

Volume II – Numero 1 – Marzo 2008

# Argomenti di ACTA Otorhinolaryngologica Italica

*Official Journal of the Italian Society of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*  
Organo Ufficiale della Società Italiana di Otorinolaringologia e Chirurgia Cervico-Facciale

#### **Editorial Board**

*Editor-in-Chief:* F. Chiesa

*President of S.I.O.:* S. Conticello

*Former Presidents of S.I.O.:*

G. Borasi, E. Pirodda,

I. De Vincentiis, D. Felisati, L. Coppo,

G. Zaoli, P. Miani, G. Motta,

L. Marcucci, A. Ottaviani, G. Perfumo,

P. Puxeddu, I. Serafini, M. Maurizi,

G. Sperati, D. Passali, E. de Campora,

A. Sartoris, P. Laudadio, E. Mora,

M. De Benedetto

*Former Editors-in-Chief:*

C. Calero (†), E. de Campora,

A. Staffieri, M. Piemonte

#### **Editorial Staff**

*Editor-in-Chief:* F. Chiesa

*Deputy Editor:* C. Vicini

*Associate Editors:*

C. Viti, F. Scasso

*Editorial Coordinators:*

M.G. Rugu, L. Calabrese

*Editorial Assistant:*

M. Shields

#### **Italian Scientific Board**

L. Bellussi, A. Camaioni, D. Casolino,

G. Cortesina, F. Lunghi, F. Galletti,

G. Motta, G. Villari

#### **International Scientific Board**

J. Betka, P. Clement, A. De La Cruz,

M. Halmagyi, L.P. Kowalski,

M. Pais Clemente, J. Shah,

H. Stammberger

#### **Treasurer**

C. Miani

#### **Editorial Office**

*Editor-in-Chief:* F. Chiesa

Divisione di Chirurgia Cervico-Facciale

Istituto Europeo di Oncologia

Via Ripamonti, 435

20141 Milano, Italy

Tel. +39 02 57489490

Fax +39 02 57489491

actaitalica@ieo.it

*Editorial Coordinator*

M.G. Rugu

maryolyna@libero.it

#### **© Copyright 2008 by**

Società Italiana di Otorinolaringologia e

Chirurgia Cervico-Facciale

Via Luigi Pigorini, 6/3

00162 Roma, Italy

#### **Publisher**

Pacini Editore SpA

Via Gherardesca, 1

56121 Ospedaletto (Pisa), Italy

Tel. +39 050 313011

Fax +39 050 313000

Info@pacinieditore.it

www.pacinimedica.it

*Cited in Index Medicus/MEDLINE*



## Informazioni per gli Autori comprese le norme per la preparazione dei manoscritti

*Acta Otorhinolaringologica Italica* continua gli *Annali di Laringologia Otolologia e Farinologia* fondati nel 1901 da Giulio Masini e già Organo Ufficiale di stampa degli Otolologi Italiani (A.O.O.I.) e dal 1976 della Società Italiana di Otorinolaringologia e Chirurgia Cervico-Facciale (S.I.O. Ch. C.-F.).

La rivista pubblica in inglese lavori originali di interesse otorinolaringologico, gli atti ufficiali della Società, editoriali, note di attualità, recensioni, rubriche redazionali, notizie sindacali.

I contributi devono essere inediti, non sottoposti contemporaneamente ad altra rivista, ed il loro contenuto conforme alla legislazione vigente in materia di etica della ricerca.

In caso di sperimentazioni su umani, gli Autori devono attestare che tali sperimentazioni sono state svolte secondo i principi riportati nella Dichiarazione di Helsinki (1983); gli Autori sono gli unici responsabili delle affermazioni contenute nell'articolo e sono tenuti a dichiarare di aver ottenuto il consenso informato dei pazienti o genitori nel caso di casi pediatrici per la sperimentazione e per l'eventuale riproduzione di immagini. Per studi su cavie animali, gli Autori sono invitati a dichiarare che sono state rispettate le relative leggi nazionali e le linee guida istituzionali.

I lavori che provengono da Istituti scientifici, di ricerca o da Divisioni ospedaliere devono recare la firma autografa del Direttore dell'Istituto o Reparto di provenienza. Gli articoli pubblicati impegnano unicamente la responsabilità degli Autori. La proprietà letteraria degli articoli è riservata alla Rivista.

I lavori vengono pubblicati in lingua inglese con abstract in italiano ed in inglese.

I lavori vengono pubblicati gratuitamente. Gli Autori hanno diritto a 30 estratti gratuiti del lavoro.

**Conflitto di interessi.** Gli Autori devono dichiarare se hanno ricevuto finanziamenti o se hanno in atto contratti o altre forme di finanziamento, personali o istituzionali, con Aziende i cui prodotti sono citati nel testo. Questa dichiarazione verrà trattata dal Direttore come una informazione riservata e non verrà inoltrata ai revisori. I lavori accettati verranno pubblicati con l'accompagnamento di una dichiarazione *ad hoc*, allo scopo di rendere nota la fonte e la natura del finanziamento.

### Norme generali per gli Autori

**Testo.** I lavori devono essere inviati in lingua inglese. Il manoscritto sarà sottoposto a revisione della lingua inglese a cura e a carico della Redazione della Rivista. La Redazione si riserva il diritto di non accettare eventuali lavori formulati in lingua inglese non corretta. Eventuali lavori pervenuti in lingua italiana, qualora di riconosciuto valore scientifico e di particolare interesse per la Rivista, potranno essere comunque pubblicati, previa traduzione in inglese a totale carico degli Autori.

Il lavoro deve pervenire alla Redazione in quattro copie (gli Autori sono comunque pregati di conservare copia del materiale inviato), dattiloscritto, con ampio margine, massimo 25 righe per pagina, con interlinea doppia, con numerazione delle pagine a partire dalla prima, e corredato di:

- 1) titolo del lavoro (in italiano ed inglese);
- 2) riassunto (in italiano ed inglese);
- 3) parole chiave (in italiano ed inglese; massimo 5);
- 4) titolo e didascalie di eventuali tabelle e delle figure.

I lavori non devono superare le 10 pagine di stampa della rivista, compresi bibliografia, figure e tabelle (750 parole a pagina di stampa; per ogni figura o tabella di 1/4 di pagina considerare circa 250 parole in meno; per ogni figura o tabella di mezza pagina considerare circa 500 parole in meno). Può essere oggetto di pubblicazione la descrizione di una o più osservazioni cliniche di una medesima patologia di rilevante interesse diagnostico e terapeutico. La stesura di tali "note cliniche" non deve superare le 4 pagine di stampa, compresi clichés e tabelle. Lo schema da seguire per la stesura deve prevedere: descrizione dell/i caso/i clinico/i osservati con le notizie anamnestiche principali, l'esame obiettivo, gli esami strumentali e di laboratorio più significativi e le considerazioni conclusive con i necessari riferimenti bibliografici.

*I lavori di maggiore estensione potranno essere pubblicati come supplementi e l'intero costo di stampa sarà a carico degli Autori.*

Una *pagina fuori testo* deve indicare il nome e l'indirizzo (incluso numero di telefono, fax ed indirizzo e-mail) dell'Autore cui vanno indirizzate la corrispondenza relativa al lavoro e le bozze di stampa. In assenza di tale indicazione le bozze verranno inviate al 1° Autore.

*Non si accettano articoli che non siano accompagnati dal relativo dischetto su cui è registrata l'ultima versione corretta del testo, corrispondente alla copia dattiloscritta. Il testo deve essere scritto con programmi Word per Dos o Macintosh: i dischetti devono riportare sull'apposita etichetta il nome del primo Autore, il titolo abbreviato dell'articolo, il tipo di sistema operativo (Dos o Macintosh), il programma di scrittura e la versione, il nome dell'i file/s dell'i documento/i.*

*Agli Autori è riservata la correzione ed il rinvio (entro e non oltre 4 gg. dal ricevimento) delle sole prime bozze del lavoro.*

Nella *prima pagina* devono comparire:

- 1) Titolo del lavoro in inglese ed in italiano; i titoli devono essere concisi, chiari e informativi. Eventuali sottotitoli devono essere necessari a compendiare il concetto predominante del lavoro.
- 2) Nomi e cognomi degli Autori (il nome precede ed è ridotto all'iniziale seguita dal punto); se gli Autori appartengono a più Istituti, il 1° Autore e gli eventuali co-Autori dello stesso Istituto saranno indicati con un asterisco, gli Autori di un altro Istituto con due asterischi, e così via.
- 3) Nome e la sede dell'Istituto o degli Istituti in cui il lavoro è stato effettuato; titolo, nome (per intero), cognome e indirizzo dell'Autore (comprensivi di recapito telefonico, fax e indirizzo e-mail) cui vanno indirizzate le richieste di estratti (Corrispondenza: ...).
- 4) Parole chiave (Key words) in inglese ed in italiano.

La *seconda pagina* deve contenere il Riassunto in inglese ed in italiano che deve consistere in una esauriente sintesi esplicitiva di 300/400 parole. Esso deve includere l'impostazione del problema, i metodi di studio, i risultati ed il significato della ricerca.

**Tabelle.** (4 copie), devono essere contenute nel numero (evitando di presentare lo stesso dato in più forme), dattiloscritte una per pagina e numerate progressivamente con numerazione romana. Nel testo della tabella e nella legenda utilizzare, nell'ordine di seguito riportato, i seguenti simboli: \*, †, ‡, §, ¶, \*\*, ††, ‡‡, ...

**Figure.** (4 copie), vanno riprodotte in foto. I grafici ed i disegni possono essere in fotocopia, purché di buona qualità. Le figure devono essere numerate e devono riportare sul retro, su un'apposita etichetta, il nome dell'Autore, il titolo dell'articolo, il verso (alto).

**Bibliografia.** Va limitata alle voci essenziali identificate nel testo con numeri arabi tra parentesi ed elencate al termine del dattiloscritto nell'ordine in cui sono state citate.

Dovrà riportare:

cognome ed iniziale del nome degli Autori (devono essere riportati i primi sei, eventualmente seguiti da et al.), titolo dell'articolo in lingua originale, titolo della rivista secondo l'abbreviazione dell'*Index Medicus*, anno di pubblicazione, volume, prima ed ultima pagina.

Esempi di corretta citazione bibliografica per:

### Articoli e Riviste

Chiesa A, Maroldi R, Perugini S, Salvolini U. *Il ruolo della tomografia assiale computerizzata nella patologia rinosinusale*. Acta Otorhinolaryngol Ital 1981;1:173-94.

### Libri

Smith DW. *Recognizable patterns of human malformation*. Third Edition. Philadelphia: WB Saunders Co.; 1982.

### Capitoli di Libri o Atti di Congressi

Krmpotic-Nemanic J, Kostovis I, Rudan P. *Aging changes of the form and infrastructure of the external nose and its importance in rhinoplasty*. In: Conly J, Dickinson JT, editors. *Plastic and reconstructive surgery of the face and neck*. New York, NY: Grune and Stratton; 1972. p. 84.

**Ringraziamenti**, indicazioni di grants o borse di studio, devono essere citati prima della bibliografia.

Le note, contraddistinte da asterischi o simboli equivalenti, compariranno nel testo, a piè di pagina.

Termini matematici, formule, abbreviazioni, unità e misure devono conformarsi agli standards riportati in *Science* 1954;120:1078.

I farmaci vanno indicati col nome chimico. Solo se inevitabile potranno essere citati col nome commerciale (scrivendo in maiuscolo la lettera iniziale del prodotto, seguita dalla casa farmaceutica, città e nazione).

Gli scritti (ed il relativo dischetto) di cui si fa richiesta di pubblicazione vanno indirizzati, unitamente alla lettera di cessione del copyright nel caso il lavoro venga pubblicato, a:

*Direzione della Rivista Acta Otorhinolaryngologica Italica*  
S.O.C. ORL Azienda Ospedaliera "Santa Maria della Misericordia"  
P.le Santa Maria della Misericordia, 15 - 33100 Udine

Ogni pubblicazione scientifica porterà la data di ricevimento e quella di accettazione da parte del Comitato Scientifico. I dattiloscritti e le illustrazioni dei lavori non si restituiscono e dopo un anno vengono distrutti.

*Le tabelle, le fotolite e gli estratti (al di sopra dei 30 gratuiti) sono addebitati agli Autori a prezzo di costo. Assegni e vaglia vanno inviati a:*

**Acta Otorhinolaryngologica Italica**  
Pacini Editore SpA  
via Gherardesca 1 - 56121 Ospedaletto (Pisa)

### Abbonamenti

La Rivista *Acta Otorhinolaryngologica Italica* è bimestrale e viene inviata gratuitamente a tutti i Soci in regola con la quota annuale. I prezzi dell'abbonamento per l'anno 2008 per i non Soci sono i seguenti:

Italia: € 81; estero: € 91. Singolo fascicolo: € 21.  
Numeri e annate arretrate: € 31 (se disponibili).

*Per le inserzioni pubblicitarie e le richieste di abbonamento rivolgersi a:*

**Acta Otorhinolaryngologica Italica**  
Pacini Editore SpA  
via Gherardesca 1 - 56121 Ospedaletto (Pisa), Italy  
Tel. +39 050 313 011 - Fax +39 050 313 0300  
E-mail: Info@pacinieditore.it  
Internet: www.pacini medicina.it

*Per gli arretrati rivolgersi a:*

Società Italiana di Otorinolaringologia e Chirurgia Cervico-Facciale  
Via L. Pigorini, 6 - 00162 Roma  
Tel. 06 44291164 - Fax 06 44235157

Finito di stampare presso le Industrie Grafiche della Pacini Editore SpA, Pisa - Marzo 2008

## Norme per l'invio del materiale in formato elettronico

Gli Autori sono invitati ad inviare i manoscritti secondo le seguenti norme:

### Modalità di invio

- CD-ROM o DVD (evitare di utilizzare Dischetti da 3 1/2")
- È anche possibile utilizzare pen-drives USB o dischi esterni USB-Firewire
- Posta elettronica (concordare con il personale Pacini le modalità)
- FTP (concordare con il personale Pacini le modalità)

### Testo

- **Software:** preferibilmente Microsoft Word, salvando i file in formato .RTF. Possono essere utilizzati anche altri programmi, anche open source, avendo accortezza di salvare sempre i file in formato .RTF.

Non utilizzare in nessun caso programmi di impaginazione grafica quali Publisher, Page-

maker, Quark X-press, Indesign. Non formattare il testo in alcun modo (evitare stili, bordi, ombreggiature ...); utilizzare solo gli stili di carattere come corsivo, grassetto, sottolineato. Non inviare il testo in formato .PDF.

- **Nome dell'i file/s:** il testo e le singole tabelle devono essere salvati in files separati.

### Illustrazioni

Inviare le immagini in files separati dal testo e dalle tabelle.

- **Software e formato:** inviare immagini preferibilmente in formato TIFF o EPS, con risoluzione minima di 300 dpi e formato di 100 x 150 mm. Altri formati possibili: JPEG, PDF. Evitare nei limiti del possibile .PPT (file di Powerpoint) e .DOC (immagini inseriti in file di .DOC).

- **Nome dell'i file/s:** inserire un'estensione che identifichi il formato del file (esempio: .tif, .eps).

# I BIOFILM BATTERICI NELLA PATOLOGIA CRONICA DI COMPETENZA ORL

## Indice

I biofilm batterici.....	pag.	1
La formazione e la maturazione dei biofilm .....	»	1
La resistenza batterica nei biofilm .....	»	2
I biofilm nell'ambiente .....	»	3
L'impianto di biofilm sulle mucose umane .....	»	3
I biofilm nella patologia ORL .....	»	4
Otite media .....	»	4
Rinosinusite cronica .....	»	5
Adenoiditi .....	»	5
Tonsilliti .....	»	5
Il trattamento delle patologie ORL da biofilm .....	»	5
Blocco dell'adesione batterica alle mucose .....	»	6
Prevenzione della crescita microbica .....	»	6
Interferenza con i sistemi di comunicazione intercellulari .....	»	6
Disgregazione delle matrici polisaccaridiche .....	»	6
Approccio probiotico .....	»	6
Modificazione dei materiali e delle modalità di rilascio dell'antibatterico .....	»	7
Conclusioni .....	»	7
Bibliografia .....	»	8



# I biofilm batterici nella patologia cronica di competenza ORL

L.M. Bellussi<sup>1</sup>, M. De Benedetto<sup>2</sup>, M. Lauriello<sup>3</sup>, D. Passali<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Clinica ORL Università di Siena; <sup>2</sup> UOC di ORL, Ospedale "V. Fazzi", Lecce; <sup>3</sup> Dipartimento di Medicina Sperimentale Università de L'Aquila

PAROLE CHIAVE: *Biofilm batterici • Resistenza agli antibiotici • Infezioni delle vie aeree superiori • Chinoloni*

KEY WORDS: Bacterial biofilm • Antibiotic resistance • URTI • Quinolones

## I biofilm batterici

Il termine "biofilm" è un neologismo, corrispondente ad un fenomeno che si riferisce alle strategie selezionate dai microrganismi allo scopo di incrementare le possibilità di sopravvivenza nell'ambiente e all'interno dell'organismo umano<sup>1</sup>.

Per comprendere il significato di tale termine è opportuno riprendere le "classiche" conoscenze microbiologiche, che descrivono i batteri quali microrganismi isolati fluttuanti (forme planctoniche) in ambienti fluidi, così come ogni studente di Medicina le ha osservate sui test di microbiologia o direttamente al microscopio fin dalle prime esercitazioni di laboratorio. Si tratta però di una semplificazione didattica ottenuta in condizioni artificiali, che non rende la realtà dei fatti<sup>2</sup>. I fatti sembrano condurre ad una interpretazione affatto diversa: i microrganismi tendono a non rimanere isolati, ma ad aggregarsi in colonie, confermando quella tendenza alla "socializzazione", che appare propria della materia vivente fin dalle forme più elementari, con rarissime eccezioni. Se tale "comportamento" adattivo ha avuto un così grande successo è segno evidente che comporta indubbi vantaggi. Proprio l'analisi di tali aspetti favorevoli ha consentito di evidenziare inaspettate strategie difensive, che i batteri patogeni utilizzano per neutralizzare le terapie farmacologiche e per aggirare le difese dell'ospite.

In realtà, come spesso accade, qualcuno si era già accorto in passato della modalità di sviluppo dei batteri in aggregati: nel XVII secolo Van Leeuwenhoek era arrivato a questa conclusione osservando al microscopio ottico le proprie placche dentarie<sup>3</sup>. Il fenomeno, rimasto a lungo "in letargo", è stato ripescato negli anni Settanta nel tentativo di comprendere le motivazioni della difficoltà di gestione e disinfezione delle condutture idriche in ambito industriale<sup>4</sup>. A quel punto i tempi erano maturi per l'estensione del concetto anche ad alcuni aspetti della patologia infettiva nell'uomo<sup>5</sup>.

Analizziamo il termine prescelto, che ci introduce correttamente ed efficacemente alla comprensione del fenomeno. Il termine di biofilm non riconosce al momento validi sinonimi poiché l'alternativa ipotizzabile di "aggregati batterici" non esprime compiutamente la natura di tali "micro-colonie". Il biofilm non è infatti un semplice aggregato nel quale la prossimità tra i germi rende più difficile la loro neutralizzazione. L'analisi alla microscopia elettronica a scansione e confocale e lo studio delle dinamiche interne, lasciano l'inquietante sensazione che il

biofilm rappresenti una forma di livello diverso, seppure estremamente primordiale, di organizzazione tridimensionale di elementi unicellulari<sup>6</sup>, nella quale la capacità di sopravvivenza risultante non corrisponde alla somma delle proprietà dei singoli elementi. Il fenomeno non è di recente comparsa e va considerato parte integrante del ciclo della vita procariotica<sup>7</sup>.

## La formazione e la maturazione dei biofilm

Dobbiamo ora chiederci che cosa induce i microrganismi a formare biofilm ovvero quali sono le condizioni necessarie perché i batteri riescano a raggiungere questa forma di organizzazione di livello superiore. Indipendentemente dalle peculiarità dei diversi biofilm, le caratteristiche non varianti sono la necessità di una superficie alla quale aderire e la produzione di una sostanza definita "matrice polimerica extracellulare", che tiene insieme i singoli elementi<sup>8</sup>.

Variabili sono invece l'aspetto macroscopico e le sostanze ambientali incluse nella matrice (es. componenti di sangue, cristalli minerali, particelle di fango).

Le analogie con semplici organismi pluricellulari si rafforzano qualora si ripercorra la "storia naturale" del singolo biofilm<sup>2</sup>. Il susseguirsi di 5 stadi rappresenta il percorso di maturazione:

1. la prima fase comporta il rallentamento della velocità di movimento e l'adesione ad una superficie organica (es. membrana mucosa, sangue, secrezioni, saliva, urine) o inorganica possibilmente rugosa<sup>9</sup>; l'adesione è favorita dalla idrofobicità della superficie<sup>10</sup> e dalla produzione di adesine; il tasso di adesione dipende dalla velocità di flusso del liquido che lambisce la superficie;
2. nella seconda fase si verifica lo spostamento dei batteri lungo la superficie fino ad incontrare altri batteri adesi; l'ancoraggio dei batteri alla superficie di colonizzazione avvia una cascata di reazioni, che attivano i geni, altrimenti repressi, responsabili del fenotipo "biofilm"; in questa fase l'adesione è ancora reversibile in quanto mediata da fenomeni di attrazione elettrostatica<sup>11</sup>;
3. il fenomeno centrale della terza fase è l'adesione intercellulare stabile di natura biochimica (proteine batteriche di superficie), alla quale segue la produzione della matrice extracellulare, promossa dalla adesione stessa; i batteri comunicano tra di loro tramite sostanze

- biochimiche (lattoni acetilati dell'omoserina), definite *quorum sensing*<sup>12</sup>: si tratta di molecole piccole, altamente diffusibili, capaci di regolare, tra l'altro, la densità della popolazione batterica del biofilm e di conseguenza il comportamento reciproco degli elementi;
4. la quarta fase consiste nell'accrescimento del biofilm; tale processo definito maturazione coinvolge tutti i componenti del biofilm ovvero tanto gli elementi cellulari quanto la sostanza esopolisaccaridica<sup>13</sup>; gli elementi cellulari si riproducono in modo da formare "torri" batteriche immerse nella matrice e collegate da canali;
  5. nella quinta fase si osserva il rilascio di batteri in forma planctonica o di piccoli "emboli batterici" nell'ambiente.

Particolare importanza nel processo di maturazione rivestono le modalità di comunicazione all'interno del biofilm. Le molecole *quorum sensing* vengono secrete dai microrganismi in relazione alla densità della popolazione: maggiore è la densità, più elevata risulta la concentrazione di *quorum sensing*, che a loro volta promuovono l'espressione di geni di virulenza<sup>14</sup>.

Dal momento che i biofilm possono essere formati da una sola o da diverse specie microbiche anche dotate di velocità di crescita differenti<sup>15</sup>, sono state indagate le modalità di comunicazione tra specie diverse. Si ipotizza il coinvolgimento oltre che di omoserino-lattoni anche di metaboliti batterici, prodotti proteici, materiale genetico (DNA, RNA)<sup>6</sup>. In esperimenti di laboratorio sono state evidenziate comunicazioni finalizzate all'eliminazione di alcune specie all'interno del biofilm<sup>16</sup>. Generalmente le comunicazioni intercellulari nel biofilm hanno lo scopo di favorire l'organizzazione dei singoli elementi al fine di aumentarne le probabilità di sopravvivenza.

La matrice polimerica extracellulare, detta *slime*, può arrivare a rappresentare il 90% del biofilm<sup>17</sup> ed è composta prevalentemente da polisaccaridi e proteine con la presenza di acidi nucleici. L'analisi dello *slime*<sup>18</sup> fornisce almeno tante informazioni quante se ne possono ricavare dalla componente cellulare ovvero lo *slime*:

- incorpora grandi quantità di acqua in virtù dei legami di idrogeno;
- varia in relazione alle specie che lo hanno prodotto e differisce tra i batteri Gram-positivi e Gram-negativi; nei primi prevalgono i polisaccaridi cationici, mentre negli altri i polisaccaridi sono per lo più neutri o polianionici<sup>19</sup>;
- la conformazione primaria dipende dalla composizione e dalla struttura dei polisaccaridi<sup>19</sup>;
- presenta caratteristiche variabili da un punto all'altro all'interno del biofilm;
- aumenta con il processo di maturazione del biofilm;
- può contenere sostanze diverse in base alle caratteristiche del mezzo nutritivo.

Lo *slime* non si limita a mantenere unite le cellule batteriche, ma si organizza in una architettura sorprendente costituita da una rete di canali, che consentono la distribuzione delle sostanze nutritive e la rimozione dei prodotti di scarto<sup>2</sup>, configurandosi come un primitivo sistema circolatorio. Dal momento che la disponibilità di nutrienti si riduce inevitabilmente al crescere della distanza da ciascun canale, i batteri si adattano da un punto di vista metabolico a seconda della loro collocazione all'interno del biofilm,

tenendo anche conto del gradiente di ossigeno registrabile tra gli strati superficiali e la componente più profonda<sup>20</sup>. D'altra parte se al biofilm concorrono specie batteriche diverse, ciascuna ricerca la posizione più consona alle proprie esigenze e capacità di sopravvivenza, che contemplan anche una eventuale fase di quiescenza nella quale la disponibilità di ossigeno e nutrienti è notevolmente ridotta<sup>6</sup>.

Globalmente considerato, il biofilm sembra rappresentare un livello evolutivo superiore rispetto a quello proprio della/e specie che lo costituiscono, che non si limitano ad una vantaggiosa simbiosi mutualistica, ma raggiungono una organizzazione sovra-cellulare capace di automantenersi e in certo qual modo di riprodursi. Infatti il fenomeno del rilascio di batteri dal biofilm non si traduce nel dissolvimento della struttura portante con dispersione degli elementi cellulari, ma consiste nel distacco di batteri singoli o in piccoli aggregati<sup>21</sup>, favorito dalla secrezione di enzimi in grado di modificare il substrato o degradare l'alginato<sup>22</sup> in alcuni punti periferici, senza peraltro compromettere la persistenza della microcolonia. Può risultare utile sintetizzare i possibili meccanismi responsabili del rilascio di batteri<sup>23 24</sup>:

- erosione = rimozione continua di piccole parti di biofilm;
- distacco = rimozione rapida e massiva;
- abrasione = distacco dovuto alla collisione di particelle di fluido ad alta velocità con la superficie del biofilm.

I batteri liberati si comportano come forme planctoniche in grado di provocare riacutizzazioni cliniche ovvero capaci di aderire ad altre parti della stessa superficie o ad altre superfici per dare origine a nuovi biofilm<sup>25</sup>.

## La resistenza batterica nei biofilm

Strategie molteplici sono state implementate per la difesa degli organismi più evoluti dall'aggressione delle diverse specie batteriche. Le varie strategie possono essere ricondotte a tre modalità fondamentali<sup>2</sup>:

1. difese dell'ospite, immunologiche (innate e acquisite) e non immunologiche;
2. terapie antibiotiche;
3. sostanze antibatteriche "disinfettanti" da applicare nell'ambiente e sugli oggetti.

A differenza delle forme planctoniche, sensibili ai suddetti fattori, i batteri costituenti i biofilm risultano per lo più refrattari e finiscono con il costituire una riserva inattaccabile e perpetua di germi patogeni, responsabili di forme recidivanti. Infatti il trattamento antibiotico nella migliore delle ipotesi riesce a distruggere i batteri più periferici, che si trovano in fase di attività metabolica, mentre le cellule indovate nella profondità risultano refrattarie in virtù della condizione di quiescenza vegetativa in cui si trovano<sup>26</sup>.

Per quanto riguarda le *difese dell'ospite* la matrice di alginato rende i batteri resistenti tanto ai meccanismi aspecifici, come la fagocitosi<sup>27</sup>, che alle modalità specifiche, come la neutralizzazione da parte di anticorpi circolanti<sup>28</sup>. D'altra parte la struttura biochimica dell'alginato per la sua natura polisaccaridica stimola di per sé le difese dell'ospite, che produce anticorpi anti-alginato: se da un lato tali anticorpi tentano invano di distruggere i biofilm, d'altra parte va loro riconosciuto un ruolo nella fase diagnostica in quanto l'elevazione del titolo anticorpale è pa-

tognomonico della patologia da biofilm e proporzionato alla severità della stessa <sup>29</sup>. Se i biofilm sono numerosi e di conseguenza la matrice di alginato è particolarmente abbondante è comune rilevare la formazione di immunocomplessi circolanti, la cui deposizione provoca danni tissutali di natura infiammatoria.

La *resistenza alla terapia antibiotica* da parte dei biofilm aumenta significativamente rispetto alle corrispondenti forme planctoniche <sup>26</sup> e può essere ricondotta a tre modalità fondamentali:

1. resistenza meccanica;
2. resistenza metabolica;
3. resistenza genetica.

La matrice del biofilm costituisce una sorta di “pellicola protettiva”, che impedisce, o comunque rallenta, la penetrazione dell’antibiotico all’interno della micro-colonia <sup>30 31</sup>, lasciandolo esposto ai fattori di inattivazione batterica come le beta-lattamasi.

Per comprendere il concetto di resistenza metabolica dobbiamo fare riferimento all’organizzazione delle cellule all’interno del biofilm: la distribuzione di ossigeno e nutrienti agli elementi cellulari avviene attraverso una fitta rete di canali, che costituiscono una sorta di “vascolarizzazione”. I batteri più vicini ai canali ricevono ossigeno e nutrienti a sufficienza per replicarsi, mentre i microrganismi presenti nelle aree centrali più distanti dai canali di approvvigionamento hanno minori possibilità e riducono, fino al blocco completo, la attività di replicazione, mantenendosi in uno stato quiescente <sup>32</sup>. Da questa sorta di “Limbo” possono riattivarsi qualora si verificano mutamenti nell’organizzazione del biofilm, che li pongano in condizioni più favorevoli alle loro esigenze metaboliche. I microrganismi, che si trovano nello stato quiescente, risultano resistenti a tutti gli antibiotici, che agiscono attaccando i batteri nei loro processi metabolici.

La resistenza genetica dipende dalle modificazioni fenotipiche promosse dai fenomeni di adesione delle cellule batteriche, prima ad una superficie e successivamente ad altri microrganismi <sup>33</sup>: vengono così espressi pattern genetici specifici responsabili di morfologia e attività metaboliche diverse dalle forme planctoniche e altamente protettive nei confronti degli antibiotici.

Per quanto concerne la resistenza ai biocidi applicati all’ambiente esterno o agli oggetti sono disponibili i seguenti dati, dei quali occorre tenere debito conto:

- la resistenza ai metalli pesanti risulta notevolmente superiore nei biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) rispetto alle corrispondenti forme planctoniche <sup>34</sup>;
- la dose di ipoclorito di sodio, che esercita un efficace effetto antibatterico è 600 volte superiore nel caso di biofilm di *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) rispetto alle forme planctoniche <sup>35</sup>.

D’altra parte i biofilm costituiscono un ambiente particolarmente favorevole al trasferimento orizzontale di DNA, fenomeno che incrementa la probabilità di mutazioni adattive, tra cui la resistenza antibatterica <sup>26</sup>.

## I biofilm nell’ambiente

I biofilm batterici sono di fatto presenti su qualunque superficie umida o immersa in acqua: questo fenomeno è ben noto

ai tecnici che si occupano della manutenzione di impianti di raffreddamento, condutture di acqua potabile, carene della navi, ma anche di monumenti ed edifici storici.

I fenomeni imputabili alla presenza di “pellicole” microbiche possono essere sintetizzati in <sup>2</sup>:

- corrosione della superficie;
- rilascio nell’ambiente di elementi e prodotti di degradazione delle superfici;
- riserva di germi potenzialmente patogeni per l’uomo;
- protezione dei batteri dai disinfettanti;
- alterazione delle caratteristiche meccaniche e/o estetiche delle superfici.

Una condizione specifica di contaminazione può essere considerata la formazione di biofilm su dispositivi e protesi biomedicali. Non c’è protesi o apparecchiatura, che possa essere considerata immune dalla possibilità di tale tipo di impianto microbiologico <sup>36</sup>: biofilm sono stati isolati su cateteri (es. urinari o venosi centrali), protesi (es. valvolari cardiache, ortopediche) e su qualunque dispositivo utilizzato nella patologia umana, ivi compresi gli impianti di irrigazione delle apparecchiature odontoiatriche.

Per quanto concerne la patologia di competenza ORL, i biofilm sono stati individuati in corrispondenza di protesi vocali, tubi endotracheali e tubicini per timpanostomia oltre che su *stent* di silicone usati per il seno frontale <sup>37</sup>.

I germi più comunemente coinvolti sono stafilococchi coagulasi negativi, enterococchi, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*. È ben noto come anche i miceti, e in particolare *Candida albicans*, siano in grado di colonizzare in forma di biofilm i suddetti dispositivi <sup>2</sup>.

Una riflessione particolare meritano i dati attualmente disponibili relativamente agli impianti cocleari. Nel 2004 è stato condotto uno studio con la microscopia elettronica a scansione <sup>38</sup> su sei impianti cocleari, dei quali due rimossi per infezioni refrattarie, due asportati per malfunzionamento e due di controllo non ancora inseriti. La formazione di biofilm è stata evidenziata su uno degli impianti rimossi per infezione, ma anche sugli altri tre asportati è stata ipotizzato il coinvolgimento di biofilm. La presenza di microrganismi con la formazione di matrice è stata rilevata sugli impianti cocleari mai impiantati, ma non si trattava di matrice esopolimerica e la contaminazione non poteva essere considerata coerente con i requisiti necessari per definirla da biofilm. Il modello dell’impianto non è indifferente nell’influenzare l’eventuale contaminazione da biofilm: le conformazioni che prevedono tasche e depressioni favoriscono l’organizzazione tridimensionale dei batteri e lo sviluppo dei fenotipi più resistenti alle terapie antibiotiche <sup>39-40</sup>.

## L’impianto di biofilm sulle mucose umane

Se dobbiamo credere che il 99% dei batteri vive nell’organizzazione dei biofilm, mentre solo l’1% si trova sotto forma di elementi isolati fluttuanti <sup>41</sup>, non stupisce la valutazione effettuata dai *Centers for Disease control and Prevention*, secondo la quale almeno il 65% di tutte le infezioni batteriche umane comporta il coinvolgimento di biofilm <sup>42</sup>.

Il coinvolgimento di biofilm nell’etiopatogenesi di diverse patologie non dipende esclusivamente dalla contami-

nazione di presidi, apparecchiature o dispositivi utilizzati nelle diagnostica o nel trattamento, ma va ascritta anche al fenomeno dell'impianto diretto di biofilm sulle mucose. Già nel marzo del 1998 il National Institute of Health "denunciava" il coinvolgimento di biofilm in oltre l'80% delle patologie umane di natura infettiva<sup>43</sup>.

La fibrosi cistica è la patologia nella quale risulta meglio documentata la presenza di biofilm: le alterazioni delle caratteristiche reologiche del muco e di conseguenza della clearance muco-cilare, che sono proprie della malattia, favoriscono infezioni ripetute da *P. aeruginosa*, la cui persistenza a livello polmonare è certamente facilitata dall'organizzazione di tale germe in forma di biofilm<sup>44</sup>. L'impianto del batterio sotto forma di biofilm è svelato macroscopicamente dall'accumulo di materiale mucoide e confermato dalla identificazione di tassi elevati di anticorpi anti-alginato, dato correlato con la riduzione della funzione respiratoria e con il peggioramento della prognosi<sup>45</sup>. In realtà molto tempo prima dell'evidenziarsi delle manifestazioni patologiche è stato possibile individuare con analisi elettro-microscopiche la presenza nel fluido di lavaggio broncoalveolare biofilm di *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*)<sup>46</sup>. Dal momento che è stato dimostrato in modelli in vitro la stimolazione alla produzione di citochine e chemochine proinfiammatorie da parte dell'*H. influenzae*, è ipotizzabile che il danno causato all'epitelio polmonare da quest'ultimo incrementi la possibilità di adesione e colonizzazione da parte di *P. aeruginosa*.

Numerose condizioni patologiche vengono attualmente ascritte all'organizzazione in biofilm dei batteri responsabili:

- rimanendo nell'ambito della pneumologia si possono citare tutte le infezioni croniche e/o ricorrenti e le bronchioliti;
- tra le patologie cardiologiche sono state raccolte evidenze per le endocarditi valvolari<sup>47</sup>;
- nell'ambito della reumatologia/ortopedia tale meccanismo etio-patogenetico è stato riconosciuto alla base di infezioni muscolo-scheletriche, fascite necrotizzante, osteomielite<sup>2</sup>;
- per quanto concerne l'urologia, i fallimenti terapeutici nei confronti di prostatiti e cistiti sono stati attribuiti proprio alle condizioni protette in cui *P. aeruginosa* ed *E. coli* si vengono a trovare nell'organizzazione dei biofilm<sup>48-49</sup>;
- in odontoiatria è noto da tempo come le carie e le periodontiti non vadano attribuite all'azione di batteri isolati, ma alle corrispondenti forme organizzate che nel caso specifico vengono definite "tartaro"<sup>50</sup>.

## I biofilm nella patologia ORL

Sono in continuo incremento le evidenze circa il ruolo dei biofilm nelle patologie di interesse ORL.

La formazione di biofilm è stata dimostrata per numerosi patogeni coinvolti in tali affezioni quali *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *H. influenzae* e *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*)<sup>26</sup>. La presenza di biofilm è stata spesso evidenziata nel materiale biotico ottenuto da tessuto tonsillare, adenoideo, etmoidale e mascellare di pazienti affetti da infezioni ricorrenti delle alte vie respiratorie<sup>51</sup>.

## Otite media

Le otiti medie croniche e le forme essudative persistenti a carico dell'orecchio medio vengono sempre più frequentemente interpretate come forme patologiche da biofilm<sup>52</sup>.

Con l'osservazione microscopica sono stati evidenziati biofilm batterici sulla mucosa della cassa timpanica in modelli sperimentali di otite media da *H. influenzae* indotta nei cincillà<sup>53</sup>.

L'analisi di 50 campioni di materiale biotico, ottenuto dalla mucosa dell'orecchio medio di 26 bambini affetti da otite media con versamento od otite media ricorrente, ha evidenziato la positività della PCR per *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis* in 24 versamenti, mentre solo in 6 casi le culture erano risultate positive<sup>54</sup>. Con il supporto dell'osservazione al microscopio elettronico confocale, combinata con la FISH (*fluorescent in situ hybridization*) è stato possibile fornire la prima dimostrazione della presenza di biofilm batterici sulla mucosa dell'orecchio medio in 46 dei 50 campioni.

Il dato più significativo non è rappresentato tanto dal coinvolgimento di biofilm nell'etiopatogenesi dell'otite media ricorrente, quanto dalla dimostrazione della presenza di biofilm sulla mucosa timpanica durante le fasi di remissione clinica. Questo dato ha richiesto un ripensamento sulla reale natura delle diverse forme di otite media e sulla contrapposizione tra forme infiammatorie rispetto a quelle infettive. Sebbene non possa essere ancora pronunciato a nostro avviso un giudizio definitivo, d'altro canto è corretto interpretare la presenza dei mediatori pro-flogogeni all'interno dell'orecchio medio non solo come responsabili delle forme "catarrali" croniche, ma anche in molti casi come la risposta alla presenza persistente del trigger batterico. Le conoscenze sulla complessa organizzazione dei biofilm gettano nuova luce sul percorso di comprensione della refrattarietà alla terapia antibiotica nelle otiti medie croniche e d'altro canto sono di ausilio nel chiarire l'efficacia dei tubicini di ventilazione timpanica. Questi ultimi, mentre interrompono meccanicamente l'integrità del biofilm, riventilano la cassa timpanica e, incrementando la pressione parziale di ossigeno, favoriscono il ripristino dell'epitelio cigliato, riducono il numero di elementi secretori e in definitiva consentono l'eliminazione del biofilm.

D'altro canto una abbondante proliferazione di biofilm è stata altresì evidenziata su 4 tubi di timpanostomia, rimossi da bambini che presentavano otorrea persistente<sup>53</sup>.

Meritevole di considerazione è altresì lo studio sperimentale su modello animale nel quale è stata indotta l'otite media purulenta cronica per infezione da *P. aeruginosa*: biofilm di questo batterio sono stati identificati con la microscopia elettronica a scansione soltanto nell'orecchio infettato<sup>55</sup>. D'altra parte biofilm da cocchi sono stati rilevati tanto nell'orecchio infettato quanto in quello di controllo. L'analisi di materiale ottenuto da colesteatomi ha evidenziato biofilm di *Pseudomonas*, aderenti ai cheratinociti, contenenti geni atti a codificare l'espressione di *quorum sensing*<sup>26</sup>. A conferma, i batteri usualmente isolati da colesteatomi indotti sperimentalmente sono in grado di formare biofilm<sup>56</sup>. La matrice di cheratina del colesteatoma appare un supporto ideale per la formazione di biofilm e d'altra parte i ceppi di *P. aeruginosa* isolati dai colesteatomi manifestano una spiccata attitudine ad aderire ai cheratinociti<sup>57</sup>.

Le caratteristiche istomorfologiche di 24 colesteatomi umani e 22 colesteatomi sperimentali sono state valutate con la microscopia ottica ed elettronica<sup>56</sup>: in 16 dei 24 colesteatomi umani e in 21 dei 22 colesteatomi animali sono stati identificati batteri Gram-positivi e Gram-negativi inglobati in depositi acellulari, dotati delle caratteristiche della tipica matrice polisaccaridica dei biofilm.

La persistenza e la ricorrenza dell'infezione così come l'efficacia del trattamento chirurgico sono tutti aspetti clinici coerenti con la centralità della malattia da biofilm nell'otite media cronica colesteatomatosa.

## Rinosinusite cronica

Nella rinosinusite cronica la mucosa va incontro ad alterazioni dell'epitelio cigliato, che la rendono una superficie ideale per la formazione di biofilm<sup>58</sup>. Inoltre le caratteristiche cliniche della rinosinusite cronica hanno indotto il fondato sospetto del coinvolgimento di biofilm batterici, confermato da studi su modello animale<sup>59,60</sup>, ma anche da evidenze cliniche<sup>60-63</sup>. Negli animali in cui i seni paranasali erano stati infettati con *P. aeruginosa* i corrispondenti biofilm sono stati evidenziati con la microscopia elettronica a scansione<sup>64</sup>. Non è stato possibile rilevare biofilm da mutanti dello stesso germe incapaci di organizzarsi in questo tipo di strutture<sup>60</sup>.

Nel 2005 Ramadan et al.<sup>62</sup> avevano analizzato con il microscopio elettronico a scansione il materiale biotico proveniente da cinque pazienti affetti da rinosinusite cronica: l'evidenza della formazione di biofilm è stata documentata in tutti i casi. Lo stesso gruppo di lavoro<sup>65</sup> aveva condotto uno studio prospettico in 30 pazienti affetti da rinosinusite cronica e 4 pazienti di controllo: reperti altamente suggestivi della presenza di biofilm in differenti stadi di maturazione, quali torri tridimensionali di batteri, canali e matrice, sono stati evidenziati in 24 dei pazienti (80%) e in nessuno dei controlli.

*H. influenzae* rappresenta il patogeno più frequentemente coinvolto, ma è stata altresì evidenziata una significativa correlazione tra la tendenza a formare biofilm di *P. aeruginosa* e *S. aureus* e la probabilità di persistenza della rinosinusite cronica a dispetto dell'intervento chirurgico endoscopico<sup>66</sup>.

Un dato apparentemente dissonante è stato fornito da Sanderson et al.<sup>67</sup>, i quali hanno rilevato la presenza di biofilm non solo in 14/18 campioni di mucosa ottenuta da pazienti sottoposti ad intervento chirurgico per rinosinusite cronica, ma anche in 2/5 campioni di controllo. Tale dato impone una riflessione sul ruolo dei biofilm nel ciclo vitale dei batteri commensali.

A conclusione di una sistemica revisione della letteratura sul ruolo dei biofilm nella rinosinusite cronica, Harvey e Lund<sup>68</sup> hanno affermato che i biofilm sono associati alla rinosinusite cronica, ma i dati scientifici attualmente disponibili sono ancora troppo esigui per una definizione del loro ruolo nel processo patogenetico.

## Adenoiditi

La recente identificazione di biofilm sul 94,9% della superficie adenoidea in bambini affetti da rinosinusite e/o otite cronica rispetto all'1,9% della superficie in bambini

operati di adenoidectomia per apnee ostruttive induce a correlare l'efficacia dell'intervento di rimozione chirurgica della tonsilla faringea con l'allontanamento della superficie di adesione dei biofilm<sup>69</sup>.

D'altra parte biofilm sono stati identificati anche sulla superficie adenoidea di soggetti di controllo, inducendo una più ampia riflessione sull'argomento: sembra che proprio nel momento in cui la "scoperta" dei biofilm possa favorire la comprensione dei meccanismi etiopatogenetici delle cronicizzazioni anche in campo ORL, lo stesso fenomeno possa essere interpretato anche nel senso diametralmente opposto. In altre parole se alcuni biofilm "cattivi" possono impedire all'ospite di difendersi, altri biofilm "buoni" potrebbero prevenire l'adesione di germi patogeni sulle mucose. Se dunque consideriamo i biofilm una manifestazione fenotipica trasversale alle diverse specie microbiche, non dobbiamo stupirci se non solo i batteri patogeni, ma anche i saprofiti si organizzano in biofilm.

## Tonsilliti

La prima dimostrazione della presenza di biofilm è stata fornita nel 2003 da Chole e Faddis<sup>70</sup>. Biofilm di batteri Gram-positivi e Gram-negativi sono stati rilevati in 11/15 tonsille infette e in 3/4 tonsille asportate per ipertrofia. Questo dato ha trovato conferma in lavori più recenti<sup>71,72</sup>, dai quali è emersa la presenza di biofilm nella maggior parte dei casi di tonsillite cronica o ricorrente. In particolare Kania et al.<sup>71</sup> hanno evidenziato la presenza di biofilm nel 70,8% delle tonsille asportate chirurgicamente.

## Il trattamento delle patologie ORL da biofilm

I batteri organizzati nei biofilm sono almeno 500 volte più resistenti agli antibiotici delle corrispondenti forme procariotiche<sup>73</sup>.

Qualunque strategia che si proponga di combattere la formazione o la proliferazione di biofilm batterici, deve tenere conto di alcuni dati fondamentali: 1) le condizioni metaboliche all'interno del biofilm variano drammaticamente da un punto all'altro<sup>74</sup>, rendendo possibile 2) la proliferazione di specie diverse ovvero 3) di forme genotipicamente e fenotipicamente eterogenee della stessa specie batterica; 4) pertanto è altamente improbabile che un solo antibiotico possa risultare efficace<sup>75,76</sup>. Inoltre gli agenti antimicrobici che siamo abituati a conoscere agiscono a livello molecolare o cellulare, ma non posseggono le prerogative per attaccare un livello di organizzazione comunitario, quale è appunto il biofilm batterico<sup>77</sup>. Sei possibili strategie potrebbero in futuro rappresentare la soluzione del problema<sup>78</sup>:

1. bloccare l'adesione delle cellule batteriche;
2. prevenire la crescita microbica;
3. interferire con i sistemi di comunicazione intercellulari;
4. disgregare le matrici polisaccaridiche già formate;
5. approccio probiotico;
6. modificazione dei materiali o delle modalità di rilascio dell'antibatterico.

## Blocco dell'adesione batterica alle mucose

La fase dell'adesione batterica può essere bloccata con la somministrazione di lisati batterici. Infatti la prevenzione della formazione di biofilm può essere perseguita favorendo la produzione di IgA secretorie a livello della mucose respiratorie proprio attraverso la somministrazione di lisati batterici polivalenti, preferibilmente mediante la via sublinguale, che induce peraltro la maturazione delle cellule dendritiche <sup>79</sup>.

L'interferenza sul metabolismo del ferro mediante agenti chelanti <sup>80</sup> o catecolamine inotropi <sup>81</sup> sortisce effetti rispettivamente di restrizione o di promozione della capacità di adesione batterica.

## Prevenzione della crescita microbica

Una attività inibente la formazione di biofilm di *P. aeruginosa* e stafilococchi coagulasi-negativi è stata evidenziata per claritromicina <sup>82 83</sup>.

Kondoh e Hashiba <sup>83</sup> hanno studiato da un punto di vista morfologico e quantitativo la capacità di formare biofilm da parte di un ceppo di *Pseudomonas aeruginosa* di tipo mucoide. *P. aeruginosa* è stata coltivata su Teflon a 37 °C per 7 giorni in presenza di concentrazioni diverse di claritromicina, eritromicina e midecamicina. La formazione di biofilm (studio morfologico) così come i livelli di esosi, proteine e alginato (analisi quantitativa) sono risultati decrescere all'incremento della concentrazione di claritromicina e di eritromicina, ma non sono stati in alcun modo influenzati dalla presenza della midecamicina, indipendentemente dalla concentrazione. In considerazione delle concentrazioni utilizzate in questi esperimenti, gli autori hanno concluso che gli effetti della claritromicina e dell'eritromicina sui biofilm sono da attribuire a azioni diverse da quella battericida. Questi cosiddetti "effetti collaterali" dei macrolidi possono essere così sintetizzati <sup>84</sup>:

- inibizione della produzione di alginato da parte di *P. aeruginosa*;
- riduzione della reazione anticorpale dell'ospite nei confronti dell'alginato e conseguente decremento della formazione di immunocomplessi;
- attivazione dell'autoinduttore 3-O-C12-lattone dell'omoserina e conseguente induzione dell'espressione di lasI e rhlI nei sistemi dei *quorum sensing* in *P. aeruginosa*.

La possibilità di bloccare la crescita microbica può essere amplificata dal raggiungimento di dosaggi notevolmente superiori a quelli raggiungibili con la terapia sistemica: tale obiettivo può essere perseguito con la somministrazione topica di antibiotici a livello naso-sinusale o auricolare, ma i risultati sono ancora controversi <sup>85 86</sup>.

## Interferenza con i sistemi di comunicazione intercellulari

Possibili strategie per il controllo della crescita dei biofilm potrebbero scaturire dalla identificazione di due sistemi di comunicazione (lasR-lasI e rhlR-rhlI) coinvolti nello sviluppo dei biofilm di *P. aeruginosa* <sup>12 87</sup>.

In esperimenti di laboratorio è stato dimostrato come l'interferenza biochimica con i *quorum sensing* abbia provocato il distacco e la disgregazione di biofilm già formati <sup>88</sup>. Una applicazione, seppure in campo industriale, è già in corso con l'utilizzazione di furanoni sostituiti, che competono con i siti di legame per le molecole di comunicazione proteggendo gli scafi delle imbarcazioni così come apparecchiature per culture acquatiche <sup>89</sup>.

Una ulteriore strategia attinente ai *quorum sensing* è l'inibizione della trascrizione dei geni, che controllano il viraggio verso il fenotipo biofilm o che codificano per i fattori che provvedono ai processi di adesione stabile <sup>11</sup>.

## Disgregazione delle matrici polisaccaridiche

Markers indicativi del distacco di batteri isolati dal biofilm potrebbero essere impiegati per individuare lo stato di maturazione del biofilm e di conseguenza per compiere la scelta terapeutica più appropriata <sup>90</sup>.

In termini generali è intuitivo comprendere che la disgregazione della matrice esopolimerica, sottragga un fondamentale fattore di protezione e resistenza agli elementi cellulari del biofilm, esponendoli ad una ritrovata efficacia tanto delle difese dell'ospite quanto dei trattamenti antibiotici <sup>73 91 92</sup>.

Il tiamfenicolo è un "vecchio" antibiotico, che è stato rivalutato nella somministrazione per aerosol per la capacità di interferire con la sostanza extracellulare del biofilm e in definitiva con la capacità di sopravvivenza e di replicazione di biofilm batterici organizzati sulle mucose respiratorie <sup>93</sup>.

La N-acetilisteina è un efficace mucolitico con un riconosciuto potere antiossidante: probabilmente alla combinazione di tali caratteristiche va ascritta la capacità di interferire nelle diverse fasi di formazione dei biofilm batterici, composti da *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermis*), stafilococchi coagulasi negativi <sup>94</sup> e *S. aureus* <sup>93</sup>. Particolarmente interessante è l'effetto disgregante nei confronti di biofilm anche consolidati.

L'attività battericida risulta significativamente potenziata, fino al 90%, dall'azione sinergica della N-acetilcisteina somministrata in associazione con il tiamfenicolo: l'associazione è in grado di interferire con gli elementi vitali del biofilm <sup>2</sup>.

La matrice cellulare potrebbe risultare alterata dalla manipolazione dei campi elettrici, che circondano i biofilm, favorendo la penetrazione degli antibiotici all'interno dello slime <sup>95</sup>.

Anche la degradazione enzimatica dell'alginato della matrice, rende più agevole la penetrazione di antibiotici <sup>96 97</sup>.

## Approccio probiotico

Tale strategia di trattamento parte dall'assunto che i biofilm rappresentino una modalità di crescita organizzata trasversale a tutto il mondo microbico o, in altri termini, che anche batteri non patogeni per l'uomo tendano verso questa variante fenotipica di sviluppo. Alla luce di questa interpretazione va rivisto il ruolo dei batteri saprofiti: nelle prime vie respiratorie tanto le mucose quanto le cavità trattate chirurgicamente non sono e non possono essere

sterili, ma vengono colonizzate da commensali capaci di competere con eventuali patogeni. Fin qui nulla di nuovo rispetto a quanto lo specialista Otorinolaringoiatra è abituato a conoscere: la novità consiste nel fatto che anche i saprofiti possono organizzarsi in biofilm. La conoscenza del complesso metabolismo dei biofilm e dei fenomeni di competizione e soppressione, che possono attivarsi all'interno degli stessi nelle diverse condizioni ambientali, potrebbe fornire preziosi spunti per la messa a punto di strategie finalizzate a favorire lo sviluppo dei biofilm "benigni" a scapito di quelli patogeni per le mucose delle prime vie respiratorie<sup>13</sup>. Sarebbe in qualche modo un approccio analogo a quanto viene già realizzato a livello intestinale con la ben nota somministrazione dei cosiddetti "fermenti lattici" alla scopo di favorire a seguito di infezioni e/o terapie antibiotiche il fisiologico equilibrio della flora microbica commensale.

## Modificazione dei materiali e delle modalità di rilascio dell'antibatterico

Qualunque superficie, anche quella apparentemente più inerte, risulta rivestita da costituenti provenienti dall'ambiente, quali particelle di acqua, elettroliti, materiale organico<sup>98</sup>. L'interazione tra questo "rivestimento" e i microrganismi è inizialmente regolato da fenomeno di natura prevalentemente fisica ovvero movimenti browniani, gravità, diffusione, interazioni elettrostatiche<sup>99</sup>. Sono in via di sperimentazione diverse soluzioni biotecnologiche finalizzate a prevenire la formazione di biofilm sui materiali ad uso sanitario.

Una possibilità è rappresentata dall'incorporare nella superficie polivinilpiridina N-alchilate a lunga catena, che la rendono lievemente idrofobica e carica positivamente: ne risulta un effetto battericida nei confronti di *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* ed *Escherichia coli* (*E. coli*)<sup>100</sup>.

Una ulteriore strategia consiste nell'incorporare nel dispositivo antibiotici a largo spettro<sup>101-106</sup>. Tale tecnica apparentemente inappuntabile cela in realtà non pochi problemi: infatti l'antibiotico deve essere incorporato in un quantitativo sufficiente per "coprire" il tempo di vita del dispositivo, ma nello stesso tempo non deve danneggiare le caratteristiche del materiale quali la lubrificazione, la durata, la biocompatibilità<sup>107</sup>. D'altra parte livelli eccessivamente bassi di antibiotico favoriscono l'emergere di ceppi resistenti<sup>108</sup>.

In alternativa è stato proposto adsorbimento dell'antibiotico su poliuretani con proprietà acide o basiche<sup>109</sup> o l'incorporazione del farmaco nel polimero come catena principale<sup>110</sup>.

Per evitare l'impiego con finalità profilattiche dei medesimi antibiotici utilizzati per il trattamento delle forme infettive acute, è stata avviata la ricerca di principi attivi di natura diversa. L'acido usnico, un metabolita secondario dei licheni, sembra poter rispondere ai requisiti richiesti per la sua attività antimicrobica nei confronti di *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* e l'abilità di inibire la formazione di biofilm<sup>111</sup>.

L'attività antimicrobica può essere inoltre potenziata dall'applicazione di una corrente a bassa tensione, che favorisce il rilascio di ioni argento dal dispositivo<sup>112</sup>.

Gli ultrasuoni sono stati usati per incrementare il trasporto di antibiotici attraverso i biofilm<sup>113-114</sup>. Ultrasuoni a bassa frequenza (70 kHz) e bassa intensità aumentano il tasso di crescita su superfici di polietilene di *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* ed *E. coli*, probabilmente incrementando il trasporto di ossigeno e nutrienti alle cellule, che in tali condizioni di metabolismo attivo ritornano ad una maggiore suscettibilità al trattamento antibiotico<sup>115</sup>.

L'approccio fotodinamico consiste nell'applicazione di una luce laser in presenza di farmaci fotosensibilizzanti allo scopo di produrre una distruzione ossidativa del biofilm<sup>116</sup>. Diversi studi sono stati dedicati all'interazione tra i liposomi e i biofilm batterici<sup>117-122</sup>. L'efficacia dei liposomi contenenti antibatterici è dipendente dalle caratteristiche dell'organismo infettante. Uno sviluppo interessante è rappresentato dall'impiego dei liposomi sensibili al pH<sup>123</sup>. Più stabili dei liposomi sono i sistemi di rilascio di antibiotici basati su polimeri biodegradabili<sup>124</sup>.

## Conclusioni

I biofilm rappresentano un microambiente molto dinamico nel quale avvengono scambi di molecole enzimatiche, proteiche, ma anche di materiale genetico.

Il fallimento della terapia antibiotica nelle più comuni patologie recidivanti, ricorrenti e croniche del distretto ORL può essere ascritto ad un complesso di fattori pertinenti all'ospite, all'ambiente, ai microrganismi o alla terapia farmacologica. Tra le motivazioni della refrattarietà delle patologie infettive merita un posto di qualche rilievo il fenomeno della formazione dei biofilm batterici. Queste complesse organizzazioni tridimensionali rappresentano una modalità di crescita protetta, che rende i batteri altamente resistenti ai meccanismi di difesa messi in atto dall'organismo umano così come ai trattamenti antibiotici. Dai biofilm si distaccano microrganismi isolati, determinanti per le riacutizzazioni delle patologie infettive delle prime vie respiratorie.

Gli antibiotici efficaci contro cellule quiescenti (quali i fluorochinoloni) sono più appropriati rispetto agli antibiotici più tradizionali (come i beta-lattamici), che riconoscono quale loro target le cellule in fase di attiva proliferazione<sup>125 126</sup>.

Moxifloxacin, un fluorochinolone orale di quarta generazione, si è dimostrata efficace nei confronti di biofilm formati tanto da batteri Gram-positivi che Gram-negativi<sup>127 128</sup>. In particolare, diversi studi dimostrano l'attività di moxifloxacin nei confronti di biofilm prodotti da stafilococchi isolati da infezioni protesiche, da endocarditi e da cateteri intravascolari<sup>128 129</sup> e verso biofilm prodotti da streptococchi viridanti in pazienti con endocarditi e con sepsi e neutropenia<sup>130</sup>. Inoltre, moxifloxacin ha dimostrato efficacia anche nei confronti di patogeni parodontali produttori di biofilm<sup>131</sup> e verso biofilm prodotto da *Stenotrophomonas maltophilia*<sup>127</sup>.

A concentrazioni facilmente raggiungibili con la somministrazione orale, il farmaco ha confermato le sue capacità di distruzione di biofilm nei diversi stadi di maturazione anche nel caso dei patogeni elettivi per le vie respiratorie<sup>132</sup>. Altri agenti antimicrobici, come alcuni macrolidi (es. claritromicina ed eritromicina) sarebbero in grado di inibire la formazione di biofilm<sup>127 128, 133-139</sup>.

Sono allo studio varianti tecnologiche nella scelta dei materiali che costituiscono protesi e dispositivi in modo da "scoraggiare" la proliferazione di biofilm. In particolare per quanto riguarda i tubicini di drenaggio transtimpanico sono stati proposti trattamenti di ionizzazione dei tubicini fluoroplastici e di quelli in silicene<sup>140-142</sup>.

## Bibliografia

- 1 Prince AS. *Biofilms, antimicrobial resistance, and airway infection*. N Eng J Med 2002;347:1110-1.
- 2 Madonini E. *I biofilm batterici*. Milano: Edizioni Scripta Manent 2003.
- 3 Donlan R. *Biofilms: microbial life on surfaces*. Emerg Infect Dis 2002;8:881-90.
- 4 Characklis W. *Attached microbial growths-II. Frictional resistance to microbial slimes*. Water Res 1973;7:1249-58.
- 5 Costerton J, Geesy G, Cheng K. *How bacteria stick*. Sci Am 1978;238:86-95.
- 6 Watnick P, Kolter R. *Biofilm, city of microbes*. J Bacteriol 2000;182:2675.
- 7 Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*. Nat Rev Microbiol 2004;2:95-108.
- 8 Davies DG, Geesey GG. *Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in Pseudomonas aeruginosa during biofilm development in continuous culture*. Appl Environ Microbiol 1995;61:8607.
- 9 Characklis WG, Mcfeters GA, Marshall KC. *Physiological ecology in biofilm systems*. In: Characklis WG, Marshall KC (eds). *Biofilms*. New York: John Wiley & Sons 1990, p. 341-394.
- 10 Bendinger B, Rijnaarts HHM, Altendorf K, Zehnder AJB. *Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids*. Appl Environ Microbiol 1993;59:3973-7.
- 11 Vlastarakos PV, Nikolopoulos TP, Maragoudakis P, Tzagaroulakis A, Ferekidis E. *Biofilms in ear, nose, and throat infections: how important are they?* Laryng 2007;117:668-73.
- 12 Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. *The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm*. Science 1998;280:295-8.
- 13 Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. *The role of biofilms in otolaryngologic infections*. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2004;12:185-90.
- 14 Salvatorelli G, De Lorenzi S. *Biofilms: stato dell'arte*. L'internista 2002;10:222-31.
- 15 Stewart PS, Camper AK, Handran SD, Huang C, Warnecke M. *Spatial distribution and coexistence of Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa in biofilms*. Microb Ecol 1997;33:2-5.
- 16 Riley MA, Wertz JE. *Bacteriocins: evolution, ecology, and application*. Ann Rev Microbiol 2002;56:117-37.
- 17 Flemming HC, Wingender J, Griegbe Mayer C. *Physico-chemical properties of biofilms*. In: Evans LV (ed). *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers 2000, pp. 19-34.
- 18 Leriche V, Sibille P, Carpentier B. *Use of an enzyme-linked lectin-sorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms*. Appl Environ Microbiol 2000;66:1851-6.
- 19 Sutherland IW. *The biofilm matrix- an immobilized but dynamic microbial environment*. Trends Microbiol 2001;9:222-7.
- 20 De Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. *Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport*. Biotechnol Bioeng 1994;43:1131-8.
- 21 Donlan RM, Costerton JW. *Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin Micr Rev 2002;15:167-93.
- 22 Boyd A, Chakrabarty AM. *Role of alginate lyase in cell detachment of Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 1994;60:2355-9.
- 23 Brading MG, Jass J, Lappin-Scott HM. *Dynamics of bacterial biofilm formation*. In: Lappin-Scott HM, Costerton JW (eds). *Microbial biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press 1995, pp. 46-63.
- 24 Characklis WG. *Biofilm processes*. In: Characklis WG, Marshall KC (eds). *Biofilms*. New York: John Wiley & Sons 1990, pp. 195-233.
- 25 Kobayashi H. *Airway biofilm disease*. Int J Antimicrob 2001;17:351-6.
- 26 Post JC, Hiller NL, Nistico L, Stoodley P, Ehrlich GD. *The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007*. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2007;15:347-51.
- 27 Shiau A-L, Wu C-L. *The inhibitory effect of Staphylococcus epidermidis slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent*. Microbiol Immunol 1998;42:33-40.
- 28 Ward KH, Olson ME, Lam K, Costerton JW. *Mechanisms of persistent infection associated with peritoneal implants*. J Med Microbiol 1992;36:406-13.
- 29 Rehm BH, Grabert E, Hein J, Winkler UK. *Antibody response of rabbits and cystic fibrosis patients to an alginate-specific outer membrane protein of a mucoid strain of Pseudomonas aeruginosa*. Microb Pathol 1994;16:43-51.
- 30 Vransky JD, Stewart PS, Suci PA. *Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by Pseudomonas aeruginosa biofilm displaying rapid-transport characteristics*. Antimicrob Agents Chemother 1997;42:1352-8.
- 31 Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. *Investigation of ciprofloxacin penetration into Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:2125-33.
- 32 Stenberg C, Christensen BB, Johansen T, Tostgaard Nielsen A, Andersen JB, Givskov M, et al. *Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms*. Appl Environ Microbiol 1999;65:4108-17.
- 33 Costerton JW. *Introduction to biofilm*. Int J Antimicrob Agents 1999;11:217-21.
- 34 Teitzel GM, Parsek MR. *Heavy metal resistance of biofilm and planktonic Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 2003;69:2313-20.
- 35 Luppens SB, Reij MW, van der Heijden RW, Rombouts FM, Abee T. *Development of a standard test to assess the resistance of Staphylococcus aureus biofilm cells to disinfectants*. Appl Environ Microbiol 2002;68:4194-200.
- 36 Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science 1999;284:1318-22.
- 37 Perloff JR, Palmer JN. *Evidence of bacterial biofilms on frontal recess stents in patients with chronic rhinosinusitis*. Am J Rhinol 2004;18:377-80.
- 38 Antonelli PJ, Lee JC, Burne RA. *Bacterial biofilms may contribute to persistent cochlear implant infection*. Otol Neurotol 2004;25:953-7.
- 39 Pawlowski KS, Wawro D, Roland PS. *Bacterial biofilm formation on a human cochlear implant*. Otol Neurotol 2005;26:972-5.
- 40 Loeffler KA, Johnson TA, Burne RA, Antonelli PJ. *Biofilm formation in an in vitro model of cochlear implants with removable magnets*. Otolaryngol Head Neck Surg 2007;136:583-8.
- 41 Ramadan, H. *Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms* Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2006;14:183-6.
- 42 Potera C. *Forging a link between biofilms and disease*. Science 1999;283:1837-9.
- 43 NIH Guide. *Targeted research on oral microbial biofilms*. March 6<sup>th</sup>, 1998.
- 44 Costerton J.W. *Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection*. Trends Microbiol 2001;9:50-2.
- 45 Pressler T, Pedersen SS, Espersen F, Hoiby N, Koch C. *IgG subclass antibody responses to alginate from Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis and chronic P. aeruginosa infection*. Pediatr Pulmonol 1992;14:44-51.

- 46 Stamer TD, Zhang N, Kim G, Apicella MA, McCray PB Jr. *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:213-20.
- 47 Ferguson DJ, McColm AA, Ryan DM, Acred P. *A morphological study of experimental staphylococcal endocarditis and aortitis II. Inter-relationship of bacteria, vegetation and cardiovascularity in established infections.* *Br J Exp Pathol* 1986;67:679-86.
- 48 Nickel JC, Olson ME, Barabas A, Benediktsson H, Dasgupta MK, Costerton JW. *Pathogenesis of chronic bacterial prostatitis in an animal model.* *Br J Urol* 1990;66:47-54.
- 49 Nickel JC, Costerton JW. *Bacterial localization in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis.* *Prostate* 1993;23:107-14.
- 50 Socransky SS, Haffajee AD. *Dental biofilms: difficult therapeutic targets.* *Periodontol* 2002;28:12-55.
- 51 Zuliani G, Carron M, Gurrola J. *Identification of adenoid biofilms in chronic rhinosinusitis.* *Am J Rhinol* 2004;18:377-80.
- 52 Post J.C. *Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media.* *Laryngoscope* 2001;111:2083-94.
- 53 Post JC, Aul JJ, White GJ, Wadowsky RM, Zavoral T, Tabari R, et al. *PCR-based detection of bacterial DNA after antimicrobial treatment is indicative of persistent, viable bacteria in the chinchilla model of otitis media.* *Am J Otolaryngol* 1996;17:106-11.
- 54 Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, et al. *Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media.* *JAMA* 2006;296:202-11.
- 55 Dohar JE, Hebda PA, Veeh R, wad M, Costerton JW, Hayes J, et al. *Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in a nonhuman primate model of chronic suppurative otitis media.* *Laryngoscope* 2005;8:1469-72.
- 56 Chole RA, Faddis BT. *Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas.* *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:1129-33.
- 57 Wang EW, Jung JY, Pashia ME. *Otopathogenic Pseudomonas aeruginosa strains as competent biofilm formers.* *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131:983-9.
- 58 Biedlingmaier J, Trifillis A. *Comparison of CT scan and electron microscopic findings on endoscopically harvested middle turbinates.* *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;118:165-73.
- 59 Perloff JR, Palmer JN. *Evidence of bacterial biofilms in a rabbit model of sinusitis.* *Am J Rhinol* 2005;19:1-6.
- 60 Palmer J. *Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis.* *Ann Otol Rhinol Laryngol suppl.* 2006;196:35-9.
- 61 Cryer J, Schipor I, Perloff JR, Palmer JN. *Evidence of bacterial biofilms in human chronic sinusitis.* *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004;66:155-8.
- 62 Ramadan HH, Sanclement JA, Thomas JC. *Chronic rhinosinusitis and biofilms.* *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132:414-7.
- 63 Ferguson BJ, Stolz DB. *Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis.* *Am J Rhinol* 2005;19:452-7.
- 64 Perloff JR, Palmer JN. *Evidence of bacterial biofilms in a rabbit model of sinusitis.* *Am J Rhinol* 2005;19:1-6.
- 65 Sanclement JA, Webster P, Thomas J, Ramadan HH. *Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis.* *Laryngoscope* 2005;115:578-82.
- 66 Bendouah Z, Barbeau J, Hamad WA, Desrosiers M. *Biofilm formation by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis.* *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;134:991-6.
- 67 Sanderson AR, Leid JG, Hunsaker D. *Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis.* *Laryngoscope* 2006;116:1121-6.
- 68 Harvey RJ, Lund VJ. *Biofilms and chronic rhinosinusitis: systematic review of evidence, current concepts and directions for research.* *Rhinol* 2007;45:3-13.
- 69 Coticchia J, Zuliani G, Coleman C, Carron M, Gurrola J 2nd, Hauptert M, et al. *Biofilm surface area in the pediatric nasopharynx: chronic rhinosinusitis vs obstructive sleep apnea.* *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:110-4.
- 70 Chole RA, Faddis BT. *Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity.* *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:634-6.
- 71 Kania RE, Lamers GE, Vonk MJ, Huy PT, Hiemstra PS, Bloemberg GV, et al. *Demonstration of bacterial cells and glycocalyx in biofilms on human tonsils.* *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:115-21.
- 72 Galli J, Ardito F, Calò L, Mancinelli L, Imperiali M, Parrilla C, et al. *Recurrent upper airway infections and bacterial biofilms.* *J Laryngol Otol* 2007;121:341-4.
- 73 Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. *Microbial biofilms.* *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-45.
- 74 Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. *Survival strategies of infectious biofilms.* *Trends Microbiol* 2005;13:34-40.
- 75 Potera C. *Forging a link between biofilms and disease.* *Science* 1999;283:1837-9.
- 76 Davies D. *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents.* *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:114-22.
- 77 Caldwell DE, Costerton JW. *Are bacterial biofilms constrained to Darwin's concept of evolution through natural selection?* *Microbiologia* 1996;12:347-58.
- 78 Stewart PS. *New ways to stop biofilm infections.* *Lancet* 2003;361:97.
- 79 Melioli G, Machi AMC, Rossi GC, Pallestrini E, Ferlazzo GG. *The immunoresponse against bacterial antigens is generated in vivo by mechanical bacteria lysate though a cross-talk between innate and adaptive immunity.* *Abs, ERS Congress, Vienna* 2003.
- 80 Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. *A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development.* *Nature* 2002;417:552-5.
- 81 Lyte M, Freestone Primrose PE, Neal CP, Olson BA, Haigh RD, Bayston R, et al. *Stimulation of Staphylococcus epidermidis growth and biofilm formation by catecholamine inotropes.* *Lancet* 2003;361:130-5.
- 82 Chai D, Wang R, Pei F. *Effects of macrolides on biofilm of mucoid Pseudomonas aeruginosa.* *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2001;81:934-6.
- 83 Kondoh K, Hashiba M, Baba S. *Inhibitory activity of clarithromycin and biofilm synthesis with Pseudomonas aeruginosa.* *Acta Otolaryngol Suppl* 1996;525:56-60.
- 84 Kobayashi H. *Airway biofilms: implications for pathogenesis and therapy of respiratory tract infections.* *Treat Respir Med* 2005;4:241-53.
- 85 Desrosiers M, Bendouah Z, Barbeau J. *Effectiveness of topical antibiotics on Staphylococcus aureus biofilm in vitro.* *Am J Rhinol* 2007;21:149-53.
- 86 Chiu AG, Antunes MB, Palmer JN, Cohen NA. *Evaluation of the in vivo efficacy of topical tobramycin against Pseudomonas sinusitis biofilms.* *J Antimicrob Chemother* 2007;59:1130-4.
- 87 Costerton JW, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. *The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections.* *J Clin Invest* 2003;112:1466-77.
- 88 Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, et al. *Inhibition of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria by a halogenated furanone compound.* *Microbiology* 2002;148:87-102.
- 89 Costerton JW, Stewart PS. *Combattere i biofilm.* *Le Scienze* 2001;396:87.
- 90 Davies DG. *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents.* *Nature* 2003;2:114-22.
- 91 Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.* *Science* 1999;284:1318-22.
- 92 Rogers J, Phillip F, Olliff C. *The effects of extracellular slime from Staphylococcus epidermidis on phagocytic ingestion and killing.* *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994;9:109-15.

- 93 Bozzolascio M, Debbia EA, Schito GC. *Rilevanza dei biofilm batterici nelle infezioni respiratorie: problematiche terapeutiche e possibili soluzioni*. GIMMOC 2002;6:203.
- 94 Perez -Giraldo C, Rodriguez-Benito A, Moran FJ, Hurtado C, Blanco MT, Gómez-García AC. *Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by Staphylococcus epidermidis*. J Antimicrob Chemother 1997;39:643-6.
- 95 Rediske AM, Roeder BL, Brown MK, Nelson JL, Robinson RL, Draper DO, et al. *Pulsed ultrasound enhances the killing of Escherichia coli biofilms by aminoglycoside antibiotics in vivo*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:771-2.
- 96 Hatch RA, Schiller NL. *Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:974-7.
- 97 Nemoto K, Hirota K, Ono T, Murakami K, Nagao D, Miyake Y. *Effect of Varidase (streptokinase) on biofilm formed by Staphylococcus aureus*. Chemotherapy 2000;46:111-5.
- 98 Smith A. *Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems?* Advanced Drug Delivery Reviews 2005;57:1539-50.
- 99 An YH, Dickinson RB, Doyle RJ. *Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections*. In: An YH, Friedman RJ (eds). *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*. Totowa, NJ: Human Press Inc. 2000, pp. 1-27.
- 100 Lin J, Qui S, Lewis K, Klibanov AM. *Bactericidal properties of flat surfaces and nanoparticles derivatized with alkylated polyethylenimines*. Biotechnol Prog 2002;18:1082-6.
- 101 Bach A, Eberhardt H, Frick A, Schmidt H, Bottinger BW, Martin E. *Efficacy of silver-coating central venous catheters in reducing bacterial colonization*. Crit Care Med 1999;27:515-20.
- 102 Donelli G, Francolini I, Piozzi A, Di Rosa R, Marconi W. *New polymer-antibiotic systems to inhibit bacterial biofilm formation: a suitable approach to prevent central venous catheter-associated infections*. J Chemother 2002;14:501-7.
- 103 Schierholz JM, Lucas LJ, Rump A, Pulverer G. *Efficacy of silver-coated medical devices*. J Hosp Infect 1998;40: 257-62.
- 104 Sheretz RJ, Carruth WA, Hampton AA, Byron MP, Solomon DD. *Efficacy of antibiotic-coated catheters in preventing subcutaneous Staphylococcus aureus infection*. J Infect Dis 1993;105:98-106.
- 106 Tebbs SE, Elliott TSJ. *A novel antimicrobial central venous catheter impregnated with benzalkonium chloride*. J Antimicrob Chemother 1993;31:261-71.
- 107 Donelli G, Francolini I. *Efficacy of antiadhesive, antibiotic, and antiseptic coatings in preventing catheter-related infections: review*. J Chemother 2001;13:595-606.
- 108 Danese P.N. *Antibiotic approaches: prevention of catheter colonization*. Chem Biol 2002;9:873-80.
- 109 Piozzi A, Francolini I, Occhiperti L, Venditti M, Marconi W. *Antimicrobial activity of polyurethanes coated with antibiotics: a new approach to the realization of medical devices exempt from microbial colonization*. Int J Pharm 2004;280:173-83.
- 110 Woo GLY, Yang M.L, Yin H.Q, Jaffer F, Mittleman MW, Santerre JP. *Biological characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer synthesized with fluoroquinolones*. J Biomed Mater Res 2002;59:35-45.
- 111 Francolini I, Norris P, Piozzi A, Donelli G, Stoodley P. *Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces*. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:4360-5.
- 112 Raad I, Hachem R, Zermeno A, Stephens LC, Bodey GP. *Silver iontophoretic catheter: a prototype of a long-term anti-infective vascular access device*. J Infect Dis 1996;173:495-8.
- 113 Rediske AM, Roeder BL, Nelson JL, Robinson RL, Schaaljie GB, Robison RA. *Pulsed ultrasound enhances the killing of Escherichia coli biofilms by aminoglycoside antibiotics in vivo*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:771-2.
- 114 Carmen JC, Roeder BL, Nelson JL, Beckstead BL, Runyan CM, Schaaljie GB, et al. *Ultrasonically enhanced vancomycin activity against Staphylococcus epidermidis biofilms in vivo*. J Biomater Appl 2004;18:237-45.
- 115 Pitt WG, Ross SA. *Ultrasound increases the rate of bacterial growth*. Biotechnol Prog 2003;19:1038-44.
- 116 Soukos NS, Socransky SS, Mulholland SE, Lee S, Doukas AG. *Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms*. Pharm Res 2000;17:405-9.
- 117 Jones MN, Song Y-H, Kaszuba M, Reboiras MD. *The interaction of phospholipid liposomes with bacteria and their use in the delivery of bactericides*. J Drug Target 1997;5:25-34.
- 118 Kim J.-H, Gias M, Jones M.N. *The adsorption of cationic liposomes to Staphylococcus aureus biofilms*. Colloids Surf, A Physicochem Eng Asp 1999;149:561-70.
- 119 Catuogno C, Jones MN. *The antibacterial properties of solid supported liposomes on Streptococcus oralis biofilms*. Int J Pharm 2003;257:125-40.
- 120 Ahmed K, Muiruri PW, Jones GH, Scott MJ, Jones MN. *The effect of grafted polyethylene glycol on the electrophoretic properties of phospholipid liposomes and their adsorption to bacterial biofilms*. Colloids Surf, A Physicochem Eng Asp 2001;194:287-96.
- 121 Robinson AM, Bannister M, Creeth JE, Jones MN. *The interaction of phospholipid liposomes with mixed bacterial biofilm and their use in the delivery of bactericide*. Colloids Surf, A Physicochem Eng Asp 2001;186:43-53.
- 122 Hill KJ, Kaszuba M, Creeth JE, Jones MN. *Reactive liposomes encapsulating a glucose oxidase-peroxidase system with antibacterial activity*. Biochim Biophys Acta, Biomembr 1997;1326:37-46.
- 123 Cordeiro C, Wiseman DJ, Lutwyche P, Uh M, Evans JC, Finlay BB, Webb MS. *Antibacterial efficacy of gentamicin encapsulated in pH-sensitive liposomes against an in vivo Salmonella enterica serovar typhimurium intracellular infection model*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:533-9.
- 124 Freiberg S, Zhu XX. *Polymer microspheres for controlled drug release*. Int J Pharm 2004;282:1-18.
- 125 Tanaka G, Shigeta M, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H, Usui T. *Effect of the growing rate of Pseudomonas aeruginosa biofilms on the susceptibility to antimicrobial agents: beta-lactams and fluoroquinolones*. Chemotherapy 1999;45:28-36.
- 126 Ashby MJ, Neale JE, Critchley IA. *Effect of antibiotics on non-growing planktonic cells and biofilms of Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 1994;33:443-52.
- 127 Di Bonaventura G, Spedicato I, D'Antonio D, Robuffo I, Piccolomini R. *Biofilm formation by Stenotrophomonas maltophilia: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime*. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:151-60.
- 128 Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. *In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of Staphylococcus lugdunensis clinical isolates*. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:888-95.
- 129 Kalteis T, Beckmann J, Schroder HJ, Schaumburger J, Linde HJ, Lerch K, et al. *Treatment of implant-associated infections with moxifloxacin: an animal study*. Int J Antimicrob Agents 2006;27:444-8.
- 130 Presterl E, Grisold AJ, Reichmann S, Hirschl AM, Georgopoulos A, Graninger W. *Viridans streptococci in endocarditis and neutropenic sepsis: biofilm formation and effects of antibiotics*. J Antimicrob Chemother 2005;55:45-50.
- 131 Eick S, Seltmann T, Pfister W. *Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm - an in vitro study*. J Clin Periodontol 2004;31:376-83.
- 132 Roveta S, Schito AM, Marchese A, Schito GC. *Activity of moxifloxacin on biofilms produced in vitro by bacterial pathogens involved in acute exacerbations of chronic bronchitis*. Int J Antimicrob Agents 2007;30:415-21.
- 133 Amsden GW. *Anti-inflammatory effects of macrolides an un-*

- derappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions.* J Antimicrob Chemother 2005;55:10-21.
- <sup>134</sup> Healey DP. *Macrolide immunomodulation of chronic respiratory diseases.* Curr Infect Dis Rep 2007;9:7-13.
- <sup>135</sup> Cervin A, Wallwork B. *Macrolide therapy of chronic rhinosinusitis.* Rhinology 2007;45:259-67.
- <sup>136</sup> Gorski NP, Krzeski A. *Medical management of chronic rhinosinusitis with macrolides.* Pol Merkur Lekarski 2005;19:490-3.
- <sup>137</sup> Wallwork B, Coman W, Mackay-sim A, Greiff L, Cervin A. *A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of macrolide in the treatment of chronic rhinosinusitis.* Laryngoscope 2006;116:189-93.
- <sup>138</sup> Takeoka K, Ichimiya T, Yamasaki T, Nasu M. *The in vitro effect of macrolides on the interaction of human polymorphonuclear leukocytes with Pseudomonas aeruginosa in biofilm.* Chemotherapy 1998;44:190-7.
- <sup>139</sup> Swords WE, Rubin BK. *Macrolide antibiotics, bacterial populations and inflammatory airway disease.* Neth J Med 2003;61:242-8.
- <sup>140</sup> Biedlingmaier JF, Samaranayake R, Whelan P. *Resistance to biofilm formation on otologic implant materials.* Otolaryngol Head Neck Surg 1998;118:444-51.
- <sup>141</sup> Saidi IS, Biedlingmaier JF, Whelan P. *In vivo resistance to bacterial biofilm formation on tympanostomy tubes as a function of tube material.* Otolaryngol Head Neck Surg 1999;120:621-7.
- <sup>142</sup> Tatar EC, Unal FO, Tatar I, Celik HH, Gursesel B. *Investigation of surface changes in different types of ventilation tubes using scanning electron microscopy and correlation of findings with clinical follow-up.* Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2005;70:411-7.

