



Tris-NAC®

Ruolo dei biofilm e strumenti terapeutici nelle otiti infettive nel cane e nel gatto

Testo e immagini di G. Ghibaudo
Medico Veterinario,
Clinica Veterinaria Malpensa
Samarate, Varese (Italia)



Ruolo dei biofilm e strumenti terapeutici nelle otiti infettive nel cane e nel gatto

Testo e immagini G. Ghibaudo

Medico Veterinario, Clinica Veterinaria Malpensa di Samarate, Varese (Italia)

Diversi microrganismi formano biofilm a determinate condizioni. Quando un gruppo di batteri o funghi si accumulano su di una superficie e raggiungono una particolare densità cellulare, iniziano a secernere una sostanza polimerica che si compone di polisaccaridi, proteine e DNA, formando una matrice in cui le cellule batteriche o fungine sono fortemente radicate.

Informazioni su cosa è e come si forma un biofilm

Un biofilm, o biopellicola, è una aggregazione complessa di microrganismi contraddistinta dalla secrezione di una matrice adesiva e protettiva, e spesso anche da:

- adesione a una superficie, sia di tipo biologico sia inerte (ad esempio rocce e protesi),
- eterogeneità strutturale,
- interazioni biologiche complesse,
- una matrice extracellulare di sostanze polimeri che, spesso di carattere polisaccaridico.

Gli organismi unicellulari solitamente mostrano due distinte modalità di comportamento.

A) La prima è la familiare forma fluttuante, o planctonica, nella quale le cellule separate fluttuano o nuotano indipendentemente in un supporto liquido.

B) La seconda è lo stato aggregato, o sessile, in cui le cellule sono strettamente vincolate e fermamente attaccate l'una all'altra e anche, di solito, a una superficie solida. La modifica del comportamento è attivata da un meccanismo di comunicazione chimica che differisce tra le specie.

Alcune specie, ad esempio, possono produrre acil-omoseril-lattoni come segnale di "quiescenza", che induce le cellule planctoniche circostanti al

cambiamento fenotipico verso lo stato sessile, attraverso una differente espressione dei geni della cellula.

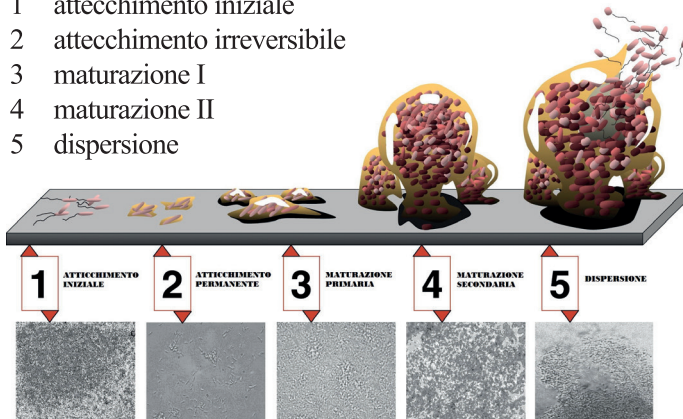
Formazione

La formazione di un biofilm inizia con l'ancoraggio di microrganismi liberamente fluttuanti a una superficie. I primi "coloni" aderiscono alla superficie inizialmente attraverso deboli e reversibili forze di Van der Waals. Se i batteri colonizzatori non sono immediatamente separati dalla superficie, possono ancorarsi più stabilmente utilizzando molecole di adesione cellulare, come i pili. I primi colonizzatori facilitano l'arrivo di altre cellule mettendo a disposizione diversi siti di adesione cellulare e iniziano a costruire la matrice che permette l'integrità del biofilm. Alcune specie non sono in grado di attaccarsi autonomamente a una superficie, ma spesso riescono ad ancorarsi alla matrice o ai colonizzatori precedenti. Una volta che la colonizzazione ha avuto inizio il biofilm cresce tramite divisioni cellulari e integrazione di batteri esterni, anche di altre specie.

Le 5 fasi dello sviluppo di un biofilm.

Si distinguono cinque fasi nello sviluppo di un biofilm:

- 1 attecchimento iniziale
- 2 attecchimento irreversibile
- 3 maturazione I
- 4 maturazione II
- 5 dispersione





Proprietà

Il biofilm è tenuto insieme e protetto da una matrice di composti polimerici escreti. Questa matrice è tanto forte che, a certe condizioni, i biofilm possono fossilizzarsi. La matrice protegge le cellule all'interno e facilita la comunicazione tramite segnali chimici o fisici. In alcuni biofilm sono stati rinvenuti canali d'acqua che contribuiscono a distribuire i nutrienti e le molecole segnale. Allo stesso modo, questi canalicoli convogliano verso la periferia sostanze di scarto ed eventuali esotossine.

Localizzazione

I biofilm sono ubiquitari. Quasi ogni specie di batterio possiede meccanismi attraverso i quali possono aderire a superfici e l'uno con l'altro. I biofilm si possono trovare su rocce e sulla ghiaia al fondo di ogni corso d'acqua e spesso si formano sulla superficie di acque stagnanti.

Generalmente i biofilm formati da colonie eterogenee sono più spessi e più stabili di quelli monospecie. Dopo qualche tempo i batteri adesi al biofilm sono in grado di staccarsi, venendo a costituire una massa indipendente che periodicamente si sfoglia e, con la finalità di sopravvivere e di colonizzare altre nicchie, può dare origine alla formazione di un nuovo biofilm in un altro posto. Questo fenomeno può essere favorito dalle forze di scorrimento del fluido, dalla presenza di determinati composti o dalle caratteristiche delle singole specie batteriche.

I biofilm permettono la sopravvivenza delle cellule batteriche in un ambiente ostile. Infatti le cellule planctoniche sono più esposte a svariati fattori deleteri come batteriofagi o protozoi in natura, agenti biocidi nei dispositivi industriali, agenti antimicrobici in situazioni cliniche e dall'azione di anticorpi e fagociti. Inoltre la complessità della loro struttura e l'eterogeneità metabolica e fisiologica, suggeriscono un'analogia fra queste comunità e i tessuti di organismi superiori. Il biofilm può comprendere una

singola specie microbica o più specie, e può formarsi su un ampio range di superfici abiotiche o biotiche.

Nonostante i biofilm misti predominino in molti ambienti, quelli composti da una singola specie hanno un forte interesse medico, in quanto causa di una grande varietà di infezioni, dal momento che possono formarsi sulla superficie di impianti medici. *Pseudomonas aeruginosa* è stata la specie più studiata tra i batteri Gram negativi che formano biofilm singoli, ma anche altri microrganismi quali ad esempio *P.fluorescens*, *E.coli* e *Vibrio cholerae* sono stati largamente studiati. Mentre tra i Gram positivi più analizzati troviamo *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* e gli enterococchi.

I biofilm sono composti principalmente da cellule microbiche e matrice extracellulare (EPS). La percentuale di EPS si aggira tra il 50% e il 90% ed è considerata la materia prima del biofilm. Le proprietà chimico-fisiche di questa matrice possono variare molto, ma è principalmente composta da polisaccaridi. L'EPS può essere altamente idratato poiché può incorporare grandi quantità di acqua nella sua struttura tramite legami idrogeno, ma in alcuni casi l'EPS può anche essere idrofobico. La composizione e la struttura dei polisaccaridi determina la conformazione primaria della matrice. La composizione dell'EPS non è generalmente uniforme ma può variare spazialmente e temporalmente, infatti la quantità di EPS cresce con l'età del biofilm. Inoltre questa matrice può associare con ioni metallici, cationi divalenti a altre macromolecole, come proteine, DNA, lipidi e anche acidi umici. A causa della sua elevata idratazione la matrice previene l'essiccamento di alcuni biofilm naturali. Inoltre può contribuire alla resistenza agli antibiotici impedendo il trasporto di massa e la diffusione di queste sostanze attraverso il biofilm, probabilmente legando queste molecole direttamente. Alcuni studi hanno mostrato che la stabilità della struttura del biofilm è legata alla presenza di zuccheri neutri, polisaccaridi acidi e aminozuccheri.

Aspetti clinici del biofilm

Aggregati cellulari

Permettono alle singole cellule batteriche o fungine o le colonie di batteri o funghi di esibire un comportamento coordinato e conferendo loro vantaggi biologici come la resistenza ad antibiotici e nei confronti del sistema immunitario dell'ospite. I biofilm sono strutturati per consentire la respirazione e lo scambio di liquidi e sostanze nutritive, mentre impediscono l'accesso alle cellule immunitarie dell'ospite come i fagociti; inoltre, riducono le concentrazioni di fattori inibitori o litici di tipo antimicrobico impedendo a questi di raggiungere i microrganismi. Il risultato di queste proprietà è che le infezioni, che sono la conseguenza, risultato dalla formazione di biofilm, sono notoriamente difficili da eradicare e queste infezioni richiedono l'uso di alte concentrazioni di agenti antimicrobici, la rimozione dei tessuti colpiti, l'uso di sostanze con proprietà di rompere e prevenire il biofilm o la combinazione di questi trattamenti.

Formazione del *quorum sensing*

La formazione di biofilm sembra essere disciplinato dalla secrezione di molecole particolari, secondo un processo denominato *quorum sensing*. Questo è un processo di comunicazione tra cellule batteriche, è auto indotto e fa sì che quando le molecole cominciano ad accumularsi nella zona circostante i microrganismi, questi si sottopongono a una serie di cambiamenti fisiologici che consentono la formazione del biofilm extracellulare. Ad esempio, a seguito del *quorum sensing* autoindotto, i microrganismi possono iniziare la produzione superficiale di polimeri extracellulari adesivi, la produzione biosurfattante, la sporulazione, la bioluminescenza e la secrezione di sostanze nutritive; con sequestro di molecole e fattori di virulenza come conseguenza del processo di formazione del biofilm. Per questi motivi talvolta batteri presenti in un biofilm possono essere fino a 4.000 volte più resistenti agli antibiotici rispetto allo stesso organismo, in un ambiente allo stato libero^{1,2}.

Resistenza agli antibiotici

Il confronto tra la concentrazione minima inibente (MIC), che descrive la quantità di antimicrobico necessaria per inibire i microrganismi liberi capaci di formare biofilm, e la minima concentrazione di eradicazione del biofilm (MBEC), che descrive la concentrazione minima di un agente antimicrobico capace di inibire la crescita di un biofilm (necessaria per inibire o eliminare la crescita di biofilm), mostrano le differenze esistenti nella suscettibilità dei batteri liberi rispetto a quelli che formano biofilm. Spiegando perché i batteri che formano biofilm sono molto meno sensibili agli agenti antimicrobici ai comuni schemi terapeutici³.

Inoltre, utilizzando una concentrazione di antibiotici in dose pari alla MIC, se l'infezione presenta un biofilm si può avere un'esposizione del biofilm a dosi sub-letali di antibiotici, provocando così una più alta incidenza di resistenze microbiche, con gravi conseguenze per l'ospite.

Esempi di formazione di biofilm in infezioni nel cane e gatto sono le placche dentarie come il tartaro (foto n. 1 e 2), in impianti e dispositivi medici (come i fissatori esterni ortopedici) e nelle ferite cutanee (foto n.3). In modo particolare negli animali di affezione le otiti infettive possono essere causate da microrganismi formanti biofilm (foto n.4).

Foto 1





Foto 2



Foto 3



Foto 4



Biofilm nelle otiti

I biofilm hanno un impatto importante sul trattamento e sulla resistenza antimicrobica. Sono frequenti e sotto-diagnosticati, sebbene possano essere facilmente identificati tramite otoscopia (foto n.5) o citologia (foto n.6). Clinicamente, formano un materiale adesivo, spesso e viscoso che è, di solito, marrone scuro o nero (foto n.7). In citologia appaiono come materiale amorfo di spessore variabile che imbriglia e può oscurare batteri e cellule (foto n.8).

Foto 5

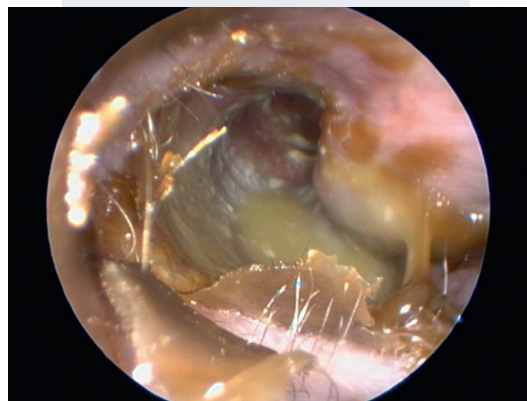


Foto 6

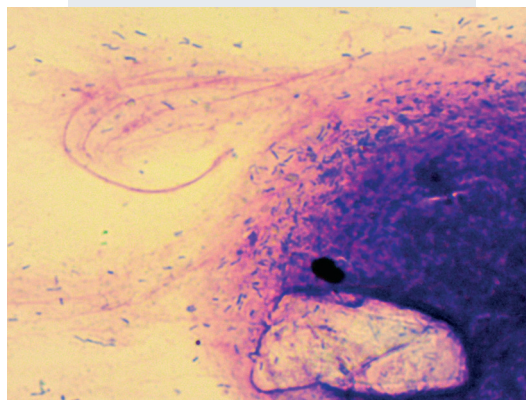
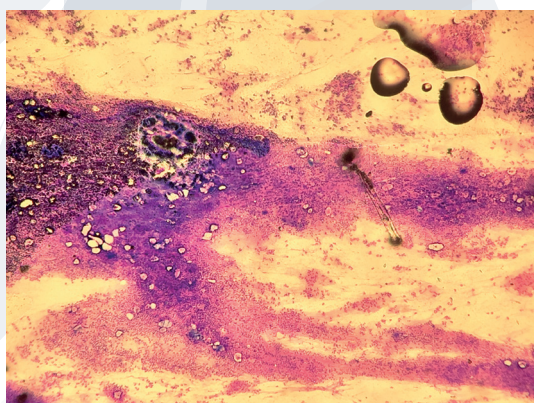


Foto 7



Foto 8



I biofilm sono clinicamente importanti poiché inattivano i detergenti, riducono la penetrazione degli antimicrobici e forniscono un serbatoio protetto di batteri. Inoltre, gli antimicrobici che richiedono la divisione batterica saranno meno efficaci, poiché i batteri nei biofilm si trovano di solito in uno stato di quiescenza. I biofilm possono anche facilitare lo sviluppo della resistenza antimicrobica, specialmente nei batteri Gram-negativi che acquisiscono mutazioni di resistenza graduale agli antimicrobici concentrazione-dipendenti⁴.

I biofilm generalmente inibiscono la penetrazione

antimicrobica (Grafico n.1). Laddove ciò si traduce in un improvviso calo della concentrazione di antimicrobici, la maggior parte dei batteri sarà esposta a concentrazioni di antimicrobici alte o basse. La maggior parte sarà quindi eliminata o inalterata. I batteri non raggiunti, nel biofilm, fungeranno da riserva e porteranno al fallimento del trattamento, ma la pressione selettiva per la resistenza è relativamente bassa. Tuttavia, con una certa penetrazione antimicrobica nel biofilm e una diminuzione graduale della concentrazione, alcuni batteri saranno esposti a concentrazioni intermedie. Ciò potrebbe fornire una finestra di selezione mutante in cui i batteri più suscettibili vengono uccisi ma sopravvivono i mutanti più resistenti all'interno della popolazione. Ciò porterà a fallimento del trattamento e recrudescenza dell'infezione con un isolato più resistente⁵.

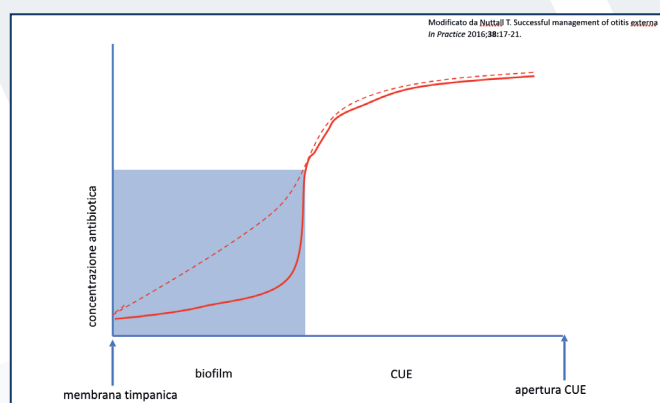


Grafico n.1

Impatto potenziale del biofilm sulla resistenza batterica. C'è una brusca diminuzione della concentrazione se l'antimicrobico non riesce a penetrare nel biofilm (linea continua). Il biofilm protegge i batteri che portano al fallimento del trattamento. Tuttavia, se l'antimicrobico può penetrare parzialmente nel biofilm, potrebbe verificarsi un graduale calo della concentrazione (linea tratteggiata). Le concentrazioni intermedie uccideranno batteri più sensibili ma permetteranno ai mutanti più resistenti di sopravvivere e proliferare. Ciò si tradurrà in fallimento del trattamento e recrudescenza dell'infezione con un isolato più resistente. Questi dati sono presi da studi teorici e in vitro



Terapie per prevenire e/o rompere il biofilm

I biofilm possono essere rotti e rimossi fisicamente mediante lavaggi e aspirazioni approfonditi.

Terapie topiche con molecole quali N-acetil cisteina, Tris-EDTA e peptidi antimicrobici hanno proprietà antimicrobiche e preventive nell'inibire la formazione di biofilm.

N-acetil cisteina (NAC)

NAC è utilizzata nel trattamento medico di pazienti con bronchite cronica. Gli effetti positivi del trattamento con NAC sono stati principalmente attribuiti alla sua proprietà di dissoluzione del muco, così come la capacità di ridurre la formazione di biofilm, con conseguente riduzione delle infezioni batteriche.

Una recente revisione sistematica delle pubblicazioni di otto studi clinici che hanno utilizzato NAC come trattamento adiuvante per eradicare i biofilm maturi preformati e per inibire la nuova produzione di biofilm ha suggerito un potenziale ruolo della NAC come una molecola adiuvante nel trattamento dei biofilm batterici, con un eccellente profilo di sicurezza ed efficacia. NAC, in combinazione con diversi antibiotici, ha significativamente aumentato la loro permeabilità negli strati più profondi del biofilm, superando il problema della resistenza al classico approccio terapeutico antibatterico⁶. NAC è disponibile come preparazioni topiche per le orecchie insieme a Tris-EDTA (Tris-NAC © ICF). La somministrazione sistemica di NAC è ben tollerata e può aiutare a dissolvere i biofilm nell'orecchio medio e in altre superfici mucose. La NAC sistemica e la bromexina possono anche liquefare il muco, facilitando il drenaggio nei casi di otite media secretiva primaria nei cani e l'otite media infiammatoria felina (polipi).

Tris-EDTA

L'acido etilenediaminotetraacetico (EDTA) è stato dimostrato avere attività antibatteriche. Quando combinato con trometamina (Tris) ha dimostrato di avere

la capacità di danneggiare le pareti delle cellule batteriche e aumentare la penetrazione microbica^{7,8}. È ben tollerato e non ototossico⁹. È stato dimostrato che ha effetti sinergici con un'ampia gamma di antibiotici tra cui la gentamicina¹⁰ e i fluorochinoloni, nonché la sulfadiazina argentica¹¹ e la clorexidina¹² (Otodine © ICF). Più recentemente, un lavoro *in vitro* ha dimostrato che Tris-EDTA può essere un utile trattamento aggiuntivo alla gentamicina e neomicina topiche, per i casi cronici di otite di *Pseudomonas* in cui potrebbero essersi sviluppati i biofilm¹³.

Peptidi antimicrobici (AMP)

Le AMP sono molecole effettrici del sistema immunitario innato. Rappresentano nuove molecole che sono state considerate come potenziali agenti alternativi agli antibiotici convenzionali. I peptidi antimicrobici appartengono ad una vasta famiglia di peptidi cationici che esercitano la loro attività battericida destabilizzando la membrana batterica o aumentandone la permeabilità¹⁴. I peptidi antimicrobici hanno dimostrato di avere attività ad ampio spettro contro molti ceppi di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, compresi ceppi resistenti ai farmaci e funghi. Inoltre, gli AMP mostrano una sinergia con gli antibiotici classici; neutralizzano le tossine e sono efficaci in modelli animali¹⁵. Oltre ai loro effetti antimicrobici, hanno mostrato anche un potenziale nella gestione dell'infezione di impianti e come rivestimento per protesi¹⁶. Il peptide antimicrobico AMP2041 (Peptivet oto gel© ICF) è recentemente diventato disponibile come prodotto veterinario topico in Europa¹⁷.

Il miele, l'argento colloidale e lo iodio povidone sono altre molecole con proprietà coadiuvanti a contrastare l'insorgenza di biofilm.



Conclusioni

La formazione di biofilm sembra essere comune in tutti i casi di otite cronica e recidivante. L'uso combinato di agenti che aiutino a rompere i biofilm sono utili laddove si sospetti la loro presenza. NAC è un farmaco sistemico che può essere utile per abbattere la formazione della matrice polimerica extracellulare che limita la diffusione di agenti antimicrobici nell'area dell'infezione. Principi topici efficaci a rompere e prevenire la formazione di biofilm sono NAC, tris-EDTA, oltre ad altre sostanze quali ad esempio l'argento colloidale.



Bibliografia

- 1) Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms, in *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, vol. 73, n° 2, giugno 2009, pp. 310–47
- 2) Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation, in *Nature*, vol. 436, n° 7054, agosto 2005, pp. 1171–5
- 3) Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Apr; 35(4): 322–32. Epub 2010 Feb 10. Review. PMID 20149602.
- 4) Paterson S. Biofilms: their importance in veterinary medicine. *Companion Animal* 2017 22:11, 659–668
- 5) Nuttall T. Successful management of otitis externa In *Practice* 2016; 38:17–21.
- 6) 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 Oct;18(19):2942–8
- 7) Wooley RE, Jones MS. Action of EDTA-Tris and antimicrobial agent combinations on selected pathogenic bacteria. *Vet Microbiol*. 1983;8(3):271–280
- 8) 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(6):243–245
- 9) Mills PC, Ahlstrom L, Wilson WJ. Ototoxicity and tolerance assessment of a TrisEDTA and polyhexamethylene biguanide ear flush formulation in dogs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2005;28(4):391–397
- 10) Buckley LM, McEwan NA, Nuttall T. Tris-EDTA significantly enhances antibiotic efficacy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Vet Dermatol*. 2013;24(5):519–e122.
- 11) Buckley LM, McEwan NA, Graham P, Nuttall T. Tris EDTA significantly potentiates the bactericidal activity of silver sulfadiazine against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Vet Dermatol*. 2012;23(Suppl 1):31
- 12) Guardabassi L, Ghibaudo G, Damborg P. In vitro antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris-EDTA. *Vet Dermatol*. 2010;21(3):282–286.
- 13) Pye C. et al: Evaluation of the impact of tromethamine edetate disodium dihydrate on antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm in vitro. *Veterinary Dermatology* 2014; 25, 120–123
- 14) Zasloff M. Antimicrobial peptides in health and disease. *Nature*. 2002;415:389–395
- 15) Chung PY, Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017.50, 405–410.
- 16) Zapotoczna M, Forde E, Hogan S et al. Eradication of *Staphylococcus aureus* biofilm infections using synthetic antimicrobial peptides. *J Infect Dis*. 2017;215(6):975– 983.
- 17) Ghibaudo G, Santospirito D, Sala A et al. In vitro antimicrobial activity of a gel containing antimicrobial peptide AMP2041, chlorhexidine digluconate and Tris-EDTA on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from canine otitis. *Vet Dermatol*. 2016;27(5):391–e98.

Tris-NAC[®]



Note:



ICF
Evoluzione della
Conoscenza



www.icfpet.com • customercare@icfsrl.it

