



Biofilm

Dr Sue Paterson MA VetMB DVD DipECVD FRCVS,
RCVS and European Specialist Veterinary Dermatology.
Virtual Vet Derms
virtualvetderms.com





Biofilm

Dr Sue Paterson MA VetMB DVD DipECVD FRCVS,
RCVS and European Specialist Veterinary Dermatology.
Virtual Vet Derms virtualvetderms.com

Introduzione

I batteri esistono in due forme. La prima è come organismi liberamente fluttuanti, più frequentemente riscontrati in infezioni acute. La seconda e predominante forma di crescita batterica è come biofilm (Costerton et al., 1978). I biofilm si possono definire come una comunità sessile derivata da cellule irreversibilmente attaccate fra di loro o a una superficie o interfaccia, immerse in una matrice di sostanze polimeriche extracellulari autoprodotte e che manifestano un fenotipo alterato rispetto al ritmo di crescita e alla trascrizione genica (Donlan and Costerton, 2002). I biofilm sono ubiquitari e si possono formare virtualmente su qualsiasi superficie del corpo. Nell'uomo sono stati riscontrati in casi di sinusite cronica, otite media cronica, tonsillite cronica, placca dentaria, laringite cronica, endocardite, infezioni polmonari, biliari e urinarie, osteomielite e ferite croniche (Bjarnsholt, 2013). I biofilm vengono riconosciuti come clinicamente rilevanti in medicina veterinaria e la loro presenza dovrebbe essere presa in considerazione in ogni processo morboso cronico (Gardner, 2011).

Non tutte le specie batteriche formano biofilm e il livello di produzione di biofilm può variare fra le diverse specie. I batteri riscontrati nelle malattie canine con una dimostrata capacità di produrre biofilm includono *Staphylococcus pseudintermedius* (Singh et al., 2013, Osland et al., 2012, Casagrande Proietti et al., 2015, Walker et al., 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (Pye et al., 2013) ed *Escherichia coli* (Nam et al., 2013, Oliveira et al., 2014, Vijay et al., 2015, Shimizu and Harada, 2017).

Il lavoro di Han (2015) ha dimostrato che più del 90% dei casi isolati di *Staphylococcus pseudintermedius*, sensibili e resistenti alla meticillina, sono in grado di produrre biofilm (Han et al., 2015). Uno studio di Pye (2013) ha dimostrato che il 40% dei casi isolati di *Pseudomonas aeruginosa* prelevati da casi clinici di otite esterna cronica canina erano capaci di produrre biofilm. In questo studio, la concentrazione minima inibente (MIC) di *Pseudomonas spp.* per polimixina B, neomicina, gentamicina ed enrofloxacin era significativamente più alta che per la forma planctonica, dimostrando l'aumentata resistenza degli organismi dei biofilm nei siti dove causano malattia clinica (Pye et al., 2013). *Malassezia pachydermatis* ha dimostrato la capacità di produrre biofilm (Figueredo et al., 2012) particolarmente in casi di dermatite seborroica (Bumroongthai et al., 2016).

Diagnosi d'infezioni da biofilm

Può essere difficile stabilire la presenza di una infezione da biofilm in medicina umana. Una serie di criteri può essere utile, come ad esempio la storia di una condizione che predisponga allo sviluppo della formazione di biofilm, come un impianto ortopedico; la presenza di risultati citologici coerenti con la formazione di biofilm, ad esempio aggregati microbici; una coltura che riveli microbi conosciuti per essere associati alla formazione di biofilm; ricorrenza dell'infezione, malgrado una terapia antimicrobica appropriata o fallimento terapeutico nonostante una terapia antibatterica appropriata basata su coltura e antibiogramma (Rowson and Townsend, 2016).



I medici in medicina umana hanno accesso a tecniche diagnostiche più specializzate, compresi i metodi molecolari, come la reazione a catena delle polimerasi e sonde ribosomiali per 16S. Entrambe queste tecniche hanno dimostrato un maggiore grado di sensibilità rispetto alla coltura (Hall- Stoodley et al., 2006), ma non sono ampiamente disponibili o economicamente fattibili nella clinica veterinaria. Tuttavia, i Medici Veterinari possono usare altri criteri diagnostici per formulare una diagnosi.

- 1) Storia di una condizione che predispone allo sviluppo di biofilm.
- 2) Sintomi clinici corrispondenti ad una infezione da biofilm
- 3) La presenza di risultati citologici compatibili con la formazione di biofilm
- 4) Fallimento terapeutico per mancanza di risposta o recidiva dell'infezione nonostante una terapia appropriata

Storia di una condizione che predispone allo sviluppo della formazione di biofilm

In pratica qualsiasi processo morboso cronico può portare alla formazione di una infezione da biofilm. Nei cani e nei gatti infezioni da biofilm sono state associate a infezioni del tratto urinario (Shimizu and Harada, 2017), malattie gastroenteriche (Silva et al., 2014, Reis et al., 2014), malattie periodontali (Holcombe et al., 2014, Oliveira et al., 2016), otite (Pye et al., 2013), dermatite (Casagrande Proietti et al., 2015, Bumroongthai et al., 2016), ferite croniche (Swanson et al., 2014, Bayne, 2014) e infezioni da impianti (Thompson et al., 2011, Gallagher and Mertens, 2012, Savicky et al., 2013, Nicoll et al., 2014)

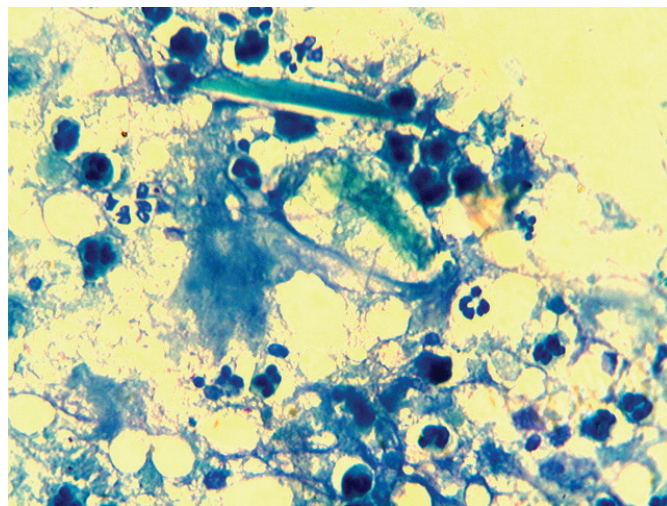
Sintomi compatibili con infezioni da biofilm

Dove è presente un'infezione da biofilm i microrganismi dentro il biofilm sono immersi in una matrice extracellulare di una sostanza polimerica autoprodotta (EPS).

Questa appare come una secrezione mucoide densa (vedi il caso di otite di George qui sotto).

Presenza di risultati citologici compatibili con la formazione di biofilm

I campioni citologici di secrezioni di una infezione si possono prelevare con un tampone sterile. Il tampone deve essere fatto rotolare delicatamente su un vetrino, fissato a caldo e colorato con una colorazione di Romanowsky tipo Diff Quik. L'esame al microscopio rivelerà segni di aggregati di organismi infettivi spesso con cellule infiammatorie, a differenza degli isolati separati riscontrati in casi di infezioni planctoniche. Tipicamente, i microrganismi sono sparsi e si trovano all'interno della matrice EPS autoprodotta, la quale si colora e appare come uno sfondo fine a merletto (figura 1).



(figura 1)

Fallimento terapeutico per mancanza di risposta o recidiva dell'infezione nonostante una terapia adeguata.

I casi tipici non risponderanno a terapia antibiotica basata su coltura e antibiogramma. Spesso lo stesso agente patogeno con le stesse caratteristiche di sensibilità viene identificato più volte (fig 2). In altri casi, l'infezione sembra risolta con terapia antibiotica, ma recidiva quando i farmaci vengono sospesi.

George è un Clumber spaniel di 6 anni con una storia di otite esterna cronica. La sua condizione aveva dimostrato una risposta parziale alla terapia antibiotica, ma ha recidivato diverse volte dopo la sospensione della stessa. Nell'occasione più recente era stato trattato con delle gocce otologiche a base di marbofloxacin prescritte sulla base del fatto che era stata rilevata in coltura una buona sensibilità dello *Pseudomonas spp* alla marbofloxacin.



Dopo 3 settimane di terapia il proprietario è tornato lamentando che il cane non era migliorato. *Pseudomonas spp.* è stato coltivato nuovamente con la seguente sensibilità

Antibiotico	Sensibilità
Framicetina	R
Gentamicina	R
Polimixina	S
Enrofloxacin	S
Marbofloxacin	S
Acido Fusidico	R
Florfenicolo	R

La mancanza di risposta alla terapia, le ripetute colture che rivelano lo stesso agente patogeno con la stessa sensibilità rendono questa infezione compatibile con un'infezione da biofilm.

(figura 2)

Terapia delle infezioni da biofilm

I batteri che crescono all'interno di un biofilm hanno una maggiore capacità di resistere e di persistere in presenza di alti livelli di antibiotici in confronto ai batteri in forma planctonica – questa proprietà si chiama **recalcitranza** (Rowson and Townsend, 2016). In termini clinici significa che i batteri nei biofilm possono essere da 100 a 1000 volte più resistenti agli antibiotici rispetto alle loro controparti planctoniche (Hoiby et al., 2010).



I batteri dei biofilm hanno diversi meccanismi che favoriscono la loro resistenza; questi includono:

- limitazione alla penetrazione degli antibiotici,
- crescita limitata a basse concentrazioni di ossigeno, espressione di geni specifici e la presenza di persistenti (Ciofu et al., 2017).

Per gestire efficacemente le infezioni da biofilm dovrà essere analizzata una gamma di diverse opzioni terapeutiche. La rimozione meccanica del biofilm è il metodo più efficace, anche se non è sempre fattibile. Oltre al metodo tradizionale della terapia antibiotica, altre strategie innovative anti-biofilm sono state valutate sia in medicina umana sia in medicina veterinaria. Spesso le terapie combinate di farmaci antimicrobici e altri agenti anti biofilm sono le più riuscite. Il Tris-EDTA è stato riconosciuto come principio di grande supporto nel trattamento delle infezioni croniche da Gram-negativi. Uno dei principi più nuovi che hanno dimostrato un'eccellente attività contro i biofilm è la N-Acetil Cisteina.

Tris EDTA

L'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) ha dimostrato eccellente supporto nell'attività antibatterica quando viene associato alla trometamina (Tris). Gli studi hanno confermato che:

- 1) **danneggia la parete cellulare dei batteri planctonici**
- 2) **sinergizza l'attività di alcuni antibiotici**
- 3) **ha un basso potenziale ototossico**
- 4) **è utile come terapia aggiuntiva nelle infezioni da biofilm**

Il Tris-EDTA ha dimostrato di avere la proprietà di **danneggiare le pareti cellulari di batteri planctonici** aumentando così la permeabilità agli agenti antimicrobici (Wooley and Jones, 1983, Farca et al., 1997, Buckley et al., 2013). E' ben tollerato e dimostra una **bassa ototossicità** (Paterson, 2018). Ha dimostrato di avere un effetto **additivo con un'ampia gamma di antibiotici** compresi gentamicina e fluorochinoloni (Buckley et al., 2013) e anche sulfadiazina e clorexidina

(Guardabassi et al., 2010). Più recentemente studi *in vitro* hanno comprovato che il Tris-EDTA potrebbe essere un utile ed efficace ausilio per casi di otite cronica da *Pseudomonas* laddove si sono sviluppati biofilm, nel caso in cui gentamicina o neomicina debbano essere utilizzati come trattamento topico (Pye et al., 2014). Grazie alla sua proprietà di potenziare gli antibiotici, il Tris-EDTA è probabilmente utilizzato al meglio come lavaggio pre terapia nei casi di infezioni acute da Gram negativi.

N-Acetil Cisteina

La N-Acetil Cisteina è un mucolitico che ha dimostrato di avere un'ampia gamma di proprietà aggiunte. Gli studi hanno attestato che:

- 1) **è un notevole supporto in corso di infezioni batteriche**
- 2) **mostra sinergia con alcuni antibiotici**
- 3) **ha un ruolo essenziale nella diminuzione del biofilm**
- 4) **induce ridotta produzione di EPS**
- 5) **facilita la rottura dei biofilm maturi**

N-Acetil Cisteina è un valido supporto in corso di infezioni batteriche sostenute da diversi patogeni. *Pseudomonas aeruginosa* sembra essere particolarmente sensibile con una concentrazione inibente minima (MIC) di appena 2- 20 ug/ml (Parry and Neu, 1977). Uno studio più recente di Zhao (2010) ha dimostrato che NAC ha una MIC di 10 – 40mg/ml per isolati di *Pseudomonas aeruginosa* provenienti da infezioni respiratorie umane. Uno studio di May (2016) ha dimostrato che NAC ha una MIC di 5 – 20mg/ml per isolati di otite per *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium spp.* *Streptococcus beta* emolitici (May et al., 2016). **È stato dimostrato sinergismo** con alcuni antibiotici di terza generazione come cabenicillina e ticarcillina (Roberts and Cole, 1981) e, anche se questi antibiotici sono soggetti a restrizioni per uso veterinario, questo studio preliminare ha avvalorato il potenziale della capacità di NAC di aumentare l'attività degli antibiotici.

Inoltre, è anche stato dimostrato *in vitro* che NAC è sinergico con ciprofloxacina (El-Feky et al., 2009), indicando che una combinazione di fluorochinoloni con NAC può essere efficace in casi di infezioni da *Pseudomonas spp.*

NAC riduce la formazione di biofilm da parte di una serie di batteri, in particolare *Staphylococcus epidermidis* (Perez-Giraldo et al., 1997); *E.coli* (Marchese et al., 2003) e *Pseudomonas aeruginosa* (Zhao and Liu, 2010). Sembra che abbia la capacità di ridurre l'aderenza e anche **la produzione di EPS**. La produzione di EPS da parte dei batteri del biofilm agisce come una barriera fisica alla penetrazione dei farmaci giocando una parte significativa nell'aumentata resistenza alla terapia antibiotica.

Uno studio di Zhao (2010) ha dimostrato che la produzione di EPS da parte di *Pseudomonas aeruginosa* si riduce significativamente in presenza di NAC. *In vitro* la produzione di EPS è diminuita di un 27% e 45% in presenza di 0.5mg/ml e 1mg/ml NAC (Zhao and Liu, 2010). Inoltre NAC ha un effetto diretto **favorendo la rottura dei biofilm** maturi e riducendo la vitalità delle cellule sessili all'interno del biofilm (Olofsson et al., 2003).

Studi in medicina umana hanno dimostrato che NAC è molto efficace nella terapia di casi di otite refrattaria utilizzata insieme alla ciprofloxacina

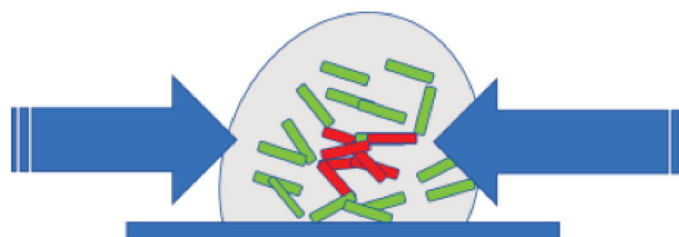
sotto forma di preparazione otica registrata (Ciprodex otic). In uno studio *in vivo* Ciprodex otic è stato usato con 0.5 o 2.0% di NAC. Sono stati inclusi sette soggetti con una media di 18,4 mesi di otorrea nonostante terapia. In 6 dei 7 soggetti, l'interruzione dell'otorrea è stata raggiunta dopo 4 settimane di terapia. In audiometrie pre e post terapia, nessuno dei soggetti ha manifestato ototossicità (Choe et al., 2007). Un secondo studio *in vitro* con uso di ciprofloxacina ha dimostrato che, laddove i ceppi di *P. aeruginosa* erano resistenti, una pre terapia con NAC superava la resistenza portando alla risoluzione dell'infezione (Lea et al., 2014).

Uso veterinario: basandosi su esperienze che derivano dalla medicina umana, sembrerebbe essere adatto ad essere usato con fluorochinoloni, scelti secondo coltura e antibiogramma, nei casi di otite cronica dove gli antibiotici di prima linea sono inefficaci. Il NAC sembrerebbe essere promettente anche come agente antibatterico usato da solo in infezioni croniche (May et al., 2016) e può essere utile con altri farmaci topici in presenza di biofilm, data la sua capacità di ridurre la produzione di EPS *in vitro* e ridurre l'attaccamento batterico, usato come lavaggio prima della terapia antimicrobica. Un protocollo idoneo per otite esterna da *Pseudomonas spp.* è descritto qui sotto.

POSSIBILE MODO DI AZIONE DEI FARMACI DISTRUTTORI DI BIOFILM

NAC

Ridotta produzione di EPS.
Favorisce la rottura dei biofilm maturi.



Tris EDTA

Danno diretto alla parete cellulare batterica così da aumentare la penetrazione.
Può avere effetto sulla pompa di efflusso batterica



(figura 3)

Gestione dell'otite di George

La storia clinica di George, la risposta alla terapia e le ripetute colture sono compatibili con la presenza di un'infezione da biofilm. La combinazione di NAC in forma di lavaggio pre terapia è utile prima dell'applicazione di antibiotici.

Passo 1. pulire minuziosamente l'orecchio per rimuovere la maggior quantità possibile di secrezioni. È meglio eseguire questa manovra sotto sedazione o anestesia generale; un'adeguata analgesia è molto importante per mantenere il cane tranquillo durante e dopo il lavaggio.

Passo 2. Riempire il canale auricolare con una soluzione di Tris-EDTA e N-Acetil Cisteina (Tris-NAC®) e lasciare agire per almeno 5 minuti.

Passo 3. Rimuovere la maggior quantità possibile di liquido in eccesso mediante suzione o assorbendo il liquido con un tampone di cotone. Inserire 0.5ml di gocce di marbofloxacin nell'orecchio.

Il cane può tornare a casa con un detergente auricolare (Otodine®) per pulire l'orecchio prima di applicare la soluzione di Tris-EDTA e NAC (Tris-NAC®) che dovrà rimanere in situ per 5 minuti prima di rimuovere l'eccesso e applicare la soluzione di antibiotico.

Conclusioni

I biofilm batterici sono un'importante causa di infezione nell'uomo e negli animali. Contribuiscono ad un'ampia gamma di malattie veterinarie, comprese infezioni urinarie, malattia periodontale, infezioni di ferite e otiti. La terapia antimicrobica convenzionale spesso non riesce ad eliminare le infezioni da biofilm per cui attualmente si stanno sviluppando terapie innovative per far fronte a queste infezioni. N-Acetil Cisteina promette di essere un agente innovativo utile nella gestione di infezioni da biofilm.

Bibliografia

- BAYNE, D. 2014. Biofilm-infected wounds. *J Am Vet Med Assoc*, 244, 1126.
- BJARNSHOLT, T. 2013. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl*, 1-51.
- BUCKLEY, L. M., MCEWAN, N. A. & NUTTALL, T. 2013. Tris-EDTA significantly enhances antibiotic efficacy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Vet Dermatol*, 24, 519-e122.
- BUMROONGTHAI, K., CHETANACHAN, P., NIYOMTHAM, W., YURAYART, C. & PRAPASARAKUL, N. 2016. Biofilm production and antifungal susceptibility of co-cultured *Malassezia pachydermatis* and *Candida parapsilosis* isolated from canine seborrheic dermatitis. *Med Mycol*, 54, 544-9.
- CASAGRANDE PROIETTI, P., STEFANETTI, V., HYATT, D. R., MARENZONI, M. L., CAPOMACCIO, S., COLETTI, M., BIETTA, A., FRANCIOSINI, M. P. & PASSAMONTI, F. 2015. Phenotypic and genotypic characterization of canine pyoderma isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* for biofilm formation. *J Vet Med Sci*, 77, 945-51.
- CHOE, W. T., MURRAY, M. T., STIDHAM, K. R. & ROBERSON, J. B. 2007. N-Acetylcysteine as an adjunct for refractory ear infections. *Otol Neurotol*, 28, 1022-5.
- CIOFU, O., ROJO-MOLINERO, E., MACIA, M. D. & OLIVER, A. 2017. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*, 125, 304-319.
- COSTERTON, J. W., GEESEY, G. G. & CHENG, G. K. 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.*, 238, 86-95.
- DONLAN, R. M. & COSTERTON, J. W. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15, 167-193.
- EL-FEKY, M. A., EL-REHEWY, M. S., HASSAN, M. A., ABOLELLA, H. A., ABD EL-BAKY, R. M. & GAD, G. F. 2009. Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. *Pol J Microbiol*, 58, 261-7.
- FARCA, A. M., PIROMALLI, G., MAFFEI, F. & RE, G. 1997. Potentiating effect of EDTA-Tris on the activity of antibiotics against resistant bacteria associated with otitis, dermatitis and cystitis. *J Small Anim Pract*, 38, 243-5.
- FIGUEREDO, L. A., CAFARCHIA, C., DESANTIS, S. & OTRANTO, D. 2012. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Vet Microbiol*, 160, 126-31.
- GALLAGHER, A. D. & MERTENS, W. D. 2012. Implant removal rate from infection after tibial plateau leveling osteotomy in dogs. *Vet Surg*, 41, 705-11.
- GARDNER, A. J. 2011. Biofilms and role to infection and disease in veterinary Medicine. In: PERCIVAL, S. L., KNOTTENBELT, D. C. & COCHRANE, C. A. (eds.) *Biofilms and Veterinary Medicine* Springer Berlin Heidelberg.
- GUARDABASSI, L., GHIBAUDO, G. & DAMBORG, P. 2010. In vitro antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris-EDTA. *Vet Dermatol*, 21, 282-6.
- HALL- STOODLEY, L., HU, F. Z. & GIESEKE, A. 2006. Direct detection of bacterial biofilms on the middle ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA*, 296, 202-211.
- HAN, J. I., YANG, C. H. & PARK, H. M. 2015. Emergence of biofilm-producing *Staphylococcal pseudintermedius* isolated from healthy dogs in South Korea. *Vet Q*, 35, 207-10.
- HOIBY, N., BJARNSHOLT, T., GIVSKOV, M., MOLIN, S. & CIOFU, O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, 35, 322-32.
- HOLCOMBE, L. J., PATEL, N., COLYER, A., DEUSCH, O., O'FLYNN, C. & HARRIS, S. 2014. Early canine plaque biofilms: characterization of key bacterial interactions involved in initial colonization of enamel. *PLoS One*, 9, e113744.
- LEA, J., CONLIN, A. E., SEKIROV, I., RESTELLI, V., AYAKAR, K. G., TURNBULL, L., DOYLE, P., NOBLE, M., RENNIE, R., SCHREIBER, W. E. & WESTERBERG, B. D. 2014. In vitro efficacy of N-acetylcysteine on bacteria associated with chronic suppurative otitis media. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 43, 20.
- MARCHESE, A., BOZZOLASCO, M., GUALCO, L., DEBBIA, E. A., SCHITO, G. C. & SCHITO, A. M. 2003. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, 22 Suppl 2, 95-100.
- MAY, E. R., CONKLIN, K. A. & BEMIS, D. A. 2016. Antibacterial effect of N-acetylcysteine on common canine otitis externa isolates. *Vet Dermatol*, 27, 188-e47.

- NAM, E. H., KO, S., CHAE, J. S. & HWANG, C. Y. 2013. Characterization and zoonotic potential of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs. *J Microbiol Biotechnol*, 23, 422-9.
- NICOLL, C., SINGH, A. & WEESE, J. S. 2014. Economic impact of tibial plateau leveling osteotomy surgical site infection in dogs. *Vet Surg*, 43, 899-902.
- OLIVEIRA, M., DIAS, F. R. & POMBA, C. 2014. Biofilm and fluoroquinolone resistance of canine *Escherichia coli* uropathogenic isolates. *BMC Res Notes*, 7, 499.
- OLIVEIRA, M., TAVARES, M., GOMES, D., TOURET, T., SAO BRAZ, B., TAVARES, L. & SEMEDO-LEMSADDEK, T. 2016. Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from dogs with periodontal disease. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 46, 27-31.
- OLOFSSON, A. C., HERMANSSON, M. & ELWING, H. 2003. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 69, 4814-22.
- OSLAND, A. M., VESTBY, L. K., FANUELSEN, H., SLETTEMEAS, J. S. & SUNDE, M. 2012. Clonal diversity and biofilm-forming ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemother*, 67, 841-8.
- PARRY, M. F. & NEU, H. C. 1977. Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro. *J Clin Microbiol*, 5, 58-61.
- PATERSON, S. 2018. Brainstem auditory evoked responses in 37 dogs with otitis media before and after topical therapy. *J Small Anim Pract*, 59, 10-15.
- PEREZ-GIRALDO, C., RODRIGUEZ-BENITO, A., MORAN, F. J., HURTADO, C., BLANCO, M. T. & GOMEZ-GARCIA, A. C. 1997. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*, 39, 643-6.
- PYE, C. C., SINGH, A. & WEESE, J. S. 2014. Evaluation of the impact of tromethamine edetate disodium dihydrate on antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm in vitro. *Vet Dermatol*, 25, 120-3, e33-4.
- PYE, C. C., YU, A. A. & WEESE, J. S. 2013. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro. *Vet Dermatol*, 24, 446-9, e98-9.
- REIS, A. C., SILVA, J. O., LARANJEIRA, B. J., PINHEIRO, A. Q. & CARVALHO, C. B. 2014. Virulence factors and biofilm production by isolates of *Bacteroides fragilis* recovered from dog intestinal tracts. *Braz J Microbiol*, 45, 647-50.
- ROBERTS, D. & COLE, P. 1981. N-acetylcysteine potentiates the anti-pseudomonas activity of carbenicillin in vitro. *J Infect*, 3, 353-9.
- ROWSON, C. & TOWNSEND, R. 2016. Biofilms: prevention and treatment. *British Journal of Hospital Medicine* 77, 699-703.
- SAVICKY, R., BEALE, B., MURTAUGH, R., SWIDERSKI-HAZLETT, J. & UNIS, M. 2013. Outcome following removal of TPLO implants with surgical site infection. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 26, 260-5.
- SHIMIZU, T. & HARADA, K. 2017. Determination of minimum biofilm eradication concentrations of orbifloxacin for canine bacterial uropathogens over different treatment periods. *Microbiol Immunol*, 61, 17-22.
- SILVA, J. O., MARTINS REIS, A. C., QUESADA-GOMEZ, C., PINHEIRO, A. Q., FREIRE, R. S., ORIA, R. B. & DE CARVALHO, C. B. 2014. In vitro effect of antibiotics on biofilm formation by *Bacteroides fragilis* group strains isolated from intestinal microbiota of dogs and their antimicrobial susceptibility. *Anaerobe*, 28, 24-8.
- SINGH, A., WALKER, M., ROUSSEAU, J. & WEESE, J. S. 2013. Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. *BMC Vet Res*, 9, 93.
- SWANSON, E. A., FREEMAN, L. J., SELEEM, M. N. & SNYDER, P. W. 2014. Biofilm-infected wounds in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 244, 699-707.
- THOMPSON, A. M., BERGH, M. S., WANG, C. & WELLS, K. 2011. Tibial plateau levelling osteotomy implant removal: a retrospective analysis of 129 cases. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 24, 450-6.
- VIJAY, D., DHAKA, P., VERGIS, J., NEGI, M., MOHAN, V., KUMAR, M., DOJAD, S., POHARKAR, K., KUMAR, A., MALIK, S. S., BARBUDDHE, S. B. & RAWOOL, D. B. 2015. Characterization and biofilm forming ability of diarrhoeagenic enteroaggregative *Escherichia coli* isolates recovered from human infants and young animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 38, 21-31.
- WALKER, M., SINGH, A., NAZARALI, A., GIBSON, T. W., ROUSSEAU, J. & WEESE, J. S. 2016. Evaluation of the Impact of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Biofilm Formation on Antimicrobial Susceptibility. *Vet Surg*, 45, 968-971.
- WOOLEY, R. E. & JONES, M. S. 1983. Action of EDTA-Tris and antimicrobial agent combinations on selected pathogenic bacteria. *Vet Microbiol*, 8, 271-80.
- ZHAO, T. & LIU, Y. 2010. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol*, 10, 140.

Tris-NAC[®]





www.icfpet.com • customer-care@icfsrl.it

