

PROBLEMATICHE CLINICHE DELLA BIOADESIVITÀ BATTERICA AI MEZZI DI SINTESI ED ALL'OSSO IN ESITO A TRAUMA

U. TARANTINO, G. CANNATA, G. MONTELEONE,
A. ZAREH, L. SELAN*
(Roma)

La causa principale delle difficoltà incontrate nel trattamento delle infezioni dell'osso e dei mezzi di sintesi è senza dubbio riferibile alla capacità che hanno i batteri di aderire ai biomateriali più diversi formando biofilm, rivestiti da una matrice esopolimerica che contribuisce in misura determinante a proteggerli dagli agenti nocivi esterni quali antibiotici, disinfettanti, anticorpi e fagociti. Attraverso la formazione del biofilm si genera una comunità cellulare protetta da una sorta di capsula all'interno della quale le sollecitazioni ambientali risultano notevolmente ridotte (Besnier, 1998; Carsenti-Etesse et al., 1998).

Per quanto i biomateriali siano andati migliorando nel tempo in relazione alla biocompatibilità e gli impianti siano sempre più perfezionati dal punto di vista ingegneristico, l'inserimento di un materiale estraneo all'organismo costituisce comunque uno stimolo irritativo che tende a promuovere la colonizzazione batterica piuttosto che l'integrazione da parte delle cellule dell'ospite. Per di più l'osso traumatizzato o necrotico può essere considerato alla stregua di un biomateriale (Thaller et al., 1988).

Oltre a garantire una maggiore resistenza alla terapia, la modalità di crescita in biofilm è alla base delle notevoli difficoltà comportate dalla diagnosi di queste infezioni, che spesso permangono a lungo in uno stadio subclinico per poi esplodere acutamente quando ormai i tessuti e gli impianti risultano diffusamente colonizzati dai batteri. Una percentuale significativa di impianti rimossi da soggetti asintomatici risulta positiva alle prove colturali (Perry, 1996). Poiché è dimostrato che la resistenza del biofilm batterico è direttamente proporzionale alla sua età, si può ben comprendere quale sia l'importanza di questa difficoltà diagnostica.

Il grado di adesività batterica è influenzato sia dalle caratteristiche fisico-chimiche del substrato che dalle caratteristiche intrinseche delle cellule batteriche. L'adesione dei batteri su un substrato è mediata dalla produzione di una matrice prevalentemente polisaccaridica definita glicocalice o slime o EPS (sostanze polisaccaridiche esocellulari). È probabile che la correlazione tra la resistenza del biofilm agli antibiotici e la sua età sia conseguenza di una progressiva stabilizzazione chimica degli esopolisaccaridi.

Una caratteristica importante dei batteri che crescono in biofilm è la notevole differenza morfologica e metabolica fra le cellule degli strati superficiali e le cellule degli strati più profondi, come se il biofilm costituisca un vero e proprio tessuto dotato di meccanismi ancora non del tutto chiariti che regolano

Dalla Cattedra di Ortopedia e Traumatologia dell'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata".

* Dall'Istituto di Microbiologia dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza".

le interazioni e le funzioni cellulari. Le cellule più superficiali hanno una certa disponibilità di ossigeno e di sostanze nutritive e la possibilità di allontanare i prodotti del catabolismo cellulare, e di conseguenza appaiono normodimensionate e dotate di attività replicativa. Al contrario, le cellule che occupano gli strati più profondi del biofilm hanno un metabolismo rallentato, minore disponibilità di ossigeno e di elementi nutritivi, un accumulo forzato di cataboliti e quindi si presentano dimensionalmente ridotte e morfologicamente alterate, pur mantenendo attivi i processi di biosintesi proteica. Queste differenze possono costituire una prima spiegazione per la notevole resistenza agli antibatterici ed ai fagociti presentata dalle cellule più profonde del biofilm.

L'attività della maggior parte degli antibiotici è strettamente legata alla presenza di cellule batteriche in attiva fase replicativa: in questi termini è possibile spiegare come misure farmacologiche valutate in vitro su cellule in attiva replicazione si rivelino inefficaci nei casi di infezioni sostenute da biofilm con attività replicativa molto rallentata. Infatti un aspetto ricorrente delle infezioni legate all'adesività batterica è la relativa facilità con cui si possono controllare le manifestazioni cliniche della batteriemia dovuta alla forma libera o planctonica del patogeno, mentre assai più complessa risulta l'eradicazione della forma sessile, poco sensibile a trattamenti più drastici e prolungati di quelli attivi sulle cellule libere. Pertanto al momento della diagnosi risulta indispensabile accertare il ruolo del meccanismo di adesione da glicocalice tenendo quindi presente l'aumentata resistenza del patogeno agli antibatterici nella scelta della terapia e cercando di riprodurre al meglio in vitro quanto avviene in vivo. Poiché è stato recentemente affermato che "malgrado l'importanza del glicocalice, non esiste una tecnica affidabile per indagare la sua produzione" (Perry, 1996), riteniamo opportuno riportare alcune nostre esperienze al riguardo.

IDENTIFICAZIONE DEL BIOFILM

Procedimenti adeguati per determinare rapidamente la presenza dei batteri produttori di glicocalice nei campioni clinici sono rappresentati da colorazioni specifiche che permettono di dimostrare il biofilm sia su supporti inerti che su reperti biologici. La colorazione originale da noi proposta (Berlutti et al., 1990) comporta il seguente procedimento: fissazione in glutaraldeide al 2,5% in tampone fosfato alcalino sterile per 2 ore; successiva immersione in acqua distillata per 1', soluzione satura di cloruro di calcio per 15', acqua distillata per 1', argento nitrate al 5% per 15', idrochinone all'1% per 2', acqua distillata per 1', sodio tiosolfato al 5% per 2', acqua distillata per 1'. Tale metodica si basa sul principio di legare cationi bivalenti (Ca^{++}) alla struttura polianionica del glicocalice, mettendoli quindi in evidenza con una colorazione specifica; essa trova applicazione sulle colture, sui campioni di tessuto osseo e sugli impianti. Nelle colture i ceppi batterici vengono incubati in provette di vetro contenenti brodo con palline di polistirene e frammenti di vetrini coprioggetti sterili quali supporti per la crescita delle cellule batteriche in biofilm. I campioni di tessuto osseo vengono decalcificati in EDTA al 15% ed inclusi in paraffina prima di essere colorati. L'importanza di una tecnica che può essere eseguita direttamente sul campione clinico è resa ancora maggiore dalla rapida perdita della produzione di glicocalice nelle colture in vitro, particolarmente su terreni solidi. La colorazione viene considerata positiva quando si rileva la presenza di cellule colorate di nero e di biofilm neri sia macroscopicamente che microscopicamente (Fig. 1A-B-C). Con l'ausilio di metodiche di indagine quali la bioluminescenza e la microscopia elettronica a scansione è possibile confermare la presenza delle forme batteriche sessili (Fig. 2).

STRATEGIE TERAPEUTICHE

Il trattamento delle infezioni del tessuto osseo e degli impianti ortopedici sostenute da batteri che formano biofilm può essere considerato uno dei problemi più rilevanti della terapia antimicrobica. La consapevolezza del ruolo svolto dal glicocalice nella resistenza dei microrganismi permette di comprendere i reali limiti della terapia antibiotica standard nelle varie forme di osteomielite: la terapia antibiotica basata sull'antibiogramma classico, che saggia la sensibilità dei batteri in forma planctonica, non è efficace o lo è solo in parte se nell'infezione è coinvolto il glicocalice (Tarantino et al., 1993¹). È quindi essenziale, una volta dimostrata la presenza del biofilm, saggiare la sensibilità agli antibiotici riproducendo in vitro le condizioni di crescita in forma sessile del patogeno coinvolto, monitorizzando inoltre l'efficacia della terapia attraverso campionamenti microbiologici frequenti (Mastidoro et al., 1990).

Un'ulteriore soluzione terapeutica può essere ricercata nell'impiego di sostanze capaci di prevenire e/o rimuovere il glicocalice in modo da incrementare l'azione dell'antibiotico specifico (Monteleone et al., 1993). In questa prospettiva è stato effettuato uno studio allo scopo di valutare in vitro gli effetti di alcune proteasi sulla formazione del biofilm batterico e sulla suscettibilità del biofilm agli antibiotici (Selan et al., 1993). Sono state prese in esame le alterazioni della sensibilità agli antibiotici di ceppi batterici isolati da infezioni di impianti ortopedici e coltivati in condizioni sia planctoniche che sessili in presenza o in assenza di alcuni enzimi proteolitici (clostridiopeptidasi A, fibrinolisinasi, streptochinasi e serratiopeptidasi). Da questa indagine è risultato che alcuni enzimi, ed in particolare la serratiopeptidasi, presentano una certa attività nell'aumentare la sensibilità dei batteri in forma sessile agli antibiotici. La serratiopeptidasi è una metalloproteasi contenente zinco che mostra un'intensa attività proteolitica e viene

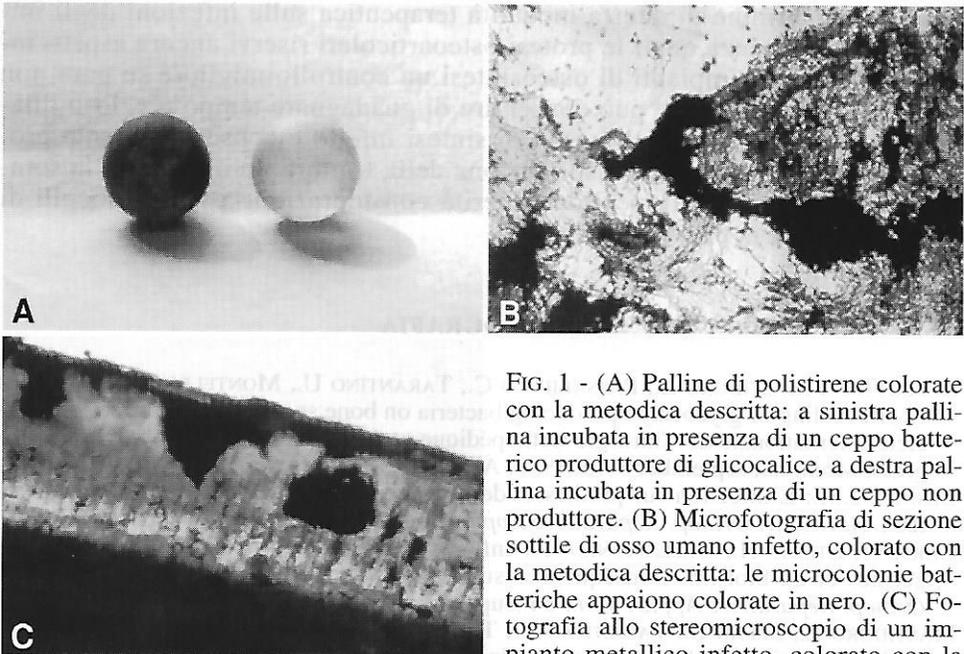


FIG. 1 - (A) Palline di polistirene colorate con la metodica descritta: a sinistra pallina incubata in presenza di un ceppo batterico produttore di glicocalice, a destra pallina incubata in presenza di un ceppo non produttore. (B) Microfotografia di sezione sottile di osso umano infetto, colorato con la metodica descritta: le microcolonie batteriche appaiono colorate in nero. (C) Fotografia allo stereomicroscopio di un impianto metallico infetto, colorato con la

metodica descritta: è evidente la presenza di microcolonie colorate in nero su ampie zone della superficie.



FIG. 2 - Microfotografia al microscopio elettronico a scansione di un biofilm batterico adesivo sulla superficie di un impianto metallico infetto.

comunemente impiegata nella terapia antinfiammatoria. Le osservazioni cliniche nelle osteomieliti in presenza o meno di impianti sembrano confermare una maggiore efficacia degli schemi terapeutici che prevedono l'associazione antibiotico-serratiopeptidasi rispetto alla somministrazione del solo antibiotico (Tarantino et al., 1993²), analogamente a quanto segnalato nella profilassi e nel trattamento delle infezioni nell'implantologia orale (Puttini et al., 1994). Valutando l'andamento dei parametri clinici, si nota che le manifestazioni correlate in larga parte alla presenza di forme planc toniche libere (temperatura corporea, VES, numero dei leucociti nel sangue venoso, flogosi dei tessuti molli e presenza di fistole) vengono ridotte da entrambi i regimi terapeutici, mentre la maggiore efficacia dell'associazione antibiotico-serratiopeptidasi emerge in rapporto all'evoluzione del quadro radiologico ed all'insorgenza di recidive a distanza. Per quanto l'efficacia a lungo termine di questa modalità terapeutica sulle infezioni degli impianti a permanenza quali le protesi osteoarticolari riserbi ancora aspetti interlocutori, negli impianti di osteosintesi un controllo migliore se pure non definitivo dell'infezione può consentire di guadagnare tempo prezioso dilazionando la rimozione del mezzo di sintesi infetto e consensualmente promuovendo il processo di consolidazione della frattura. In ogni caso, la somministrazione di serratiopeptidasi merita considerazione per i protocolli di antibioticotera pia preventiva.

BIBLIOGRAFIA

- BERLUTTI F., MASTIDORO L., PASSARIELLO C., TARANTINO U., MONTELEONE M., RENZINI G.: Revealing of glycocalyx producing bacteria on bone sections with a new stain. Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie, 18th World Congress, Montreal, september 8-15, 1990. Abstracts, 465.
- BESNIER J.M.: L'infection sur prothèse: de l'adhérence au biofilm. Aspects fondamentaux. *Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appar. Mot.*, **84** (suppl. I), 67, 1998.
- CARSENTI-ETESSE H., DELLAMONICA P.: Infections sur prothèse: rôle de l'adhésion des germes et du biofilm. Conséquences sur le traitement et la prévention. *Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appar. Mot.*, **84** (suppl. I), 67-68, 1998.
- MASTIDORO L., SELAN L., TARANTINO U., THALLER M.C., MONTELEONE M., RENZINI G.: Earlier detection of glycocalyx producing bacteria for an improved therapeutic protocol. Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie, 18th World Congress, Montreal, september 8-15, 1990. Abstracts, 465.

- MONTELEONE M., TARANTINO U.: Trattamento terapeutico delle infezioni ortopediche sostenute da batteri produttori di glicocalice. 18° Congresso Nazionale della Società Italiana di Chemioterapia, Baveno, 9-12 maggio 1993. Abstracts, 120-122.
- PERRY C.R.: Bone and joint infections. Martin Dunitz, London, 1996.
- PUTTINI M., PASSARIELLO C., DOLCI M., DE LUCA M., RENZINI G.: Proteolytic enzymes in a new prophylactic protocol for periimplantitis. 1st World Congress of Osseointegration, Venice, september 29 - october 2, 1994. Proceedings, 277-281.
- SELAN L., BERLUTTI F., PASSARIELLO C., COMODI-BALLANTI M.R., THALLER M.C.: Proteolytic enzymes: a new treatment strategy for prosthetic infections? *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 2618-2621, 1993.
- TARANTINO U., GASBARRA E., MONTELEONE G., PISTILLO P.: Trattamento delle infezioni ortopediche sostenute da batteri produttori di glicocalice. *G. Ital. Chemioter.*, **2**, 193-198, 1993¹.
- TARANTINO U., MONTELEONE G., TUCCIARONE A., PASSARIELLO C., SELAN L.: Bacterial biofilms in bone centred infections: new biological and therapeutical approach. Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie, 19th World Congress, Seoul, august 28 - september 3, 1993². Abstracts, 377.
- THALLER M.C., BERLUTTI F., SELAN L., SCAZZOCCHIO F., TARANTINO U.: Esopolimeric substances influence on "in vitro" susceptibility of strains from osteomyelitis cases, and "in vivo" therapeutic outcomes. 6th Mediterranean Congress of Chemotherapy, Taormina, may 22-27, 1988. Abstracts, 164.