

# relazioni

## SESSIONE 8

### Infezioni da Biofilm Microbici: antibiotico-resistenza, virulenza, diagnostica e approcci farmacologici

Venerdì 5 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

---

#### S8.1

---

##### BIOFILM MICROBICI E INFEZIONI UMANE

**Donelli G.**

*Dipartimento di Tecnologie e Salute,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

I biofilm possono essere definiti come strutture tridimensionali eterogenee costituite da microrganismi a crescita sessile che si moltiplicano immersi in una matrice polimerica esocellulare da essi stessi prodotta. Il carattere non continuo del biofilm è dovuto alla presenza di spazi interstiziali che rendono possibile la diffusione sia dei nutrienti che delle molecole segnale che modulano la densità di popolazione.

La crescita microbica in biofilm si può instaurare nell'uomo sia a livello tissutale che sulle superfici di dispositivi medici. Nel primo caso, gli esempi più noti sono rappresentati dalla placca dentale, dal biofilm microbico multispecie che a livello intestinale funge da efficiente barriera contro i microrganismi patogeni di origine alimentare e dalla flora microbica vaginale a crescita sessile.

È ben noto inoltre come l'impianto temporaneo o permanente nell'organismo di dispositivi medici, quali cateteri vascolari, cateteri urinari, stent biliari, protesi ortopediche, etc., ne espone le superfici alla colonizzazione da parte di specie microbiche diverse, a seconda del distretto corporeo e delle modalità d'inserzione, con successiva formazione di biofilm.

Nonostante sia stato ormai accertato che oltre i due terzi delle infezioni persistenti sono associate alla formazione di un biofilm microbico e i Centers for Disease Control statunitensi abbiano recentemente stimato che il 65% delle infezioni ospedaliere sono associate a microrganismi che crescono in biofilm, esiste ancora una limitata consapevolezza a livello clinico dell'importanza dei biofilm microbici. Vi è in partico-

lare l'esigenza di affrontare in modo adeguato i problemi correlati alla assai più elevata resistenza agli agenti antimicrobici mostrata dai microrganismi a crescita sessile. Il raggiungimento di tale obiettivo è tuttavia subordinato alla messa a punto di metodi appropriati per saggiarne la sensibilità antibiotica.

È inoltre necessario lo sviluppo di strategie alternative o complementari a quelle già in uso per il controllo delle infezioni microbiche, che mirino a prevenire le fasi iniziali e/o siano capaci di intervenire nei processi di maturazione e accrescimento dei biofilm.

---

#### S8.2

---

##### BIOFILM STAFILOCOCCICI, VIRULENZA E ANTIBIOTICO-RESISTENZA

**Stefani S.**

*Dipartimento di Scienze Microbiologiche,  
Università degli Studi di Catania (I)*

*Staphylococcus aureus* è uno dei patogeni più importanti nell'ambito delle infezioni acquisite in nosocomio ed in comunità, responsabile di un molteplice numero di infezioni, dalle più banali a quelle ad elevata severità. La sua patogenicità è in relazione alla espressione di un complesso insieme di fattori di virulenza che possono essere localizzati sulla superficie cellulare o secreti nell'ambiente circostante. Questi diversi fattori sono espressi in modo coordinato durante i diversi stadi dello sviluppo cellulare grazie all'attività concertata di diversi sistemi di regolazione tra cui svolgono un ruolo principale l'*accessory gene regulator (agr)* e il regolatore stafilococcico accessorio *sarA*. È stato messo in evidenza, infatti, che le proteine extracellulari possono essere suddivise in due gruppi basandosi esclusivamente sul momento della loro espressione: proteine che sono espresse solamente ad una densi-

tà cellulare bassa e proteine che, al contrario, sono espresse ad alte concentrazioni cellulari. Ci sono evidenze che il sistema *agr* abbia un ruolo di regolatore positivo di proteine (proteasi, emolisine e lipasi) espresse ad alta densità cellulare (*quorum sensing*), mentre diventa un regolatore negativo di proteine che vengono espresse durante la fase esponenziale di crescita. Da quanto detto risulta evidente che la regolazione specie-specifica di molti determinanti di virulenza, sotto il controllo di numerosi stimoli esterni, possa notevolmente influenzare i fattori di virulenza che ogni volta vengono espressi, con un conseguente impatto sulle diverse potenzialità di causare malattia che ogni ceppo esprime.

Recentemente e da più parti, emergono evidenze che la complessa regolazione *agr*-mediata, possa correlare con altre funzioni del microrganismo, tra le quali ricordiamo appunto la resistenza agli antibiotici (soprattutto nei ceppi VISA) e la produzione di biofilm. Il locus *agr* è influenza, almeno in parte, la formazione di questa complessa matrice-biofilm, coinvolta nella patogenesi degli stafilococchi in infezioni catetere-correlate e/o altre infezioni croniche, e recenti risultati ottenuti dal nostro gruppo di ricerca, confermano questo ruolo, almeno in *S.aureus*.

Virulenza, capacità di produrre biofilm e il complesso profilo di antibiotico-resistenza, sono fattori che moltiplicano notevolmente la capacità degli stafilococchi e di *S.aureus*, di esplicare la sua azione patogena.

---

### S8.3

#### **RUOLO ED IMPORTANZA DI MOLECOLE SEGNALE NELLA FORMAZIONE DI BIOFILM BATTERICI, E LORO EFFETTO SU MECCANISMI DI PATOGENESI E DI RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI**

**Landini P.**

I microrganismi possono organizzarsi in comunità adese ad una superficie solida dette biofilm, e caratterizzate dalla produzione di fattori di adesione, polisaccaridi capsulari, e fattori di virulenza. La produzione di fattori di adesione e di formazione del biofilm è un determinante di virulenza in molti batteri patogeni. Nei biofilm, i batteri crescono inglobati in una matrice extracellulare costituita sia da fibre di natura proteica, come i pili, che da diversi tipi di polisaccaridi, che insieme compongono la cosiddetta sostanza esopolimerica (EPS). Oltre all'adesione alle superfici solide, la presenza dell'EPS conferisce protezione da stress ambientali, quali lo stress ossidativo, l'attacco da parte dei macrofagi, e ha un ruolo anche nella resistenza agli antibiotici. Inoltre, i biofilm possono presentare anche

una ridotta sensibilità agli antibiotici, rappresentando così un problema nelle infezioni batteriche. La transizione da cellula singola a biofilm e la crescita e mantenimento del biofilm stesso sono regolati in maniera co-ordinata da diverse molecole segnale. Verranno presentati esempi di produzione di fattori di adesione cellulare e di virulenza in relazione alla produzione di molecole segnale in *Pseudomonas aeruginosa* (segnali di quorum sensing) e in enterobatteri (effetto di GMP-diciclico sulla produzione di polisaccaridi capsulari). La detezione (diretta o indiretta) di molecole segnale legate al biofilm potrebbe consentire una valutazione del potenziale di virulenza e di sensibilità agli antibiotici di ceppi batterici isolati clinicamente.

---

### S8.4

#### **METODICHE DI VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA NEI CONFRONTI DI BIOFILM BATTERICI**

**Zampaloni C.**

La ridotta suscettibilità, fino a 10-1000 volte inferiore, agli agenti antimicrobici osservata nei biofilm, ha reso questa comune forma di sviluppo batterico motivo di allarme soprattutto in ambito clinico, dove più del 60% delle infezioni batteriche sono date da biofilm.

La determinazione dell'attività antimicrobica di potenziali prodotti anti-biofilm è la base per il trattamento di queste infezioni. Tuttavia i metodi di indagine normalmente impiegati per le cellule in fase planctonica risultano inadeguati rendendo necessario lo sviluppo di nuove metodiche che tengano conto delle spiccate differenze tra planctonico e sessile.

Inoltre la lotta contro il biofilm non è finalizzata soltanto all'uccisione delle cellule batteriche; i prodotti anti-biofilm potrebbero essere designati per la rimozione dello "slime" del biofilm, per prevenire una possibile ricrescita batterica una volta eliminato il biofilm e ancor prima per impedire l'adesione cellulare al supporto.

I metodi sviluppati negli ultimi anni per la valutazione dell'attività di agenti antimicrobici nei confronti di biofilm batterici hanno cercato di dare risposta a tutti questi obiettivi. Sono metodi semplici o sofisticati, per test di routine o analisi più fini, che utilizzano sistemi stazionari di sviluppo del biofilm (microtiter plates: TSP, MBEC) o a flusso continuo (Rotating disk reactor, flow chamber system), semplici coloranti (alamar blue, cristal violet) o sonde fluorescenti (live/dead kit) per la rilevazione ed anche il supporto della microscopia.

In particolare, due sistemi per la valutazione dell'attività di agenti antimicrobici nei confronti di biofilm batterici, quali il saggio in microtiter plate con succes-