

WORLD UNION  
OF  
WOUND HEALING SOCIETIES



WORLD UNION OF WOUND HEALING SOCIETIES

## DOCUMENTO DI POSIZIONAMENTO

# GESTIONE DEL BIOFILM

---

**Il ruolo del biofilm nella  
guarigione ritardata delle ferite**

---

**La gestione del biofilm nella pratica**

---

**Progressi della ricerca nella conoscenza  
del biofilm**



**EDITORE**

Clare Bates

**DIRETTORE GENERALE**

Rob Yates



[www.wuwhs.net](http://www.wuwhs.net)

**Come citare il presente documento**

World Union of Wound Healing Societies (WUWHS), Congresso di Firenze, Documento di posizionamento. *Gestione del biofilm*. Wounds International 2016



Supportato da una sovvenzione educativa di B Braun

I punti di vista descritti nella presente pubblicazione sono propri degli autori e non rispecchiano necessariamente quelli di B Braun

Prodotto da

Wounds International — una divisione di Omnia-Med Ltd

1.01 Cargo Works, 1-2 Hatfields, Londra, SE1 9PG

Tutti i diritti riservati ©2016. È vietata la riproduzione, la copia o la trasmissione della presente pubblicazione senza previo consenso scritto.

Nessun paragrafo della presente pubblicazione può essere riprodotto, copiato o trasmesso, a meno che non si disponga di autorizzazione scritta o non si soddisfino le clausole del Copyright, Designs and Patents Act 1988 o non si agisca secondo i termini di eventuali licenze che consentano la copia limitata concessa dalla Copyright Licensing Agency, 90 Tottenham Court Road, Londra, W1P 0LP

La resistenza antimicrobica e multifarmaco incombe nel panorama sanitario globale, in particolare nel trattamento di ferite croniche di difficile guarigione, in cui i dati attuali evidenziano la presenza del biofilm nel 60%-100% delle ferite che non guariscono. Se da un lato il ruolo svolto dal biofilm nella cronicità delle ferite è ancora in fase di studio, risulta sempre più lampante che le ferite di difficile guarigione contengono biofilm, la cui presenza, in qualche modo, ne ritarda o impedisce la guarigione.

La gestione del biofilm nelle ferite croniche si sta rapidamente trasformando nell'obiettivo principale della cura delle ferite. Tuttavia, la gestione del biofilm è un'attività di innegabile complessità. Oltre ai passaggi basilari della prevenzione iniziale (l'impiego di agenti di contrasto del biofilm), della rimozione (dei residui e del tessuto necrotico) e della prevenzione di nuove formazioni (impiego di agenti antimicrobici), è necessario prendere in considerazione una miriade di altri parametri ambientali, clinici e relativi al paziente, per individuare una soluzione adatta al caso.

Il rilevamento e la localizzazione dei biofilm nelle ferite croniche fornisce informazioni cliniche utili che contribuiscono a formulare una valutazione e a rendere efficace la rimozione dei residui. Tuttavia, le informazioni a disposizione sono ancora lacunose per quanto concerne il rilevamento e la localizzazione del biofilm. Se le linee guida esistenti (ad esempio, ESCMID 2015) offrono indicazioni in tema di diagnosi e trattamento delle infezioni con biofilm, restano dubbi irrisolti relativi all'eventuale presenza di segni visivi che potrebbero rivelarsi utili nella decisione di procedere o meno con una biopsia.

Sebbene il dibattito circa l'individuazione del biofilm a occhio nudo conquisti terreno e siano emerse nuove tecniche (ad esempio, la "mappa delle ferite con biofilm" di Nagakami e colleghi), sussiste ancora la necessità fondamentale di un rilevatore di biofilm "al punto di cura", in grado di rilevare la presenza del biofilm nel giro di pochi minuti e non di ore o giorni.

Se è vero che sono stati compiuti significativi passi avanti nella prevenzione, nel rilevamento e nella gestione del biofilm, è necessario proseguire con la ricerca per ridurre l'impatto su pazienti e sistemi sanitari.

Nel presente documento di posizionamento, i medici responsabili studiano il ruolo svolto dal biofilm nella guarigione ritardata delle ferite, la gestione del biofilm nella pratica e il modo in cui la ricerca, presente e futura, possa comprendere ulteriormente queste comunità batteriche.

### **Autori**

**Thomas Bjarnsholt**, Costerton Biofilm Center, Dipartimento di Immunologia e Microbiologia, Facoltà di Medicina, Università di Copenhagen, Danimarca; Dipartimento di Microbiologia clinica, Rigshospitalet, Danimarca

**Rose Cooper**, Cardiff School of Health Sciences, Cardiff Metropolitan University, Cardiff, Regno Unito

**Jacqui Fletcher**, consulente indipendente, Regno Unito

**Isabelle Fromantin**, Esperta di ferite e guarigione, Institut Curie, Francia

**Klaus Kirketerp-Møller**, Centro per la guarigione delle ferite di Copenhagen, Ospedale universitario Bispebjerg, Copenhagen, Danimarca

**Matthew Malone**, Liverpool Hospital, South Western Sydney LHD, Australia; LIVE DIAB CRU, Ingham Institute of Applied Medical Research, Sydney, Australia

**Greg Schultz**, Institute for Wound Research, Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Università della Florida, USA

**Randall D Wolcott**, Presidente della Professional Association and Research and Testing Lab of the South Plains, Texas, USA

# Il ruolo dei biofilm nella guarigione ritardata delle ferite

**Thomas Bjarnsholt**, Costerton Biofilm Center, Dipartimento di Immunologia e Microbiologia, Facoltà di Medicina, Università di Copenhagen, Danimarca; Dipartimento di Microbiologia clinica, Rigshospitalet, Danimarca, **Greg Schultz**, Institute for Wound Research, Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Università della Florida, USA, **Klaus Kirketerp-Møller**, Centro per la guarigione delle ferite di Copenhagen, Ospedale universitario Bispebjerg, Copenhagen, Danimarca, **Jacqui Fletcher**, consulente indipendente e **Matthew Malone**, Liverpool Hospital, South Western Sydney LHD, Australia, LIVE DIAB CRU, Ingham Institute of Applied Medical Research, Sydney, Australia

**S** spesso, i batteri vengono considerati singole cellule che si moltiplicano rapidamente in fase di crescita esponenziale, suscettibili agli antibiotici se non ne sono intrinsecamente resistenti. La resistenza antimicrobica e la resistenza multifarmaco rappresentano problemi in espansione in tutto il mondo e costituiscono un argomento di discussione attuale oggetto di lunghi dibattiti. Gran parte dei medici coinvolti nel trattamento delle ferite sfrutta i modelli di suscettibilità provenienti dal laboratorio di microbiologia clinica per stabilire di quali antibiotici necessita un paziente. Tali decisioni sono spesso supportate da linee guida di consenso internazionale, sufficienti per la gestione di infezioni acute<sup>[1,2,3,4]</sup>. Tuttavia, in caso di infezioni croniche, quali quelle che insorgono in seguito all'impianto di dispositivi medici, le infezioni polmonari di pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) e le ferite croniche che non guariscono, le linee guida summenzionate appaiono inadeguate. Per quale motivo? In che modo possiamo spiegare la rapida risoluzione dei sintomi di infezione per mezzo di agenti antimicrobici in pazienti con ferite acute, in contrasto con la condizione letargica o di mancata risposta che spesso si verifica nelle ferite croniche che non guariscono?

La risposta è al tempo stesso complicata e semplice ( riquadro 1, pagina 7). I batteri possono essere presenti in almeno due diverse forme di crescita fenotipica: la prima si riferisce a cellule singole a crescita rapida, ad esempio, la forma planctonica; la seconda è costituita da comunità aggregate di cellule a crescita lenta in forma di biofilm. Tutta la microbiologia classica e lo sviluppo di antimicrobici si basa unicamente su paradigmi planctonici, che fanno leva su metodi concepiti all'inizio del 1800. È di gran lunga più facile far crescere i batteri utilizzando questi metodi, mediante colture agitate o con l'espansione su piastre di agar. Queste tecniche, presumibilmente, rispecchiano lo stato in cui si trovano i batteri durante un'infezione acuta. Questi metodi sono ancora ampiamente accettati come lo standard d'oro per la rappresentazione dei patogeni delle infezioni acute.

Dal canto loro, le infezioni croniche sono l'esatto opposto. In questo caso, una quantità notevole di batteri risiede nei biofilm, in cui sono circondati da una densa matrice di polisaccaridi, DNA libero (eDNA) di origine batterica o dell'organismo ospite e proteine che aderiscono strettamente alla comunità e alle strutture del biofilm, proteggendole dagli attacchi di neutrofili e macrofagi. Inoltre, molti batteri non si dividono o non vengono metabolizzati rapidamente, il che li rende tolleranti: quasi tutti gli antibiotici, infatti, neutralizzano esclusivamente i batteri metabolicamente attivi, inibendo gli enzimi batterici critici. È importante comprendere che la maggior parte delle ferite croniche infette offre rifugio a diverse specie di batteri che richiedono trattamenti differenti, ad esempio gli antibiotici<sup>[5,6,7]</sup>. Tuttavia, le diverse specie non rientrano necessariamente all'interno del medesimo biofilm, ma sono piuttosto sparse in piccoli focolai di specie singole<sup>[8,9,10]</sup>.

In questo articolo analizzeremo le implicazioni dei biofilm sulle ferite umane croniche che non guariscono, presentando evidenze o ipotesi del modo in cui i biofilm ne ritardano la guarigione. Inoltre, affronteremo il rompicapo clinico relativo alla diagnosi del biofilm all'interno delle ferite e analizzeremo i migliori metodi di trattamento.

## DEFINIZIONE DI BIOFILM

I biofilm vengono spesso definiti sulla base di osservazioni *in vitro*. Le definizioni classiche, in genere, descrivono i biofilm come batteri adesi alle superfici, incapsulati in una matrice extracellulare autoprodotta e tolleranti agli agenti antimicrobici (tra cui antibiotici e antimicrobici). Inoltre, lo sviluppo del biofilm è spesso descritto come un fenomeno che

**"La resistenza antimicrobica e la resistenza multifarmaco rappresentano un problema in espansione in tutto il mondo, nonché un argomento di discussione attuale oggetto di lunghi dibattiti"**

annovera dalle tre alle cinque fasi, il cui inizio è marcato dalle cellule singole che aderiscono a una superficie, che prosegue con la maturazione del biofilm e che termina con la dispersione dei batteri dal biofilm<sup>[11,12,13]</sup>. Le osservazioni *in vitro*, che si basano su modelli a cella di flusso che utilizzano superfici di vetro e terreni di coltura freschi ossigenati che fluiscono continuamente sul batterio, differiscono notevolmente quando confrontate con le condizioni delle infezioni delle ferite croniche<sup>[14]</sup>. In questo caso, i batteri non sono esposti a un flusso continuo di terreno fresco e non aderiscono a una superficie di vetro (né ad alcuna superficie)<sup>[6,10]</sup>. I biofilm delle ferite croniche *in vivo* sono spesso incapsulati in una matrice, che include il materiale ospite, rendendo problematica la dispersione.

Pertanto, il ricorso a osservazioni *in vitro* per definire, diagnosticare e trattare i biofilm nelle infezioni croniche potrebbe generare un'impressione errata<sup>[15]</sup>. Tuttavia, sussistono tratti in comune tra le evidenze *in vitro* e *in vivo* che possono contribuire a una definizione di biofilm. Tra questi emergono:

- Aggregazione dei batteri
- Una sorta di matrice che non si limita all'autoproduzione in quanto può essere originata anche dall'organismo ospite
- Estrema tolleranza e protezione nei confronti della maggior parte degli agenti antimicrobici e del sistema immunitario dell'organismo ospite.

Suggeriamo di attenersi alla seguente definizione semplificata per stabilire che cosa sono i biofilm nelle infezioni croniche: *un insieme di batteri tolleranti al trattamento e al sistema immunitario dell'organismo ospite.*

#### **IN CHE MODO LE COMUNITÀ DI BIOFILM DIVERGONO DAI BATTERI PLANCTONICI?**

Tutti i batteri planctonici sono cellule singole che solitamente crescono rapidamente e di rado sono osservate direttamente in infezioni, salvo in casi di gravi condizioni, quale la setticemia<sup>[14]</sup>. Tuttavia, presupponiamo che durante le infezioni acute i batteri siano del fenotipo planctonico, poiché sono suscettibili agli agenti antimicrobici che, con trattamenti mirati, portano a una netta risoluzione dei sintomi.

Le evidenze *in vivo* suggeriscono che i fenotipi di biofilm differiscono marcatamente per fisiologia e attività rispetto alle cellule planctoniche. I batteri sono aggregati e difficili, se non impossibili, da trattare e riescono in qualche modo a evadere il sistema immunitario dell'organismo ospite<sup>[3,14]</sup>. Spesso i batteri sono inclusi in una matrice che può essere prodotta dai batteri o dall'organismo ospite. La composizione esatta della sostanza polimerica extracellulare (EPS) varia a seconda dei microrganismi presenti, ma in genere prevede la presenza di polisaccaridi, proteine, glicolipidi e DNA extracellulare (eDNA)<sup>[16, 17, 18]</sup>.

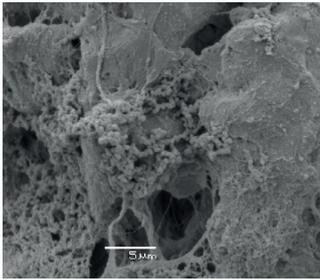
Studi condotti con microelettrodi hanno identificato ulteriori regioni anossiche all'interno del biofilm, evidenziando una minore attività metabolica cellulare dei batteri<sup>[19,20,21]</sup>. Ciò contribuisce in parte alla resistenza intrinseca dei biofilm ai trattamenti antimicrobici.

#### **PREVALENZA DEI BIOFILM NELLE FERITE CRONICHE**

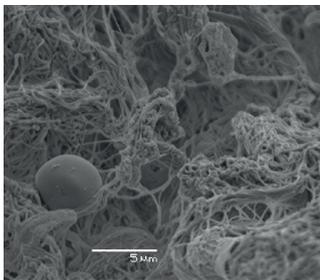
Meno di 10 studi hanno individuato biofilm in ferite croniche che non guariscono, facendo leva sugli approcci al microscopio accettati, con o senza analisi molecolare<sup>[6,9,10,21-24]</sup>. Questi studi hanno rilevato la presenza di biofilm nel 60%-100% dei campioni. Alla luce dell'eterogeneità e della distribuzione spaziale dei biofilm all'interno delle ferite croniche, la mancata cattura di tessuto ospitante il biofilm mediante tecniche di campionamento potrebbe avvicinare la prevalenza effettiva al 100%<sup>[7,10]</sup>.

#### **RILEVAMENTO DEI BIOFILM NELLE FERITE CRONICHE**

Abbiamo presentato queste questioni in ordine inverso, per cui il nostro fondamento logico diventerà lampante. I metodi attualmente accettati per individuare il biofilm dai campioni tissutali sono stati limitati principalmente all'uso, da parte dei ricercatori, di microscopi ad alta potenza (microscopio elettronico a scansione, SEM; microscopio confocale a scansione laser, CLSM) soli o in combinazione con tecniche di sequenziamento del DNA molecolare che prevedono l'uso di sonde fluorescenti per determinare la presenza o l'assenza dei batteri e per individuarne la posizione. Anche questi approcci hanno limitazioni, in particolare la distribuzione eterogenea dei batteri all'interno di una ferita. Ciò rende ardua la scelta del campionamento della ferita; la biopsia tissutale è uno standard d'oro ma raccoglie i batteri esclusivamente da un'area piccola, aumentando significativamente le possibilità



**Immagine 1:** Biopsia del tessuto da un'ulcera cronica, non-guarigione piede diabetico complicata dal biofilm visualizzata al microscopio elettronico a scansione



**Immagine 2:** Microscopia elettronica a scansione hanno visto da un'ulcera del piede diabetico con biofilm

che un batterio importante non venga assolutamente rilevato<sup>[7]</sup>. In confronto, l'uso di tamponi superficiali con la tecnica Levine consente il campionamento di un'ampia area ma la raccolta riguarda esclusivamente i batteri presenti sulla superficie della ferita: questo non rispecchia necessariamente il microbiota<sup>[25,26]</sup>.

Molti sono stati i dibattiti sulla possibilità che i biofilm, di natura microscopica, possano essere osservati a occhio nudo. In diverse condizioni patologiche e di salute umane, i biofilm, se lasciati a maturare, possono mostrarsi evidenti a livello macroscopico, come nel caso delle placche dentali<sup>[27]</sup>. Tuttavia, il quadro è meno chiaro nel caso di ferite croniche. Alcuni medici ricorrono alla retorica per promuovere ciò che ritengono siano "indizi clinici" della presenza di biofilm mediante osservazioni a occhio nudo che non si basano su rigore scientifico<sup>[2,28,29]</sup>. Questi segni includono uno strato viscido, traslucido e brillante sulla superficie della ferita non guarita<sup>[28,29]</sup>, la presenza di tessuto necrotico o fibrina e materiale gelatinoso che si rigenera rapidamente dopo la rimozione, rispetto al tessuto necrotico o ad altri tessuti devitalizzati o fibrina che spesso impiegano più tempo per rigenerarsi<sup>[29,30,31]</sup>.

Attualmente, non esiste alcun test diagnostico standard per stabilire la presenza di biofilm nella ferita e non sono disponibili biomarcatori quantificabili. Questa potrebbe rappresentare un'importante sfida clinica, poiché la distinzione tra la patogenicità del fenotipo planctonico o di biofilm nelle infezioni di ferite croniche costituisce una notevole barriera a un trattamento efficace.

In base a quanto affermato in precedenza, cioè che "tutte le ferite croniche che non guariscono rappresentano un potenziale rifugio per biofilm", non è opportuno fare affidamento su indizi visivi aneddotici. Proponiamo ai medici di "presupporre che tutte le ferite croniche che non guariscono che non hanno risposto alle cure standard presentino biofilm" e, pertanto, che i trattamenti siano orientati in questo senso. Sugeriamo che il sospetto clinico della presenza di biofilm venga sollevato per i pazienti le cui infezioni delle ferite croniche non abbiano risposto adeguatamente agli agenti antimicrobici e al trattamento delle ferite standard, o laddove le infezioni delle ferite croniche presentino periodi di quiescenza alternati a episodi acuti<sup>[32]</sup>. Questi segni e sintomi si basano su evidenze attuali che stabiliscono che i biofilm non possono essere debellati da agenti antimicrobici, per cui è lecito presupporre che una ferita cronica che non guarisce contenga batteri nel fenotipo del biofilm.

### **IN CHE MODO I BIOFILM INIBISCONO LA GUARIGIONE DELLE FERITE?**

I meccanismi esatti attraverso i quali i biofilm bloccano i processi di guarigione delle ferite sono ancora ambigui. I dati attualmente disponibili suggeriscono che la ferita rimane in uno stato infiammatorio violento, impedendo così il verificarsi dei normali cicli di guarigione della ferita. Il perché ciò accada non è ancora chiaro, ma numerosi fattori sistemici e locali contribuiscono alla produzione e al mantenimento della ferita cronica. A livello sistemico, i fattori fisiologici comprendono diabete mellito, insufficienza venosa, malnutrizione, cancro, edema, traumi ripetitivi al tessuto e risposta dell'organismo ospite compromessa. La maggior parte delle ferite croniche guarisce se i fattori di predisposizione vengono trattati adeguatamente; ad esempio, riduzione dell'edema nelle ulcere venose delle gambe, scarico delle ulcere del piede diabetico e delle ulcere da decubito, oltre ai principi di guarigione delle ferite umide.

A livello locale, i batteri colonizzano tutte le ferite croniche; i due più comuni sono *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, due noti generatori di biofilm. Da un articolo di Gjødsbøl et al<sup>[33]</sup>, si evince che il 93,5% delle ulcere croniche dell'arto inferiore conteneva *S. aureus* e il 52,2% offriva rifugio a *P. aeruginosa*, ma solo le ulcere con *P. aeruginosa* erano caratterizzate da maggiori dimensioni della ferita e minore velocità di guarigione. La spiegazione si potrebbe ricercare nella capacità di *P. aeruginosa* di eliminare i leucociti polimorfonucleati (PMN) secernendo ramnolipidi<sup>[34]</sup>. Questo glicolipide è controllato mediante il sistema quorum sensing ed è probabilmente una delle principali cause del mancato debellamento di *P. aeruginosa* nelle ferite croniche.

Ennis et al (2000)<sup>[26]</sup> hanno approfondito il ruolo dei PMN e rilevato che le ferite croniche erano "stordite nella fase infiammatoria della guarigione". Nei normali cicli di guarigione delle ferite, questa fase può essere preceduta da una fase proliferativa, in cui la funzione dei PMN è gradualmente sovrastata dai macrofagi e i fibroblasti iniziano la ricostruzione del tessuto<sup>[26]</sup>.

**"Proponiamo ai medici di presupporre che tutte le ferite croniche che non guariscono e che non hanno risposto alle cure standard presentino biofilm e, pertanto, che i trattamenti vengano orientati in questo senso"**

### **Riquadro 1: Biofilm: prassi attuali complesse di gestione delle ferite**

I biofilm presentano diverse sfide per la gestione tradizionale delle ferite e per la relativa guarigione. In primo luogo, la localizzazione dei biofilm nei letti delle ferite può risultare ardua e i medici in genere si limitano a ripulire le aree che presentano segni secondari di biofilm, (tessuto necrotico nella ferita) e altri segni superficiali di infiammazione locale.

In secondo luogo, il campionamento ottimale delle aree superficiali e sottosuperficiali dei letti delle ferite è difficile e i batteri sono distribuiti in maniera estremamente eterogenea. Pertanto, l'identificazione dei batteri del biofilm è una sfida in quanto un laboratorio di microbiologia standard non riesce a rilevare la natura più complessa dei biofilm e non elabora i campioni di ferita in modo da disperdere adeguatamente il biofilm affinché i batteri possano essere posti in colture con saggi di crescita su piastra standard.

I biofilm interferiscono con la normale guarigione della ferita, "bloccando" il letto della ferita in uno stato infiammatorio cronico che porta a elevati livelli di proteasi (metalloproteinasi di matrice e elastasi neutrofila) e a specie reattive dell'ossigeno (ROS) che danneggiano le proteine e le molecole essenziali per la guarigione. Un'ampia percentuale di batteri nelle comunità di biofilm è metabolicamente latente, il che genera tolleranza agli antibiotici. Le molecole di disinfettante altamente reattive da un punto di vista chimico reagiscono di frequente con i componenti della matrice esopolimerica del biofilm, esaurendone la concentrazione e impedendone la penetrazione a fondo nella matrice del biofilm.

Pertanto, le conseguenze di una necrosi *in situ* prolungata causata da cellule batteriche potrebbero spiegare sia l'afflusso costante di PMN nelle ferite croniche che contengono *P. aeruginosa*, sia il conseguente rilascio localizzato di enzimi proteolitici pro-infiammatori<sup>[35]</sup>. Purtroppo, non siamo in grado di postulare il meccanismo responsabile di questo fenomeno in ferite non infestate da *Pseudomonas*<sup>[36]</sup>.

Nel 2015, Marano et al<sup>[37]</sup> hanno rilevato che la migrazione e la proliferazione di cheratinociti epidermici umani venivano diminuite dai derivati dei biofilm contenenti *P. aeruginosa* e *S. aureus*. L'utilizzo dell'analisi proteomica ha consentito a Marano et al di avvicinare l'attività di *S. aureus* a quella di una proteina, mentre l'attività di *P. aeruginosa* era più simile a quella di una piccola molecola<sup>[37]</sup>. Le numerose proteine rivelate mediante l'analisi proteomica presentavano presunti collegamenti con la ritardata guarigione delle ferite. Tra queste,  $\alpha$ -emolisina, alcol deidrogenasi, fruttosio-bifosfato aldolasi, lattato deidrogenasi e inibitore della differenziazione delle cellule epidermiche.

Una seconda area di interesse della ricerca suggerisce che i biofilm di batteri infettivi contribuiscono a una bassa tensione dell'ossigeno localizzata all'interno della ferita. I primi studi *in vitro* che utilizzavano microelettrodi hanno individuato aree discrete di significativo consumo di ossigeno all'interno dei biofilm<sup>[38]</sup>. Ulteriori studi che ricorrevano ai microelettrodi con CLSM, hanno individuato microdomini in diverse aree del biofilm che ospitava ambienti biochimici alterati, comprese alterazioni di pH e ossigeno<sup>[39]</sup>. La creazione di aree anossiche all'interno del biofilm può spiegare la presenza di anaerobi in biofilm a specie miste. Le condizioni anossiche sono state osservate anche in infezioni polmonari croniche in pazienti con FC<sup>[40]</sup>. All'interno di un polmone affetto cronicamente da FC, è stato osservato che i PMN consumano principalmente ossigeno, causandone l'esaurimento che soffoca i batteri, i quali diminuiscono così l'attività metabolica<sup>[19,20]</sup>.

Da dati del 2016 raccolti da James e colleghi, si evincono ulteriori evidenze a sostegno del concetto di basse tensioni di ossigeno localizzate, che contribuiscono alla cronicità della ferita<sup>[21]</sup>. Ricorrendo a microsensibili di ossigeno e alla trascrittomica (analisi delle attività metaboliche dei microbi) per studiare i biofilm *in situ*, James e colleghi hanno individuato i gradienti ripidi di ossigeno e indotto risposte da stress per carenza di ossigeno nei batteri. Analizzati complessivamente, questi dati sostengono il concetto secondo cui il biofilm aiuta a mantenere basse tensioni di ossigeno localizzate nella ferita, contribuendo così alla cronicità<sup>[21]</sup>.

La presenza dei biofilm ad elevata persistenza comporta uno stato infiammatorio

cronico all'interno del letto della ferita, che porta ad elevati livelli di proteasi (metalloproteinasi di matrice ed elastasi neutrofila) e a specie reattive dell'ossigeno (ROS) che danneggiano le proteine e le molecole essenziali per la guarigione<sup>[41]</sup>. "Bloccando" il letto della ferita in uno stato infiammatorio cronico, i biofilm compromettono la normale guarigione della ferita.

Le conoscenze attuali a nostra disposizione per comprendere il modo in cui i biofilm inibiscono la guarigione delle ferite sono ancora scarse, ma i due esempi su riportati spiegano come tale guarigione venga ritardata. È inoltre lampante che i fattori sistemici contribuiscano a uno stato di avanzamento paradossale. È possibile che in alcuni casi il biofilm batterico sia il principale inibitore della guarigione delle ferite. Eppure, in altre circostanze, alcune di queste ferite guariscono se la causa originale della ferita viene risolta (ad esempio con terapia di compressione per un'ulcera venosa dell'arto inferiore o con lo scarico di un'ulcera del piede diabetico). Ovviamente, alcune ferite croniche non guariscono, nonostante un corretto trattamento del problema locale. Queste ferite potrebbero contenere una carica batterica particolarmente virulenta.

Il ciclo della ferita (Figura 1) illustra questo paradosso. La forza che spinge in senso orario è la somma della virulenza dei batteri, mentre nella figura centrale che cammina in senso antiorario è rappresentata la somma della capacità di guarigione del paziente. Più sano è il paziente (a livello locale e sistemico), più virulenti devono essere i batteri per impedire o arrestare la guarigione. Ciò implica che i pazienti "deboli" soffriranno anche per le infezioni più opportunistiche. L'attuale trattamento delle ferite croniche punta a ridurre il problema locale con modalità quali la compressione, lo scarico e la medicazione delle ferite umide. Inoltre, i problemi sistemici vengono gestiti correggendo il comportamento del paziente malnutrito o regolando i livelli di emoglobina glicosilata (HbA1c).

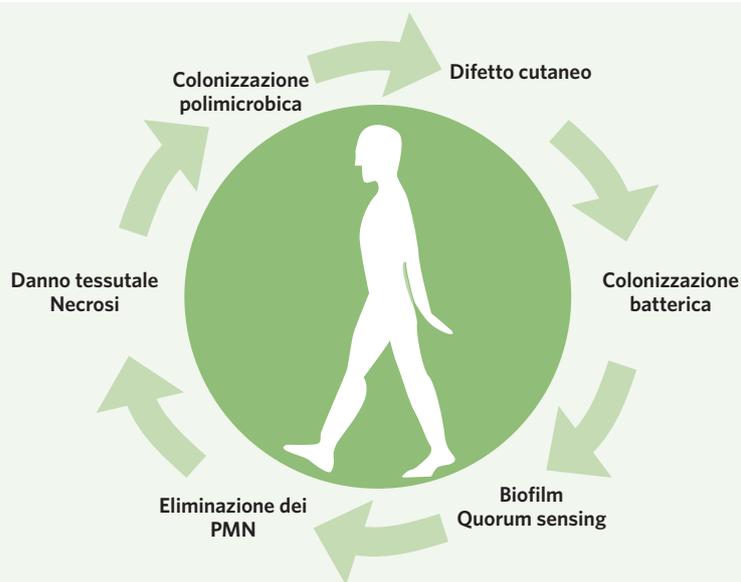
**CONCLUSIONI**

Risulta lampante da questo articolo che la diagnosi, il trattamento e la comprensione del ruolo svolto dai biofilm nella cronicità delle ferite sono ancora allo stato primordiale. Gli sforzi scientifici mirati a questa area di nicchia stanno prendendo ritmo man mano che le evidenze mostrano che il cammino intrapreso è quello giusto. Si sta ormai accettando pienamente che le ferite croniche che non guariscono contengono biofilm e che questi ultimi, in qualche modo, ritardano o impediscono la guarigione della ferita. Ricerche più specifiche che affrontino il tema della standardizzazione tra metodologie di studio, quali tecniche di campionamento ottimali, renderanno gli studi confrontabili. Sono necessari nuovi paradigmi di trattamento, ma al fine di raggiungere questo obiettivo, occorre sviluppare modelli *in vitro* che riproducano l'ambiente effettivo della ferita.

Infine, sono necessarie ulteriori collaborazioni interdisciplinari tra medici di prima linea e di base per colmare il divario tra ciò che è clinicamente pertinente per i pazienti affetti da complicanze correlate al biofilm.

**Figura 1 | Il ciclo delle ferite**

Il ciclo delle ferite (Figura 1) illustra il paradosso delle ferite croniche: perché alcuni pazienti sviluppano ferite croniche e altri no? L'individuo al centro spinge la ruota in senso antiorario e la forza del cerchio esterno rappresenta la virulenza combinata dei batteri. Pertanto, "più forte" è l'individuo, maggiore virulenza sarà necessaria perché i batteri impediscano la guarigione. Consultare il testo per una spiegazione più approfondita.



**RIFERIMENTI**

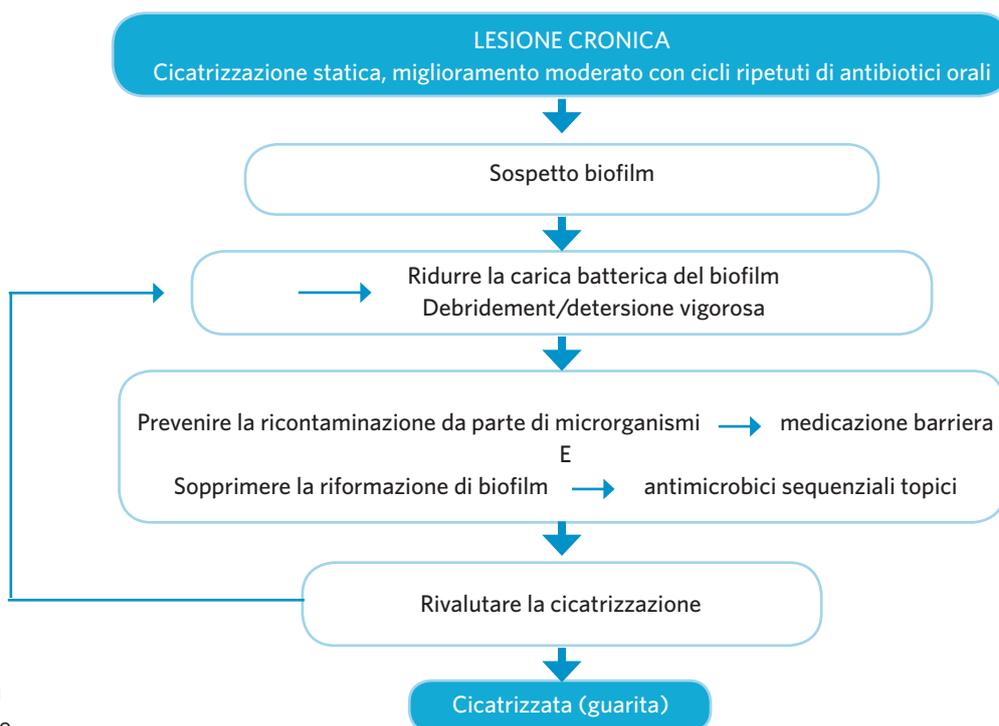
1. Gottrup F, Apelqvist J, Bjarnsholt T et al (2013). EWMA document: Antimicrobials and non-healing wounds. Evidence, controversies and suggestions. *J Wound Care* 2012; 22(5 Suppl): S1-89.
2. Metcalf DG, Bowler PG, Hurlow J. A clinical algorithm for wound biofilm identification. *J Wound Care* 2014; 23(3): 137-2.
3. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21 Suppl 1: S1-25.
4. Lipsky BA, Aragon-Sanchez J, Diggle M et al. IWGDF guidance on the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2015; 32(Suppl 1): 45-74.
5. Dowd SE, Sun Y, Secor PR et al. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol* 2008; 8(1):1.
6. James GA, Swogger E, Wolcott R et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1): 37-44.
7. Thomsen TR, Aasholm MS, Rudkjøbing VB et al. The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods. *Wound Repair Regen* 2010; 18(1): 38-49.
8. Burmølle M, Thomsen TR, Fazli et al. Biofilms in chronic infections — a matter of opportunity — monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59(3): 324-36.
9. Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K et al. Non-Random Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in Chronic Wounds. *J Clin Microbiol* 2009; 47(12): 4084-9.
10. Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Fazli M et al. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2008; 46(8): 2717-22.
11. Costerton JW, Stewart PS and Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284(5418): 1318-22.
12. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002; 184(4): 1140-54.
13. Klausen M, aes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 2003; 50(1): 61-8.
14. Bjarnsholt T, Alhede M, Eckhardt-Sorensen SR et al. The in vivo biofilm. *Trends Microbiol* 2013; 21(9): 466-74.
15. Roberts AE, Kragh KN, Bjarnsholt T, Diggle SP. The Limitations of in vitro experimentation in understanding biofilms and chronic infection. *J Mol Biol* 2015; 427(23): 3646-61.
16. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001; 147(Pt 1): 3-9
17. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009; 11(7): 1034-43
18. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* 2007; 189(22): 7945-74
19. Kolpen M, Hansen CR, Bjarnsholt T. Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax* 2010; 65(1): 57-62.
20. Kragh KN, Alhede M, Jensen PØ et al. Polymorphonuclear leukocytes restrict growth of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 2014; 82(11): 4477-86.
21. James GA, Zhao AG, Usui M et al (2016). Microsensor and transcriptomic signatures of oxygen depletion in biofilms associated with chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2016; doi: 10.1111/wrr.12401.
22. Han A, Zenilman JM, Melendez JH et al. The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2011; 19(5): 532-41.
23. Neut D, Tijdens-Creusen EJ, Bulstra SK et al. Biofilms in chronic diabetic foot ulcers — a study of 2 cases. *Acta Orthop* 2011; 82(3): 383-385.
24. Oates A, Bowling FL, Boulton AJ, et al (2014). The visualization of biofilms in chronic diabetic foot wounds using routine diagnostic microscopy methods. *J Diabetes Res* 2014, 153586.
25. Levine NS, Lindberg RB, Mason Jr AD, Pruitt Jr BA. The quantitative swab culture and smear: A quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wounds. *J Trauma* 1976; 16(2): 89-94.
26. Ennis WJ, Meneses P. Wound healing at the local level: the stunned wound. *Ostomy Wound Manage* 2000; 46(1A Suppl): 39S-48S.
27. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 1995; 15(3): 169-75.
28. Lenselink E, Andriessen A. A cohort study on the efficacy of a polyhexanide-containing biocellulose dressing in the treatment of biofilms in wounds. *J Wound Care* 2011; 20(11): 534, 536-34, 539.
29. Hurlow J, Bowler PG. Potential implications of biofilm in chronic wounds: a case series. *J Wound Care* 2012; 21(3): 109-10, 112, 114.
30. Phillips P L, Fletcher J, Shultz G S. *Biofilms Made Easy*. Wounds International 2010; 1(3): 1-6.
31. Hurlow J, Bowler PG. Clinical experience with wound biofilm and management: a case series. *Ostomy Wound Manage* 2009; 55(4): 38-49.
32. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003; 112(10): 1466-77.
33. Gjødsbølk K, Christensen JJ, Karlsmark T et al. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 2006; 3(3):225-31.
34. Jensen PØ, Bjarnsholt T, Phipps R et al. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2007; 153(Pt 5): 1329-38.
35. Wolcott RD, Rhoads DD, Dowd S E. Biofilms and chronic wound inflammation. *J Wound Care* 2008; 17(8): 333-41.
36. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1): 2-10.
37. Marano RJ, Wallace HJ, Wijeratne D et al. Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses in vitro. *Scientific Rep* 2015; 17;5: 13296.
38. de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* 1994; 43(11): 1131-8.
39. Lawrence JR, Swerhone GD, Kuhlicke U, Neu TR. In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Can J Microbiol* 2007; 53(3): 450-8.
40. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 2002; 109(3): 317-325.
41. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1996; 4(4):411-20.

# La gestione del biofilm nella pratica

La prevenzione e la gestione del biofilm nelle ferite croniche sta diventando rapidamente l'obiettivo principale della cura delle ferite, poiché è ormai riconosciuto che la presenza del biofilm è una delle cause principali della ritardata guarigione delle ferite<sup>[1-4]</sup>.

La Figura 1 illustra i principi di base della gestione delle ferite nei casi in cui le ferite hanno raggiunto uno stallo in fase di guarigione, nonostante un ripetuto trattamento antibiotico, facendo sospettare la presenza del biofilm. Questo articolo indaga sul momento in cui iniziare il trattamento di un sospetto biofilm, su varie strategie per la prevenzione e il trattamento, sul modo in cui queste strategie possono essere combinate per un risultato ottimale e sui principi per monitorare tale risultato.

**Figura 1 |**  
Principi di gestione del biofilm nelle lesioni<sup>[5]</sup>



**Jacqui Fletcher**,  
consulente infermieristica  
indipendente, Inghilterra, e  
**Randall D. Wolcott**,  
presidente  
dell'Associazione  
Professionale e del  
Laboratorio di Ricerca e  
Analisi dei South Plains,  
Texas (USA), **Isabelle  
Fromantin**, esperta in  
lesioni e cicatrizzazione,  
Istituto Curie, Francia

Se da un lato le infezioni acute tendono a produrre i classici segni e sintomi dell'infezione di una ferita, quali infiammazione, dolore, bruciore, rossore e gonfiore<sup>[6]</sup>, i microbi che crescono in forma di biofilm producono un pattern chiaramente differente, spesso riconosciuto come infezione cronica<sup>[7]</sup>.

In caso di ferite croniche infette, sono necessarie strategie di trattamento sistemiche, mentre in caso di ferite non infette in cui la presenza di biofilm impedisce la guarigione, è possibile adottare strategie per spezzare il biofilm. In alternativa, è possibile tentare di evitare la formazione iniziale del biofilm nei pazienti o nelle ferite ritenuti ad alto rischio<sup>[8]</sup>.

È possibile ricorrere a strategie mirate per migliorare la guarigione nei casi in cui il biofilm microbico sia una componente causale delle ferite croniche, rispetto a una colonizzazione non patogena; ad esempio:

- Uso precoce di antibiotici sistemici mirati a debellare i batteri planctonici
- Strategie uniche per rendere i microbi più suscettibili agli antimicrobici per l'eliminazione da parte del sistema immunitario ospite
- Terapie mirate a prevenire una componente infiammatoria prolungata della guarigione della ferita<sup>[9]</sup>.

Tenendo a mente quanto appena menzionato, è importante sviluppare strategie innovative per prevenire e trattare il biofilm<sup>[3]</sup> che forniscano:

- Azione preventiva, che interferisca con l'adesione microbica o con i processi innescati nella maturazione o rimozione del biofilm e/o eliminazione del biofilm maturo
- Azione per contrastare il biofilm esistente, tramite rimozione o eliminazione del biofilm e prevenzione di una nuova generazione.

### QUANDO TRATTARE UN BIOFILM

L'esperienza nel trattamento delle ferite croniche, in particolare le strategie per il trattamento delle ferite infette e per il rilevamento del biofilm, è essenziale per garantire che i pazienti ricevano le migliori cure. Il punteggio WAR (Wounds at Risk, ferite a rischio) è stato concepito a sostegno della presa di decisioni nell'uso di antimicrobici (nello specifico, di poliesanide) in casi in cui in precedenza non vi erano metodi per prevedere accuratamente il rischio di infezione delle ferite croniche. Il sistema di punteggio prende in considerazione la quantità e la virulenza della carica microbica patogeno di una ferita e la capacità immunitaria del paziente, ma non fornisce aiuto per il rilevamento del biofilm o suggerimenti per la rimozione di detriti. L'esistenza di diagnosi a sostegno del rilevamento del biofilm potrebbero rendere più utile il punteggio WAR<sup>[10]</sup>.

L'effettiva identificazione del biofilm richiede tecniche di laboratorio sofisticate, quali l'osservazione al microscopio confocale a scansione laser (CLSM), al microscopio elettronico a scansione (SEM) o tecniche molecolari per la definizione<sup>[11]</sup>. Le procedure microbiologiche per coltura standard rilevano solo i batteri planctonici, per cui occorre ricorrere a un processo diverso per rilevare i batteri nei biofilm; in genere, i campioni vengono inizialmente trattati per debellare tutti i batteri planctonici, quindi il biofilm viene fisicamente disperso con energia ultrasonica e coltivato su piastre di agar nutrienti per determinare l'estensione della presenza di biofilm<sup>[5]</sup>.

L'identificazione del biofilm è difficile anche nella pratica clinica, in quanto sono disponibili poche linee guida per facilitarne il rilevamento. Keast et al (2014)<sup>[5]</sup> propongono quattro fattori principali che potrebbero aumentare il sospetto della presenza di biofilm, ovvero:

1. Fallimento degli antibiotici
2. Infezione di durata >30 giorni
3. Tessuto di granulazione friabile
4. Materiale gelatinoso facilmente rimosso dalla superficie della ferita che si rigenera rapidamente.

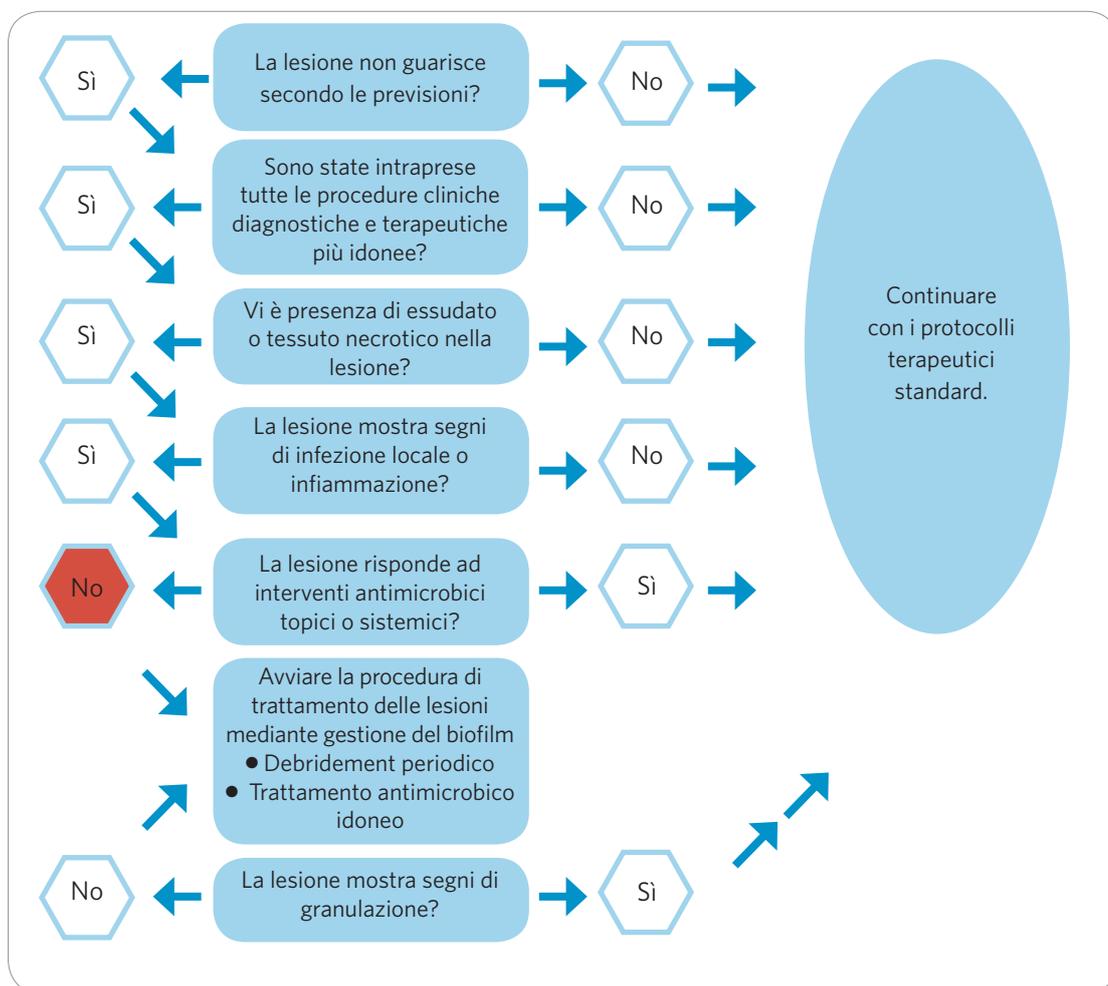
Un recente studio che ha raccolto dati attuali relativi all'aspetto, al comportamento e agli indicatori clinici associati al biofilm ha suggerito che a volte ci possono essere segni visibili di presenza di biofilm nel letto della ferita. È stata identificata anche una serie di segni clinici "non visibili": segni di infezione locale, fallimento di agenti antimicrobici, risultati negativi di tamponi o intrattabilità della ferita nonostante tutti gli altri fattori siano stati affrontati. Gli autori hanno elaborato un algoritmo contenente segni visibili e non visibili che potrebbe facilitare una gestione più efficace della ferita basata su biofilm<sup>[12]</sup>.

Tuttavia, ad oggi non è stato provato che il biofilm possa comparire sotto forma di uno "strato gelatinoso" sulla superficie della ferita, dunque Percival et al (2015)<sup>[13]</sup> sostengono che, in assenza di tale evidenza scientifica, la manifestazione di uno strato traslucido gelatinoso può essere un marker visivo sommario e spesso fuorviante e propongono

invece un approccio all'identificazione del biofilm simile a quella di Keast et al<sup>[5]</sup>, basato sulla gerarchia di domande sotto riportata. Dove la risposta è "No", si consiglia di continuare con le terapie standard, dove la risposta è "Sì", si deve passare alla domanda successiva. Se la risposta alla domanda n° 5 è "No", si consiglia di avviare una procedura di trattamento delle lesioni mediante gestione del biofilm (Figura 2)<sup>[13]</sup>.

1. La lesione non guarisce secondo le previsioni?
2. Sono state intraprese tutte le procedure cliniche diagnostiche e terapeutiche più idonee?
3. Vi è presenza di essudato o tessuto necrotico nella lesione?
4. La lesione mostra segni di infezione locale o infiammazione?
5. La lesione risponde ad interventi antimicrobici topici o sistemici?

**Figura 2 |**  
**Algoritmo per**  
**rilevare biofilm**  
**sospetto<sup>[13]</sup>**



**COME TRATTARE UN BIOFILM**

*Strategie per la prevenzione e il trattamento del biofilm*

Una volta stabilita la probabile presenza di biofilm, è opportuno decidere un'ideale strategia di trattamento tenendo conto del fatto che esistono vari stadi di formazione del biofilm stesso. Un approccio proattivo al trattamento riconosce che non esiste una soluzione costituita da un'unica fase per il trattamento del biofilm, ma che lo scopo è ridurre la carica batterica e prevenirne la ricostituzione<sup>[14]</sup>.

Wolcott (2015)<sup>[15]</sup> afferma che: "La gestione delle lesioni mediante rimozione del biofilm si fonda sull'utilizzo di più strategie di trattamento contemporaneamente che comprendano la somministrazione di antibiotici, agenti anti-biofilm, antimicrobici selettivi e frequente debridement." Inoltre, Hurlow et al (2015)<sup>[16]</sup> avvertono che, sebbene le attività mirate contro il biofilm siano importantissime, occorre anche potenziare la risposta dell'ospite,

Tabella 1: Potenziali agenti anti-biofilm		
Meccanismo d'azione	Esempi	Altri dati
<b>Interferenza con l'attacco del biofilm alla superficie</b>	Lactoferrina Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) Xilitolo Miele	La lactoferrina, in base ad un meccanismo di risposta umano innato, si lega alle pareti cellulari causando destabilizzazione, fuoriuscite ed infine morte cellulare <sup>[17]</sup> . L'EDTA è stato usato come agente permeante e sensibilizzante per patologie da biofilm in odontoiatria e in altri campi <sup>[18]</sup> . Inoltre, è stato dimostrato che anche lo xilitolo (un dolcificante artificiale) e il miele sono in grado di bloccare l'attaccamento <sup>[17]</sup>
<b>Interferenza con il "quorum sensing", un meccanismo di segnalazione chimica o di comunicazione tra le cellule all'interno del biofilm</b>	Farnesolo Iberina Ajoene Miele di Manuka	Vari agenti bloccano o interferiscono con il quorum sensing, tra cui: <ul style="list-style-type: none"> <li>• il farnesolo,</li> <li>• l'iberina (ricavata dal rafano),</li> <li>• l'ajoene (ricavato dall'aglio).</li> </ul> Il miele di Manuka sottoregola 3 dei 4 geni responsabili del processo di "quorum sensing" <sup>[17]</sup>
<b>rottura della sostanza polimerica extracellulare (EPS), una matrice protettiva secreta dal biofilm, che lo circonda.</b>	EDTA	L'EDTA supporta e potenzia gli antimicrobici topici rompendo l'EPS in cui sono incapsulati i microrganismi <sup>[18]</sup> . Esistono anche prodotti registrati che vantano, tra le varie azioni, di poter rompere l'EPS <sup>[19]</sup>
<b>Falsi metaboliti</b>	Gallio, xilitolo	È stato dimostrato che basse dosi di gallio e di xilitolo interferiscono con la formazione del biofilm <sup>[20]</sup>
<b>Rottura del biofilm esistente</b>	Betaina (combinazione di PHMB e betaina)	Le soluzioni attuali preferite per la rottura del biofilm contengono tensioattivi, come la betaina, che abbassano la tensione superficiale del mezzo in cui sono disciolte, permettendo di aspirare sporcizia e detriti e di sospenderli nella soluzione <sup>[21,22]</sup>

considerando con molta attenzione tutte le cause locali e sottostanti della ritardata cicatrizzazione della lesione.

**Potenziali agenti anti-biofilm**

In pratica, la rottura fisica del biofilm mediante debridement (strofinamento vigoroso con garza) e/o detersione, seguiti dalla somministrazione di agenti antimicrobici (come il PHMB o l'argento) per prevenirne la riformazione, è attualmente l'opzione anti-biofilm primaria disponibile in ambiente clinico, come si dirà più approfonditamente nel prosieguo<sup>[4]</sup>. Tuttavia, sono stati studiati vari potenziali agenti anti-biofilm che interferiscono con elementi della sua formazione o supportano e potenziano l'effetto degli antimicrobici; essi sono riassunti nella Tabella 1, suddivisi a seconda del meccanismo d'azione. Qualora si scelga uno di questi agenti, la scelta dovrebbe basarsi su fattori che comprendono la capacità biocida e la lunghezza dell'attività dell'agente attivo e la capacità del carrier della medicazione di gestire i sintomi che si presentano, come i maggiori livelli di essudato.

**L'importanza della preparazione del letto della lesione**

La preparazione del letto della lesione, che comprende detersione e debridement, sono principi importanti della gestione delle lesioni, poiché queste devono essere pulite per guarire<sup>[23]</sup>. Uno standard di gestione delle lesioni ampiamente accettato è il "TIME" (Tissue, Infection/Inflammation, Moisture, Edge of wound), che si basa sui concetti di tessuto, infezione/infiammazione, umidità e bordi della lesione. Negli ultimi 10 anni ci sono stati importanti sviluppi in questo campo: si è compreso il significato della presenza del biofilm (e della necessità di una semplice diagnosi), dell'importanza del riconoscimento clinico dell'infezione e del valore di un ripetitivo e continuo debridement e detersione della lesione, che è di fondamentale importanza<sup>[11]</sup>.

Dove in una lesione siano presenti essudato o necrosi, questo tessuto non vitale deve essere rimosso perché può sostenere l'attaccamento e lo sviluppo del biofilm<sup>[24]</sup>. La velocità di rimozione del tessuto deve basarsi sulla capacità del paziente di sottoporsi alla procedura, dall'abilità e dalla competenza dell'operatore sanitario e dalla sicurezza dell'ambiente in cui viene eseguita la tecnica<sup>[25]</sup>. Recentemente è stata operata una distinzione tra rimozione dell'essudato (in inglese, "slough")<sup>[24]</sup> e rimozione del tessuto necrotico (il cosiddetto "debridement"). Per garantire l'efficacia dell'operazione,

si è proposto di non considerare nessuna di queste terapie una soluzione in sè, bensì di continuare ad eseguire entrambe le procedure consigliate, pulizia vigorosa per sfregamento (debridement) e rimozione dell'essudato (desloughing).

Le tecniche di debridement disponibili sono più d'una e vanno da quella chirurgica (che viene eseguita in sala operatoria fino a raggiungere il tessuto sanguinante sano) a quella autolitica (uso di medicazioni per facilitare la rimozione del tessuto necrotico<sup>[23-24]</sup>) e ai tamponi e panni per lo sbrigliamento o debridement<sup>[26,27]</sup>. Le attuali soluzioni per la detersione che vengono scelte più spesso per aiutare nella rottura del biofilm contengono tensioattivi, che abbassano la tensione sulla superficie del mezzo in cui sono disciolti rendendo più facile il sollevamento della sporcizia o dei detriti e la loro sospensione in una soluzione per evitare la ricontaminazione della lesione<sup>[21,22]</sup>. Le soluzioni possono essere direttamente applicate sulla lesione, usate per impacchi con garza o unite ad una terapia a pressione negativa per instillazione per ferite<sup>[28]</sup>.

Secondo quanto riportato in letteratura, l'associazione di poliesanide e betaina, un tensioattivo, è stata definita efficace per uno sbrigliamento autolitico della lesione. In uno studio controllato randomizzato condotto in sei centri italiani (dal giugno 2010 al dicembre 2013), si è osservato che la soluzione promuoveva la preparazione del letto della lesione, riduceva i segni di infiammazione e accelerava la cicatrizzazione delle ulcere vascolari degli arti inferiori, oltre ad avere duraturo effetto barriera. In più, rispetto alla normale soluzione fisiologica, questa soluzione si è rivelata superiore a livello statisticamente significativo ( $p < 0.001$ ) in termini sia di miglioramento della ferita che di riduzione dei segni infiammatori<sup>[23]</sup>.

#### *Uso di antimicrobici dopo sbrigliamento per prevenire la riformazione*

Dopo aver ben pulito la ferita e rimosso tutto il tessuto non vitale che è stato possibile rimuovere in base alle esigenze del paziente, si consiglia di usare un prodotto antimicrobico per prevenire la riformazione del biofilm (Figura 1)<sup>[5]</sup>; ad esempio, cerotti anti-biofilm contenenti agenti antimicrobici come il PHMB, l'argento e un tensioattivo<sup>[29]</sup>. Vari agenti antimicrobici attivi sono stati associati al trattamento del biofilm:

- Acido acetico<sup>30]</sup>
- Miele<sup>[3,31]</sup>
- Iodio<sup>[18,32-34]</sup>
- PHMB<sup>[18,35]</sup>
- Argento<sup>[18,33-36]</sup>.

Una cosa importante è che questi agenti devono essere usati dopo aver rotto fisicamente il biofilm con la detersione (ossia con una soluzione contenente un tensioattivo unito ad un antimicrobico, come il PHMB con betaina) e sbrigliamento, al fine di garantire l'efficacia antimicrobica (Figura 1). Inoltre, altri prodotti non contenenti agenti antimicrobici attivi hanno dimostrato di avere un'attività anti-biofilm, come i prodotti che funzionano legando in modo irreversibile i batteri a cerotti rivestiti con dialchilcarbamoilcloruro (DACC)<sup>[37]</sup>, con i quali i microrganismi vengono rimossi insieme alla medicazione e sulla lesione non resta alcun detrito cellulare<sup>[38]</sup>.

#### **COME MONITORARE IL SUCCESSO DEL TRATTAMENTO**

Non è possibile decretare con certezza assoluta la scomparsa del biofilm perché non esistono segni categorici e test per la sua identificazione. Per questo motivo il medico deve osservare il progresso della cicatrizzazione come indicatore di successo e tenere conto anche del calo dei valori di altri parametri come i livelli e la produzione di essudato<sup>[14]</sup>. In particolare, per misurare l'esito del trattamento di una lesione con mediante gestione del biofilm, si dovrebbero esaminare i fattori primari che hanno condotto al sospetto iniziale di presenza di biofilm:

- La lesione non si sta cicatrizzando come atteso nonostante le appropriate terapie somministrate?
- La lesione sta mostrando segni e sintomi di infezione che non si risolvono con gli idonei agenti antimicrobici?
- C'è del materiale gelatinoso sulla superficie della lesione che non se ne va?

Se questi aspetti sono stati risolti, allora si può presumere che il trattamento abbia avuto successo.

Qualsiasi prodotto scelto dovrebbe essere usato per un periodo di tempo appropriati e continuato per almeno 7-10 giorni prima di prendere una decisione sull'eventualità di continuarne o smetterne l'utilizzo. Un recente consenso ha consigliato di utilizzare una "sfida di 2 settimane" per determinare l'efficacia di un antimicrobico (specificamente medicazioni a base di argento). Dopo 2 settimane si dovrebbe poter dire se la lesione è migliorata e se ci sono segni di continuazione dell'infezione<sup>[5]</sup>.

Si è suggerito che una lesione con sospetto biofilm dovrebbe essere pulita vigorosamente con debridement e detersa regolarmente perché è difficile rimuovere tutto il biofilm, che può sempre potenzialmente ricrescere e formare un biofilm maturo nell'arco di pochi giorni. Se una lesione non mostra progressi in seguito a regolare trattamento, allora potrebbe essere necessario un approccio più aggressivo al biofilm, con consultazione di uno specialista, secondo necessità<sup>[39]</sup>.

### CONCLUSIONE

Gestire in modo adeguato il biofilm è un compito piuttosto complesso, che però può essere affrontato con varie soluzioni, gel e medicazioni, come mostrato in letteratura e nell'esperienza clinica. Le fasi fondamentali della prevenzione iniziale (con agenti anti-biofilm), la ossia la rimozione (pulire, rimuovere l'essudato, detergere vigorosamente con vari mezzi) e la prevenzione della riformazione (uso di un agente antimicrobico), costituiscono l'inquadramento generale per il trattamento del biofilm, oltre il quale occorre considerare una miriade di aspetti relativi al paziente, all'ambiente e ai parametri clinici per individuare una soluzione personalizzata per ciascun paziente<sup>[40]</sup>.

L'associazione di agenti anti-biofilm e antimicrobici per la gestione del biofilm può essere fatta nell'ambito della stessa medicazione oppure le loro azioni possono essere sinergizzate al cambio di medicazione (ad esempio, utilizzando la soluzione/gel Prontosan e Calgitrol Ag). Conoscere l'evidenza e tenersi aggiornati può non essere facile, ma è una parte cruciale del lavoro di ogni medico se vuole erogare cure ottimali e mirare sempre ad una buona gestione del biofilm. È anche importante trattare il paziente secondo una visione olistica ed affrontare tutti i suoi problemi sistemici, psicologici o psicosociali sottostanti per individuare e stabilire la terapia di riferimento o "gold standard".

### RIFERIMENTI

1. James GA, Swogger E, Wolcott R et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1): 37-44.
2. Percival S, McCarty S and Lipsky B. Biofilms and wounds: *An overview of the evidence Advances in Wound Care* 2015; 4(7): 373-381.
3. Cooper R, Bjarnsholt T and Alhede M. Biofilms in wounds: A review of present knowledge. *Journal of Wound Care* 2014 23(11): 570-582.
4. Thomson CH. Biofilms: do they affect wound healing? *Int W J* 2011; Feb 8(1):63-7. doi: 10.1111/j.1742-481X.2010.00749.x. Epub 2010 Dec.
5. Keast D, Swanson T, Carville K, Fletcher J, Schultz G and Black J. Top Ten Tips: Understanding and managing wound biofilm. *Wound International* 2014; 5(20): 1-4.
6. Swanson T, Grothier L, Schultz G. *Wound Infection Made Easy*. Wounds International 2014. Available from: [www.woundsinternational.com](http://www.woundsinternational.com).
7. Kim M, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Sasakawa C. Bacterial interactions with the host epithelium. *Cell Host Microbe* 2010; 8(1):20-35.
8. Zhoa GE, Usui ML, Lippmann SI, et al. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. *Adv Wound Care* (New Rochelle) 2013; Sep 2(7): 389-399.
9. Wolcott. The role of Biofilm: Are we hitting the Right target? *Plast Reconstr Surg* 2011; January Suppl 127: 28S-35S).
10. Leaper D. Practice development – Innovations. Expert commentary. *Wounds International* 2010; 3(1): 19
11. Leaper DJ, Schultz G, Carville K, Fletcher J, Swanson T and Drake R. Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years? *Int W J* 2010; 9(Suppl 2): 1-19.

12. Metcalf D, Bowler P, Hurlow J. *Development of an algorithm for wound biofilm identification*. Poster presented at EWMA 2013. Available at: [http://old.ewma.org/fileadmin/user\\_upload/EWMA/P314.pdf](http://old.ewma.org/fileadmin/user_upload/EWMA/P314.pdf)
13. Percival SL, Vuotto C, Donelli G, Lipsky BA. Biofilms and Wounds: An identification algorithm and potential treatment options. *Advances in Wound Care* 2015; 4(7): 389-397.
14. Phillips PL, Wolcott RD, Fletcher J, et al. *Biofilms Made Easy*. Wounds International 2010; 1(3): S1-S6.
15. Wolcott R. Economic aspects of biofilm based wound care in diabetic foot ulcers. *Journal of Wound Care* 2015; 24(5): 189-194.
16. Hurlow J, Couch K, Laforet K, Bolton L, Metcalf D and Bowler P. Clinical Biofilms: A Challenging Frontier in Wound Care. *Advances in Wound Care* 2015; 4(5): 295-301.
17. Cooper R, Jenkins L and Hooper S. Inhibition of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by medihoney in vitro. *J Wound Care* 2014; 23(3): 93-104.
18. Finnegan S and Percival SL. EDTA: An antimicrobial and antibiofilm agent for use in wound care. *Advances in Wound Care* 2015; 4(7): 415-421.
19. Wolcott R. Disrupting the biofilm matrix improves wound outcomes. *J Wound Care* 2015; 24(8): 366-371.
20. Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL. Biofilms in wounds: management strategies. *J Wound Care* 2008; Nov 17(11):50-8.
21. Bradbury S and Fletcher J. *Prontosan Made Easy*. Wounds International 2011; 2(2).
22. *JWC Wound Care Handbook 2016-2017*. London 2016. MA Healthcare Limited.
23. Bellingeri A et al. Effect of a wound cleansing solution on wound bedpreparation and inflammation in chronic Wounds: a single-blind RCT. *J Wound Care* 2016; 25: 3, 160-168.
24. Percival and Suliman. Slough and biofilm: removal of barriers to wound healing by desloughing. *Journal of Wound Care* 2015; 24(11): 498-510.
25. Vowden K and Vowden P. *Debridement Made Easy*. Wounds UK 2011; 7(4).
26. *Debrisoft: Making the case*. Wounds UK 2015. London.
27. Downe A. How wound cleansing and debriding aids management and healing. *Journal of Community Nursing* 2014; 28(4): 33-37.
28. Rycerz A, Vowden K, Warner V, Jørgensen BF. *VAC Ultra NPWT System Made Easy*. Wounds International 2012; 3(3).
29. Metcalf DG, Parsons D, Bowler PG. Clinical safety and effectiveness evaluation of a new antimicrobial wound dressing designed to manage exudate, infection and biofilm. *IWJ* 2016; Mar 1.
30. Bjarnsholt T, Alhede M, Østrup Jensen P, Nielsen AK, Krogh Johansen H, Homøe P, Høiby N, Givskov M and Kirketerp-Møller K. Antibiofilm properties of acetic acid. *Advances in Wound Care* 2015; 4(7): 363-372.
31. Halstead FD, Webber MA, Rauf M, Burt R, Dryden M, and Oppenheim BA. In vitro activity of an engineered honey, medical grade honeys and antimicrobial wound dressings against biofilm producing clinical bacterial isolates. *Journal of Wound Care* 2016; 25(2): 93-102.
32. Hoekstra MJ, Westgate SJ, Mueller S. Povidone-iodine ointment demonstrates in vitro efficacy against biofilm formation. *International Wound Journal* 2016; doi: 10.1111/iwj.12578. [Epub ahead of print]
33. Percival SL, Finnegan S, Donelli G, Vuotto C, Rimmer S, Lipsky BA (2016) Antiseptics for treating infected wounds: Efficacy on biofilms and effect of pH. *Crit Rev Microbiol* 2016; 42(2): 293-309.
34. Thorn RM, Austin AJ, Greenman J, Wilkins JP, Davis PJ (2009). In vitro comparison of antimicrobial activity of iodine and silver dressings against biofilms. *Journal of Wound Care* 2009; 18(8): 343-6.
35. Lenselink E, Andriessen A. A cohort study on the efficacy of a polyhexanide-containing biocellulose dressing in the treatment of biofilms in wounds. *Journal of Wound Care* 2011; 20(11): 534-539.
36. Percival S and McCarty S. Silver and alginates: Role in wound healing and biofilm control. *Advances in Wound Care* 2015; 4(7): 407-414.
37. Cooper R and Jenkins L. Binding of two bacterial biofilms to dialkyl carbamoyl chloride (DACC) - coated dressings in vitro. *Journal of Wound Care* 2016; 25(2): 6-82.
38. Butcher M. Catch or kill. How DACC technology redefines antimicrobial management. *Br J Comm Nurs* 2011 (Suppl).
39. Wolcott RD, Rhoads DD. A study of biofilm based wound management in subjects with critical limb ischaemia. *J Wound Care* 2008; 17(4): 145-55.
40. *International consensus*. Appropriate use of silver dressings in wounds. An expert working group consensus. London: Wounds International, 2012. Available to download from: [www.woundsinternational.com](http://www.woundsinternational.com).

# La ricerca sul biofilm: colmare le lacune nella conoscenza delle lesioni croniche

L'ipotesi iniziale che i batteri nelle strutture dei biofilm fossero un fattore importante che contribuiva ad alimentare le infezioni croniche refrattarie ha avuto origine negli studi condotti nei primi anni ottanta del secolo scorso su malattie come l'endocardite, l'osteomielite, la periodontite e la fibrosi cistica<sup>[1]</sup>. Dopo questi primi studi grosse pubblicazioni relative a ricerche cliniche e di laboratorio hanno confermato che i biofilm batterici sono un fattore critico in molte patologie caratterizzate da infezioni batteriche persistenti che tollerano il sistema immunitario del paziente (anticorpi e cellule infiammatorie fagocitarie) e i regimi a base di antibiotici orali (o topici, e.v.) di durata standard<sup>[2-4]</sup>.

Questo importante concetto è stato allargato in un articolo che è diventato un punto di riferimento pubblicato su *Science*<sup>[5]</sup> nel 1999. Lo studio integrava il concetto di infiammazione cronica stimolata da biofilm capace di condurre ad elevate concentrazioni di proteasi e a ROS (specie reattive dell'ossigeno, Reactive Oxygen Species) che danneggiavano il tessuto circostante e che potevano condurre fino alla distruzione del tessuto come nella parodontite o alla riduzione della funzionalità di un organo mediante formazione di cicatrici (fibrosi), come nella fibrosi cistica. Riconoscendo che le lesioni cutanee croniche hanno molte delle stesse manifestazioni cliniche della maggior parte delle altre malattie caratterizzate da infiammazione cronica associate con biofilm batterici, James e colleghi (2008<sup>[6]</sup>) anno pubblicato il rapporto iniziale sulle strutture del biofilm nelle lesioni croniche. Mediante tecniche di microscopia ottica e a scansione elettronica per esaminare campioni prelevati da 66 soggetti, i ricercatori hanno trovato strutture di biofilm presenti in un'alta percentuale (~60%) delle 50 biopsie di lesioni croniche rispetto solo ad 1 su 16 (6%) campioni di lesioni acute. Questo studio ha contribuito ad attirare l'attenzione sui possibili ruoli critici che i biofilm batterici potrebbero avere nello sviluppo e nel mantenimento delle lesioni cutanee croniche.

## RAPPORTO TRA BIOFILM E FISIOPATOLOGIA DELLA LESIONE CRONICA

Indipendentemente dalla ricerca sui biofilm batterici nelle lesioni croniche, molti laboratori hanno studiato attivamente la differenza molecolare tra le lesioni in via di cicatrizzazione e quelle croniche. Una delle prime differenze molecolari ad essere identificata è stato il livello sostanzialmente più alto di due principali famiglie di proteasi nelle lesioni croniche: le metalloproteasi di matrice (MMP) e l'elastasi neutrofila (NE), che fa parte della superfamiglia delle proteasi serine<sup>[7-13]</sup>. Vari effetti dannosi sulla cicatrizzazione sono stati attribuiti agli alti livelli di attività delle proteasi nelle lesioni croniche, tra cui:

- distruzione di importanti proteine della matrice extracellulare (ECM), tra cui la proteina di adesione multi-dominio, la fibronectina<sup>[7,14]</sup>, che è importante nella migrazione cellulare epiteliale;
- distruzione di importanti fattori di crescita, tra cui il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)<sup>[15]</sup>;
- degradazione delle proteine dei recettori delle membrane chiave per i fattori di crescita<sup>[16]</sup>.

Analogamente, nei campioni di fluidi prelevati da lesioni croniche o da biopsie sono stati osservati anche aumenti delle citochine proinfiammatorie, tra cui il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF $\alpha$ ) e l'interleuchina-1 alfa (IL1 $\alpha$ ) rispetto alle lesioni in via di guarigione.

<sup>(17)</sup> Tutti questi dati hanno indicato l'esistenza di un percorso patologico comune, in cui lo sviluppo di biofilm batterici nelle lesioni acute stimola l'infiammazione cronica, che è indicata da livelli persistentemente alti di citochine proinfiammatorie (TNF $\alpha$  e di

### Greg Schultz,

Istituto di Ricerca sulle Lesioni, Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Università della Florida,

### Thomas Bjarnsholt,

Costerton Biofilm Center, Dipartimento di Immunologia e Microbiologia, Facoltà di Salute e Scienze Mediche, Università di Copenhagen e Dipartimento di Microbiologia Clinica, Rigshospitalet, Danimarca,

### Klaus Kirketerp-Møller,

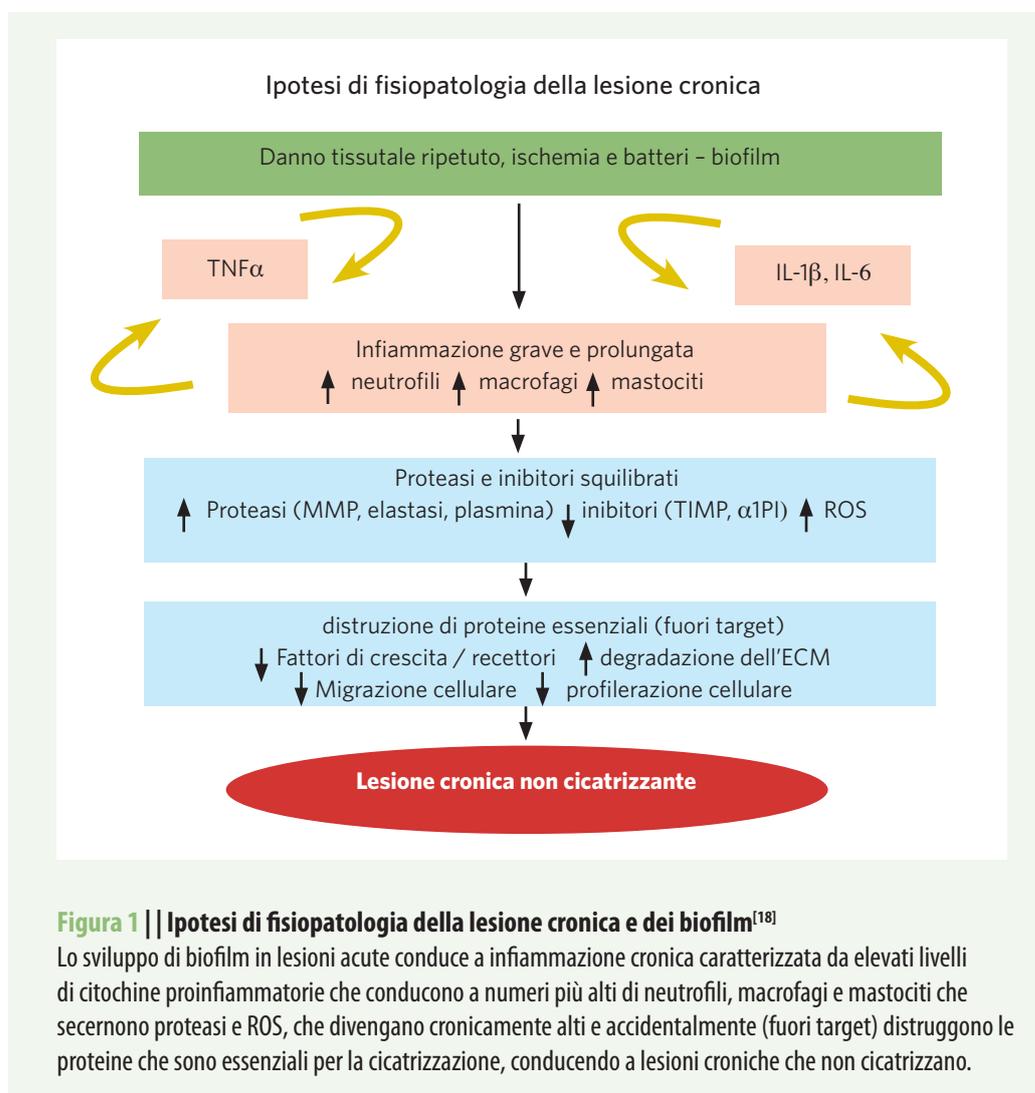
Centro Guarigione Ferite di Copenhagen, Ospedale Universitario di Bispebjerg, Copenhagen, Danimarca,

### Rose Cooper,

Cardiff School of Health Sciences, Cardiff Metropolitan University, Cardiff, Regno Unito

IL1 $\alpha$ ). Queste citochine proinfiammatorie attirano per azione chemiotattica le cellule infiammatorie (neutrofili, macrofagi e mastociti) nel letto della lesione dove secernono proteasi (MMP e NE) e rilasciano ROS. I livelli cronicamente alti di proteasi e ROS infine hanno effetti che vanno oltre il loro obiettivo e che danneggiano o degradano le proteine che sono essenziali per la guarigione, convertendo una lesione in via di cicatrizzazione in una lesione cronica in stallo (Figura 1)<sup>[18]</sup>.

Inoltre, Bjarnsholt e colleghi<sup>[19]</sup> hanno ipotizzato che la presenza di *Pseudomonas aeruginosa* nei biofilm produca una sorta di “scudo” che protegge dall’attività fagocitica dei leucociti (polimorfo) nucleati (PMN) sintetizzando e secernendo fattori di virulenza, tra cui un ramnolipide che elimina in modo molto efficace i PMN (mediante lisi) e l’enzima catalasi che degrada il perossido di idrogeno, un importante ROS prodotto dai PMN, in prodotti non tossici a base di ossigeno e acqua.



**UNA LACUNA NELLE CONOSCENZE FONDAMENTALI**

**Rilevazione e misurazione dei batteri nel biofilm delle lesioni**

In base all’apparente correlazione tra la fisiopatologia delle lesioni croniche e la presenza di biofilm in un’alta percentuale di lesioni croniche, la rilevazione e la localizzazione di biofilm nei letti delle lesioni croniche fornisce informazioni cliniche utili, soprattutto per valutare ed orientare l’efficacia dello sbrigliamento. Inoltre, valutare lo stato del biofilm di una lesione cronica potrebbe potenzialmente indicare quando il letto di una lesione

cronica è stato preparato adeguatamente per poter rispondere a terapie avanzate come quelle a base di fattori di crescita, medicazioni avanzate a matrice, terapie a base di cellule o innesti cutanei<sup>[20,21]</sup>. Tuttavia, la maggior parte dei laboratori di microbiologia e patologia clinica utilizzano tecniche convenzionali (scansione, sequenziamento e campionatura) che non sono in grado di distinguere tra i batteri esistenti a livello di plankton o nel biofilm<sup>[22]</sup>. Così, i medici clinici dovrebbero presumere che i batteri rilevati siano biofilm e trattarli di conseguenza.

Inoltre, vari studi hanno osservato che i metodi di coltura convenzionalmente usati dai laboratori di microbiologia clinica per valutare la carica batterica nei campioni di lesione tendono a rilevare facilmente gli organismi coltivati in colture planctoniche e non rilevano molte specie batteriche, soprattutto i batteri anaerobici, ma anche specie fungine e lieviti<sup>[23-26]</sup>. Ad esempio, Dowd e colleghi (2008)<sup>[23]</sup> hanno osservato che le tecniche colturali standard identificavano solo l'1% di tutti i microrganismi presenti nei campioni di 30 lesioni croniche, soprattutto gli anaerobi obbligati stretti.

Thomsen e colleghi (2010)<sup>[26]</sup> hanno ottenuto risultati simili utilizzando tecniche di identificazione basate sul DNA e l'ibridazione *in situ* fluorescente per identificare specie batteriche in 14 ulcere sottoposte ad operazioni di innesto cutaneo. I ricercatori hanno trovato differenze sostanziali tra i risultati ottenuti con metodi colturali standard e i metodi basati sulla biologia molecolare.

Allargando il loro studio iniziale, Wolcott e colleghi (2016)<sup>[27]</sup> hanno utilizzato dei pirosequenziamenti del gene 16S rDNA per analizzare i microbioti di 2.963 campioni di ulcere venose croniche della gamba (n=916), ulcere del piede diabetico (910), ulcere da decubito (767) e lesioni chirurgiche non cicatrizzanti (370) ed hanno ottenuto profili simili per le 20 specie batteriche più frequentemente identificate in ciascuno dei quattro tipi di lesioni croniche, con specie *Staphylococcus* e *Pseudomonas* comprensive dei generi maggiormente prevalenti. Inoltre, gli anaerobi obbligati stretti comprendevano 4 dei 10 principali generi rilevati nei campioni della lesione cronica. I microrganismi commensali, tra cui lo *Staphylococcus* coagulasi-negativo, il *Corynebacterium* e il *Propionibacterium*, erano presenti in quasi metà dei campioni di lesioni croniche testati, ma occorre proseguire le ricerche per valutare se la presenza di questi organismi influenzi la guarigione delle lesioni croniche.

È importante capire che usare sia metodi colturali che quelli basati sul DNA per rilevare le specie batteriche presenti nei campioni di lesione non serve per differenziare tra il plancton microbico e i batteri appartenenti a comunità di biofilm. È possibile operare questa distinzione solo al microscopio o mediante colture selettive per biofilm, come quelle sotto descritte.

#### **Il trattamento delle lesioni in base al biofilm migliora la guarigione delle lesioni croniche?**

Una domanda importante da chiedersi è: "Conoscere meglio le effettive specie batteriche, fungine e di lieviti presenti nelle lesioni croniche, compresi i batteri che si trovano nel biofilms, fornisce davvero informazioni importanti che un medico è in grado di utilizzare per migliorare l'esito della ferita?" In un grande studio retrospettivo di coorte di Livello A, la somministrazione di terapie topiche personalizzate guidate da diagnosi molecolare delle specie batteriche ha mostrato miglioramenti significativi della cicatrizzazione sia in termini statistici che clinici<sup>[28]</sup>.

Nel gruppo di trattamento standard (SOC), il 48,5% dei pazienti (244/503) è guarito completamente durante il periodo dello studio, che era di 7 mesi e questa percentuale è salita al 62,4% (298/479) nel gruppo di trattamento che ha ricevuto il SOC più antibiotici sistemici in base ai risultati dell'identificazione molecolare dei batteri della lesione. La cicatrizzazione completa è aumentata ulteriormente fino al 90,4% (358/396) nel gruppo di trattamento che ha ricevuto il SOC più la terapia topica (compresi antibiotici) in base ai risultati della diagnostica molecolare ( $p < 0.001$  rispetto al SOC o al SOC + antibiotici sistemici, analisi condotta con modello a rischi proporzionali di Cox). Più recentemente, Wolcott (2015)<sup>[29]</sup> ha riportato una cicatrizzazione significativamente maggiore nelle lesioni trattate con SOC associato ad un idrogel che conteneva antibiotici topici e agenti che rompevano il biofilm.

**Come e dove prelevare campioni dal letto di una lesione cronica per analizzare il biofilm**

Attualmente il rilevamento e la localizzazione del biofilm nei letti di lesioni cutanee croniche è uno dei “gap” più importanti nel corpo di conoscenze esistente nel campo della cura delle lesioni in base a biofilm, soprattutto perché dei biofilm maturi e tolleranti sono in grado di riformarsi nel giro di tre giorni anche dopo un efficace sbrigliamento della lesione cutanea cronica<sup>[30,31]</sup>.

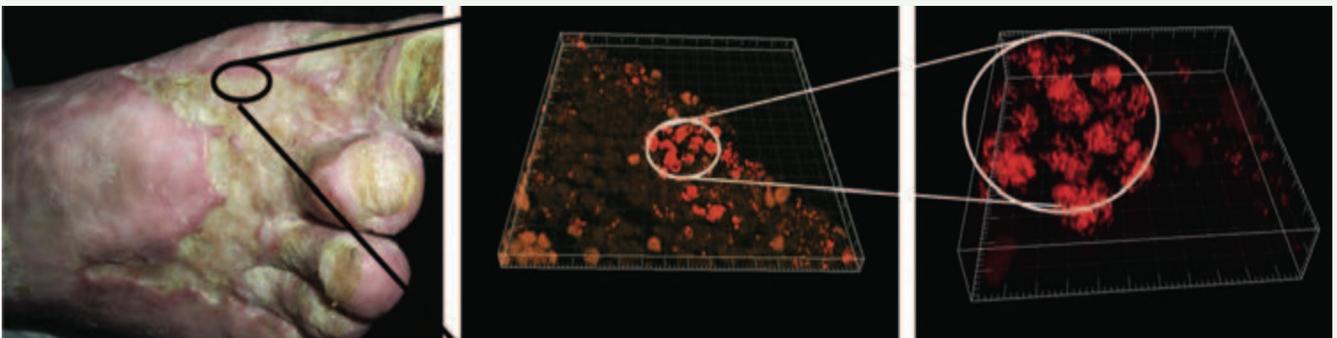
A maggio 2015, la Società Europea di Microbiologia Clinica e Malattie Infettive (ESCMID) ha pubblicato una guida di orientamento per la diagnosi e il trattamento delle infezioni da biofilm<sup>[32]</sup>, che contiene informazioni e linee-guida su come rilevare e trattare le infezioni da biofilm in varie patologie, tra cui infezioni dei tessuti o delle mucose, come quelle che si hanno nei pazienti affetti da infezioni polmonari croniche (fibrosi cistica), e nelle infezioni croniche in cui si formano biofilm su dispositivi interni al corpo (impianti ortopedici, protesi mammarie) o su dispositivi che collegano tra loro le superfici interna (sterile) ed esterna del corpo, come i cateteri endovenosi, i cateteri urinari a permanenza o i tubi endotracheali. I lettori a cui si rivolge questa guida sono i microbiologisti clinici e gli specialisti di malattie infettive che si occupano di diagnosi e gestione delle infezioni da biofilm.

Le linee-guida ESCMID danno le seguenti indicazioni: *‘I tessuti biotici sono considerati i campioni più affidabili per rivelare il biofilm nelle lesioni. L’uso di tamponi per prelevare i campioni di biofilm dalla superficie della lesione è considerato un metodo inadeguato a causa della contaminazione da parte della flora cutanea, la forte aderenza del biofilm nell’epitelio dell’ospite e la crescita di organismi anaerobi nei tessuti profondi. Se si sospetta un’infezione del tessuto da moderata a grave ed è presente una lesione, allora si dovrebbe esaminare un campione di tessuto molle prelevato dalla base della lesione pulita mediante debridement. Qualora non fosse possibile fare questo prelievo, un tampone superficial potrebbe fornire informazioni utili sulla scelta di una terapia antibiotica’<sup>[33,34]</sup>.*

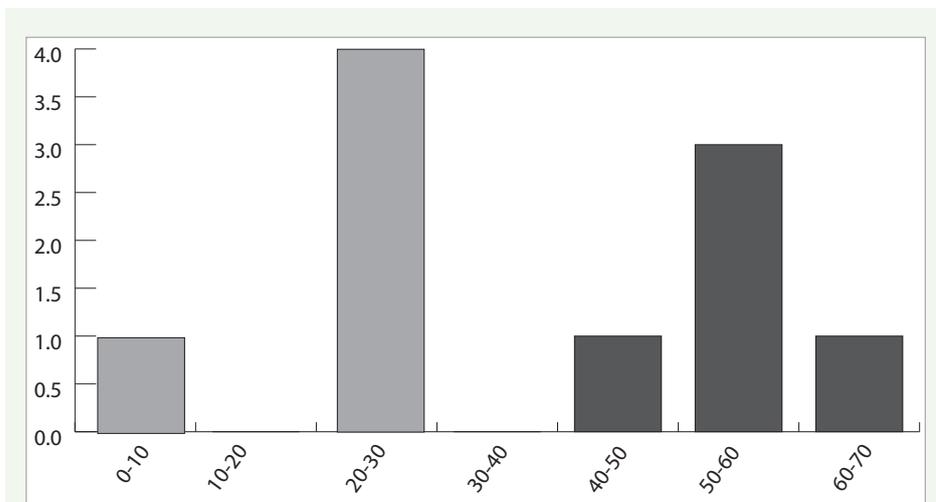
Tuttavia, presumendo che sia possibile prelevare dalla lesione cutanea cronica un campione biotico o di lesione tramite curettage, questa linea-guida lascia molte importanti domande senza una risposta, come:

- Da quale punto del letto della lesione andrebbe prelevato un singolo campione?
- Una biopsia è sufficiente per valutare con un certo grado di certezza se una lesione cronica ha (o non ha) un biofilm maturo? È altamente improbabile che i biofilm siano presenti in modo uniforme sull’intero letto della lesione e sul bordo della lesione, dunque a cosa dovrebbe affidarsi il medico?
- Ci sono segni visivi che potrebbero essere utili per decidere se effettuare un’unica biopsia?

Vari studi hanno osservato che la distribuzione degli aggregati di biofilm in tutto il letto di una lesione cronica non è uniforme<sup>[35,36]</sup>. Ad esempio, come mostra la Figura 2, gli aggregati di biofilm di *P. Aeruginosa* non sono distribuiti in modo omogeneo sul letto della lesione cronica<sup>[36]</sup>.



**Figura 2** | Biofilm di *P. aeruginosa* in una lesione cronica vista mediante una specifica sonda di ibridazione *in situ* con fluorescenza-sonde peptidiche di acido nucleico (rosso) con microscopia confocale a scansione laser. L’immagine a destra mostra un ingrandimento dell’immagine centrale. La distribuzione delle colonie di biofilm sulla superficie del letto della lesione non è uniforme<sup>[36]</sup>



**Figura 3 | Distribuzione delle distanze dalla superficie della lesione al centro della massa di aggregati di *S. aureus* (ombreggiatura grigio chiaro) o di *P. aeruginosa* (ombreggiatura grigio scuro). Le distanze sono i valori medi ottenuti dall'analisi di 15 immagini per ciascuno dei 9 campioni di lesione cronica**

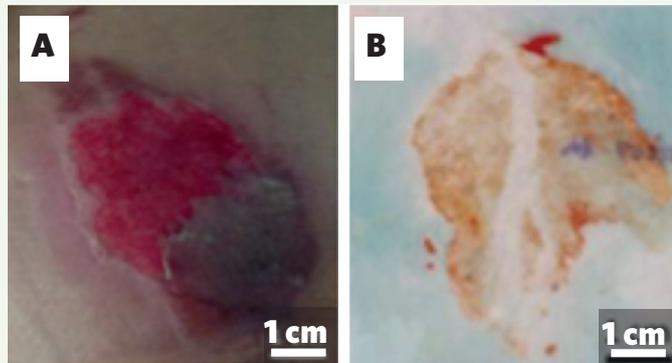
Inoltre, gli aggregati dei biofilm non sono necessariamente presenti solo sulla superficie dei letti delle lesioni<sup>[35]</sup>. Come mostra la Figura 3, sono state identificate strutture di biofilm al di sotto della superficie di 9 letti di lesioni croniche, con aggregati di *S. aureus* più vicini alla superficie del letto della lesione (ad una profondità di ~20-30 micron) rispetto agli aggregati di *P. aeruginosa* (ad una profondità di 50-60 micron). È molto probabile che diverse specie o fenotipi di batteri preferiscano delle nicchie ambientali. Inoltre, la distribuzione di batteri e biofilm potrebbe anche dipendere dalla competizione o dalla collaborazione con altri microrganismi<sup>[26,36]</sup>.

Come spiegato nell'articolo di accompagnamento di Bjarnsholt et al (pagg. 4-8)<sup>[37]</sup>, c'è stato un notevole dibattito sul fatto se i biofilm nei letti di lesioni croniche possano essere osservati a occhio nudo dal medico. Mentre le formazioni di biofilm più grosse sulla superficie smaltata dei denti possono essere rese visibili mediante metodi di colorazione, è meno chiaro se tutte le formazioni di biofilm possano essere visibili nelle lesioni croniche. Alcuni medici clinici hanno suggerito che i "segni clinici" come uno strato brillante, traslucido e gelatinoso sul letto di una lesione che non cicatrizza e che si riforma rapidamente dopo il lavaggio, che può essere più facile da rimuovere con tamponi di tessuto e che potrebbe rispondere meno allo sbrigliamento enzimatico o autolitico saranno con ogni probabilità dei biofilm<sup>[38,39]</sup>. Tuttavia, queste osservazioni devono essere supportate da analisi rigorose di questi tipi di materiali sui letti delle lesioni per verificare se si tratti di biofilm.

Una nuova tecnica descritta da Nakagami e colleghi<sup>[40]</sup>, chiamata "Mappa delle lesioni con biofilm" potrebbe dare informazioni utili su come localizzare i biofilm sulla superficie del letto di una lesione. Un operatore preme una membrana di nylon con carica altamente positiva sul letto della lesione per qualche minuto fino a produrre una "impronta molecolare" delle molecole che sono sulla superficie del letto della lesione che sono legate molto strettamente alla membrana. La "macchia" viene poi sommersa per qualche secondo in una soluzione contenente una molecola di colorante a carica positiva (come il Rutenio Rosso) che forma legami ionici con molecole a carica altamente negativa legate alla membrana, e poi si risciacqua brevemente. La maggior parte dei biofilm batterici contiene quantità sostanziose (~20%) di DNA batterico libero, che ha una carica altamente negativa<sup>[41]</sup>.

Esperimenti di laboratorio hanno dimostrato che le aree della membrana che trattenono il colorante corrispondono alle aree sulla superficie del letto della lesione che hanno una matrice esopolimerica delle comunità del biofilm. Inoltre, l'area della superficie di un letto di

**Figura 4 | Mappa delle lesioni con biofilm. La colorazione arancione-rosso presente sulla membrana (pannello B) suggerisce la presenza della matrice esopolimerica di biofilm della lesione cronica (pannello A) su una membrana a carica positiva.**



lesione che ha macchiato la membrana ha predetto l'estensione dell'essudato che si è sviluppato sul letto delle lesioni croniche durante la settimana successiva. Un punto debole di questa tecnica è che rileva preferibilmente la matrice esopolimerica di biofilm che si trova sulla superficie del letto della lesione e non rileva la matrice esopolimerica di biofilm che si trova in profondità nella matrice del letto della lesione. Chiaramente c'è bisogno di sviluppare un rilevatore di biofilm rapido, non costoso e di facile utilizzo da utilizzare al punto di cura in pochi minuti.

#### **QUALI SONO LE PROVE OTTIMALI DA ESEGUIRE SULLE LESIONI CRONICHE PER RILEVARE IL BIOFILM?**

Ci sono vari test che sono utilizzati per determinare se un campione di lesione contiene un biofilm maturo tollerante. L'approccio più comune è quello che visualizza le strutture simili a biofilm utilizzando o la microscopia ottica, spesso con anticorpi per il rilevamento di un singolo componente della matrice esopolimerica di alcuni biofilm, come l'alginato sintetizzato tramite *P. aeruginosa* o l'ibridazione in situ fluorescente (FISH). Tuttavia, ci possono volere anche vari giorni per lavorare i campioni di tessuto tramite inclusione in paraffina. Il criosezionamento può costituire un metodo di lavorazione e di valutazione più rapido. Entrambe le tecniche necessitano di costosi microscopi e tecnici qualificati, e non possono essere eseguite durante una visita in clinica.

La maggior parte dei normali laboratori di microbiologia clinica sono in grado di adottare un approccio relativamente semplice e standard alla misurazione dei batteri in biofilm protettivi<sup>[42]</sup>. Brevemente, i campioni di lesione vengono collocati in soluzione fisiologica tamponata al fosfato (PBS) contenente 5 ppm di Tween 20 (5 ml/ml). Vengono poi passati al Vortex per sospendere il tessuto, dopo di che viene aggiunto uno sbiancante diluito fino ad una concentrazione finale dello 0,03%.

I campioni vengono poi incubati per 10 minuti per uccidere tutti i batteri planctonici e lo sbiancante viene neutralizzato con metabisolfito di sodio (ad una concentrazione finale dello 0,3%). L'aggregato del biofilm viene poi disperso in singoli batteri mediante cinque cicli da 1,5 minuti di ultrasuoni con una pausa di raffreddamento di 1 minuto tra i vari cicli. I campioni vengono piastrati per diluizioni seriali 1:10 su piastre selettive di crescita con agar e le colonie vengono contate dopo 24 ore e 48 ore di incubazione a 37°C.

In alternativa, i campioni di lesione possono essere collocati in soluzioni contenenti antibiotici (gentamicina, moxifloxacina, penicillina) per 24 ore a 37°C per uccidere i batteri planctonici suscettibili e poi lavarli due volte in brodo di neutralizzazione Dey-Engley, passati al vortex (30 secondi), sonicati (2 minuti) e passati al vortex (30 secondi) tre volte per disperdere i biofilm in singole sospensioni cellulari che vengono poi diluite in serie con PBS, piastrate su TSB e le piastre incubate a 37°C per 24-48 ore<sup>[43]</sup>.

**LE LESIONI POSSONO GUARIRE CON UNA PICCOLA QUANTITÀ DI BIOFILM?**

Molte lesioni acute possono cicatrizzare nonostante la colonizzazione batterica. Si tratta di un paradosso che si può spiegare ipotizzando che il sistema immunitario della maggior parte dei pazienti (a volte integrati da antibiotici sistemici o medicazioni antisettiche topiche) possono uccidere i batteri planctonici prima che si sviluppino in biofilm che sono molto difficili da uccidere. Quasi tutte le lesioni croniche sono diventate croniche perché non sono state trattate nel modo giusto e indubbiamente contengono notevoli quantità di biofilm batterico, ma molte lesioni croniche, quando ricevono il trattamento giusto come la compressione e/o l'off-loading, cominciano a cicatrizzare, anche senza aggiungere antibiotici o antisettici. È possibile che questo si possa spiegare con il fatto che alcuni batteri sono più virulenti, come lo *Pseudomonas* e alcuni ceppi di *Staphylococcus*<sup>[19]</sup>, ma molti dei batteri che si trovano nelle lesioni sono agenti infettivi opportunistici. La risposta immunitaria potrebbe creare opportunità per batteri meno virulenti, lottando per lo stesso spazio, per influenzare i batteri nel biofilm. Chiaramente questa è una domanda importante cui ulteriori ricerche dovrebbero cercare di rispondere.

**CONCLUSIONE**

Il biofilm batterico può giocare un ruolo fondamentale nello sviluppo e nel mantenimento delle lesioni croniche. La rilevazione e la localizzazione dei biofilms nelle lesioni croniche forniscono informazioni cliniche utili, soprattutto per la valutazione e l'orientamento dell'efficacia dello sbrigliamento (debridement). Tuttavia, vi sono ancora notevoli le carenze nelle conoscenze fondamentali che dovrebbero aiutare a rilevare e localizzare i biofilm nelle lesioni croniche. La linea-guida ESCMID<sup>[32]</sup> pubblicata nel 2015 offre un orientamento per la diagnosi e il trattamento delle infezioni da biofilm, ma lascia alcune domande senza risposta, compresa quella se i segni visivi possano essere utili per decidere dove eseguire una biopsia

Il dibattito sul fatto se sia possibile o meno vedere il biofilm a occhio nudo continua. Nuove tecniche, come la "mappa delle lesioni con biofilm" di Nagakami e colleghi<sup>[40]</sup> potrebbero fornire informazioni utili su come localizzare i biofilm sulla superficie del letto della lesione. Tuttavia, come altre tecniche esistenti, anche questa ha i suoi punti deboli, perciò occorrono ancora ricerche per poter sviluppare un rilevatore da utilizzare al punto di cura che possa fornire risultati in pochi minuti e non in più giorni. Si auspicano ulteriori ricerche per individuare localizzare accuratamente ed efficacemente i biofilm nelle lesioni croniche.

**RIFERIMENTI**

1. Costerton JW. The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: a hypothesis. *Rev Infect Dis* 1984; 6 Suppl 3:S608-S616.

---

2. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987v;41:435-64.

---

3. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:711-45.

---

4. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):167-93.

---

5. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284(5418):1318-22.

---

6. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini ED, Secor P, Sestrich J, Costerton JW, Stewart PS. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1):37-44.

---

7. Wysocki AB, Grinnell F. Fibronectin profiles in normal and chronic wound fluid. *Lab Invest* 1990; 63(6):825-31.

---

8. Ladwig GP, Robson MC, Liu R, Kuhn MA, Muir DF, Schultz GS. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; 10(1):26-37.

---

9. Trengove NJ, Stacey MC, Macauley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G, Schultz G. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen* 1999; 7(6):442-52.

---

10. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Multiplexed analysis of matrix metalloproteinases in leg ulcer tissue of patients with chronic venous insufficiency before and after compression therapy. *Wound Repair Regen* 2008; 16(5):642-8.

---

11. Liu Y, Min D, Bolton T, Nube V, Twigg SM, Yue DK, McLennan SV. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2009; 32(1):117-9.

---

12. Rayment EA, Upton Z, Shooter GK. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *Br J Dermatol* 2008; 158(5):951-61.

---

13. Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* 2002; 45(7):1011-6.

---

14. Herrick SE, Sloan P, McGurk M, Freak L, McCollum CN, Ferguson MW. Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers. *Am J Pathol* 1992; 141(5):1085-95.

---

15. Pierce GF, Tarpley JE, Tseng J, Bready J, Chang D, Kenney WC, Rudolph R, Robson MC, Vande Berg J, Reid P. . Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. *J Clin Invest* 1995; 96(3):1336-50.

---

16. Cowin AJ, Hatzirodos N, Holding CA, Dunaiski V, Harries RH, Rayner TE, Fitridge R, Cooter RD, Schultz GS, Belford DA. Effect of healing on the expression of transforming growth factor beta(s) and their receptors in chronic venous leg ulcers. *J Invest Dermatol* 2001; 117(5):1282-9.

---

17. Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2000; 8(1):13-25.

---

18. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1996; 4(4):411-20.

---

19. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PO, Madsen KG, Phipps R, Krogfelt K, Hoiby N, Givskov M. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1):2-10.

---

20. Wolcott RD, Kennedy JP, Dowd SE. Regular debridement is the main tool for maintaining a healthy wound bed in most chronic wounds. *J Wound Care* 2009; 18(2):54-6.

---

21. Wolcott RD, Cox S. More effective cell-based therapy through biofilm suppression. *J Wound Care* 2013;22(1):26-31.

---

22. Costerton JW, Post JC, Ehrlich GD, Hu FZ, Kreft R, Nistico L, Kathju S, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Maale G, James G, Sotereanos N, DeMeo P. New methods for the detection of orthopedic and other biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 61(2):133-40.

---

23. Dowd SE, Sun Y, Secor PR, Rhoads DD, Wolcott BM, James GA, Wolcott RD. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol* 2008; 8(1):43.

---

24. Dowd SE, Delton HJ, Rees E, Wolcott RD, Zischau AM, Sun Y, White J, Smith DM, Kennedy J,

- Jones CE. Survey of fungi and yeast in polymicrobial infections in chronic wounds. *J Wound Care* 2011; 20(1):40-7.
25. Dowd SE, Wolcott RD, Sun Y, McKeenan T, Smith E, Rhoads D. Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS ONE* 2008; 3(10):e3326.
26. Thomsen TR, Aasholm MS, Rudkjøbing VB, Saunders AM, Bjarnsholt T, Givskov M, Kirketerp-Møller K, Nielsen PH. The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods. *Wound Repair Regen* 2010; 18(1):38-49.
27. Wolcott RD, Hanson JD, Rees EJ, Koenig LD, Phillips CD, Wolcott RA, Cox SB, White JS. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair Regen* 2016; 24(1):163-74.
28. Dowd SE, Wolcott RD, Kennedy J, Jones C, Cox SB. Molecular diagnostics and personalised medicine in wound care: assessment of outcomes. *J Wound Care* 2011; 20(5):232, 234-2, 239.
29. Wolcott R. Disrupting the biofilm matrix improves wound healing outcomes. *J Wound Care* 2015; 24(8):366-71.
30. Wolcott RD, Rhoads DD. A study of biofilm-based wound management in subjects with critical limb ischaemia. *J Wound Care* 2008; 17(4):145-2, 154.
31. Shin KS, Song HG, Kim H, Yoon S, Hong SB, Koo SH, Kim J, Kim J, Roh KH. Direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from blood cultures using an immunochromatographic immunoassay-based MRSA rapid kit for the detection of penicillin-binding protein 2a. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67(3):301-3.
32. Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, Hall-Stoodley L, Høla V, Imbert C, Kirketerp-Møller K, Lebeaux D, Oliver A, Ullmann AJ, Williams C. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21 Suppl 1:S1-25.
33. Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen* 2012; 20(5):647-57.
34. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJ, Armstrong DG, Deery HG, Embil JM, Joseph WS, Karchmer AW, Pinzur MS, Senneville E. Executive summary: 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis* 2012; 54(12):1679-84.
35. Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jørgensen B, Andersen AS, Kroghfelt KA, Givskov M, Tolker-Nielsen T. Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2009; 47(12):4084-9.
36. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2013; 121(Suppl 136):S1-S51.
37. Bjarnsholt T, Schultz GS, Kirketerp-Møller K, Fletcher J, Malone M. The role of biofilms in delayed wound healing. *Wounds International* 2016.
38. Metcalf DG, Bowler PG, Hurlow J. A clinical algorithm for wound biofilm identification. *J Wound Care* 2014; 23(3):137-2.
39. Hurlow J, Bowler PG. Potential implications of biofilm in chronic wounds: a case series. *J Wound Care* 2012; 21(3):109-10, 112, 114.
40. Nakagami G, Schultz G, Gibson D, Phillips P, Kitamura A, Minematsu T, Miyagaki T, Hayashi A, Sasaki S, Sugama J, Sanada H. *Biofilm detection by wound blotting can predict slough development in pressure ulcers: a prospective observational study*. Submitted 2016.
41. Spoering AL, Gilmore MS. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2006 9(2):133-7.
42. Fennelly KP, Ojano-Dirain C, Yang Q, Liu L, Lu L, Progulsk-Fox A, Wang GP, Antonelli P, Schultz G. Biofilm Formation by *Mycobacterium abscessus* in a Lung Cavity. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193(6):692-3.
43. Wolcott RD, Rumbaugh KP, James G, Schultz G, Phillips P, Yang Q, Watters C, Stewart PS, Dowd SE. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time- dependent therapeutic window. *J Wound Care* 2010; 19(8):320-8.

**NOTE**





Una pubblicazione di Wounds International  
[www.woundsinternational.com](http://www.woundsinternational.com)