981; 3: 353-359.
12. Wooley RE, Jones MS. Action of EDTA-Tris and antimicrobial agent combinations on selected pathogenic bacteria. *Vet Microbiol*. 1983; 8:271-280.
13. Milanesi N, Ghibaud G, della Mira T. The comparative cerumenolytic activity of otic preparations, an in vitro study (abstract). *Vet Dermatol* 2021; 32: 422.



