

## Secrezioni genitali femminili: semeiotica e clinica - 1: Biofilm patogeni

Prof.ssa Alessandra Graziottin

Direttore del Centro di Ginecologia e Sessuologia Medica

H. San Raffaele Resnati, Milano

### Indice

Fisiopatologia degli ambienti vaginali e vescicali	pag. 1
L'azione dei biofilm patogeni	pag. 1
Un nemico ostinato	pag. 2
Biofilm extracellulari	pag. 2
Le persister cell	pag. 3
Biofilm intracellulari	pag. 3
La cronicizzazione delle patologie	pag. 4

### Fisiopatologia degli ambienti vaginali e vescicali

La vagina è un organo molto "abitato". Nell'ambiente vaginale convivono infatti, in equilibrio dinamico, **numerosi microrganismi** che nell'arco della vita della donna subiscono modificazioni qualitative e quantitative. Nella donna in età fertile il 90% della flora microbica residente è costituita da lattobacilli, mentre il restante 10% da batteri saprofiti.

In particolare, la flora lattobacillare in simbiosi con l'ospite può organizzarsi in **biofilm fisiologici** e formare un ecosistema vaginale sano ed equilibrato.

L'equilibrio tra le diverse comunità batteriche e micotiche del biofilm fisiologico può alterarsi:

- per squilibri ormonali, e soprattutto per carenza estrogenica (da amenorrea ipotalamica o da stress fisico o psichico; amenorrea da allattamento; amenorrea da menopausa);
- per infezioni da germi endogeni provenienti dall'intestino ("saprofiti patogeni"), come l'Escherichia Coli e simili;
- per infezioni esogene, da rapporto sessuale (malattie sessualmente trasmesse);
- per infezioni esogene da oggetti/biancheria contaminata (per esempio da gonococco).

Questo può causare la comparsa di **biofilm patogeni**. Lo squilibrio della flora microbica residente causa le infezioni ricorrenti sia della vagina (**vaginiti**) sia delle vie urinarie inferiori (**cistiti**) che costituiscono un serio problema medico in quanto, attualmente, non esistono terapie efficaci a lungo termine.

### L'azione dei biofilm patogeni

Fino all'80% delle infezioni batteriche che colpiscono gli esseri umani nei Paesi occidentali è causato da biofilm patogeni, **comunità strutturate di cellule batteriche** spesso di specie diverse, anche di natura fungina, racchiuse in una **matrice polimerica autoprodotta** e adesa

ad una superficie inerte o vivente.

I germi patogeni associati alle vaginosi batteriche, aerobiche, da candida e alle cistiti, e alle secrezioni vaginali ad esse correlate, hanno tutti la tendenza a formare biofilm. In tempi brevissimi il biofilm formato da una singola specie viene sostituito da un consorzio batterico e fungino stabile rendendo ancora più problematica la sua eliminazione.

Questo spiega la frequente incompleta risposta agli antibiotici e agli antifungini e l'alta presenza di forme morbose recidivanti uro-ginecologiche resistenti agli antibiotici e tendenti alla cronicizzazione. I biofilm, quando presenti, rendono i batteri da 10 a 1000 volte più resistenti al trattamento antibiotico rispetto al fenotipo planctonico, e posseggono una naturale resistenza agli effettori della risposta immune.

### **Un nemico ostinato**

Nonostante le difficoltà nell'eradicazione di batteri patogeni persistenti a livello dell'apparato urogenitale, esiste ancora una limitata consapevolezza a livello clinico dell'importanza dei biofilm microbici e fungini nei processi infettivi e della più elevata farmaco-resistenza associata alla crescita microbica sessile. In vagina i biofilm che si possono generare sono soprattutto **extracellulari**, cioè posti tra le cellule che rivestono la parete della vagina verso la cavità. In vescica invece sono **intracellulari**, possono instaurare fenomeni infiammatori cronici e causare una sindrome della vescica dolorosa o una cistite interstiziale.

Anche in presenza di un'eccellente risposta immunitaria cellulare e umorale, le infezioni sostenute da biofilm spesso non sono risolte dai meccanismi di difesa dell'ospite. Tutte le donne affette da cistiti e vaginiti recidivanti hanno una colonizzazione vaginale di Escherichia Coli presente anche durante periodi asintomatici e manifestano una relazione inversa tra numero di coliformi e numero di lattobacilli. Inoltre, la presenza di una vaginite aerobica, o almeno la presenza di un biofilm polimicrobico vaginale comprendente l'Escherichia Coli, è sempre rilevata nei giorni precedenti un episodio di cistite.

E' stato dimostrato che nei 14 giorni che precedono una Urinary Tract Infection (UTI) la presenza di batteri periuretrali aumenta dal 46% al 90%, la batteriuria dal 7% al 69%, la leucocyte esterasi dal 31% al 64%, la sintomatologia vaginale dal 3% al 43% (P=008).

### **Biofilm extracellulari**

I biofilm extracellulari sono una struttura complessa e organizzata costituita da una matrice esopolisaccaridica, nella quale sono scavati minuscoli canali d'acqua che si anastomizzano fra loro, formando una sorta di sistema circolatorio primitivo. I biofilm possono organizzarsi sulla superficie di differenti mucose o di dispositivi medici inerti. A causa della presenza dell'involucro polisaccaridico, che agisce come un sistema di protezione che si oppone alla penetrazione dei farmaci, i microrganismi presenti nel biofilm mostrano un'aumentata resistenza alle difese immunitarie dell'ospite e alla terapia antibiotica rispetto alle forme planctoniche.

Conseguentemente, i biofilm extracellulari rivestono **un'importanza rilevante in molte infezioni croniche e da impianti biomedici**, a carattere recidivante, che sembrano intrattabili con gli antibiotici. Lo sviluppo di recenti tecniche di microscopia a laser confocale ha reso

possibile l'osservazione diretta degli aggregati batterici e fungini in situ a diverse profondità e ha permesso di osservare che i patogeni presenti in natura, in sistemi naturali e patologici, crescono sotto forma di biofilm.

I biofilm extracellulari, spesso di natura polimicrobica, comportano:

- una più lenta e ridotta penetrazione degli antibiotici all'interno della matrice polimerica del biofilm stesso;
- un'elevata frequenza di coniugazione fra i batteri, che promuove lo scambio di plasmidi contenenti geni codificanti per resistenze multiple agli antibiotici;
- un'attività antagonista di cataboliti microbici che, interagendo con le molecole antibiotiche, ne neutralizzano l'attività;
- l'insorgenza di "persister cell", fenotipi batterici resistenti agli antibiotici generatisi per carenza di ossigeno e di nutrienti nelle zone più lontane dalla superficie del biofilm.

### **Le persister cell**

La resistenza agli antibiotici e alle difese immunitarie delle persister cell è la componente cruciale responsabile del fallimento delle terapie antibiotiche nelle infezioni recidivanti. Terminata la terapia antibiotica o antifungina infatti, **le persister cell prontamente si riattivano ripristinando la carica batterica preesistente**. Esiste quindi una diretta causalità tra presenza di persister cell, ricorrenza e cronicizzazione delle infezioni.

Singoli batteri multiresistenti e aggregati microbici che si distaccano in modo continuo da un biofilm maturo, sia esso monospecie o multispecie, fungono da inoculo persistente promuovendo nell'organismo nuovi siti di colonizzazione e dando luogo alle cosiddette infezioni polimicrobiche antibiotico-resistenti a crescita sessile e tendenti alla cronicizzazione.

Recentemente i biofilm extracellulari in ginecologia sono risultati i principali agenti causali di vaginosi batterica, vaginite aerobica, vaginite da candida, vaginite da trichomonas, infezioni urogenitali quali cerviciti, endometriti, salpingiti, malattia infiammatoria pelvica (PID) e infezioni ostetriche o amniotiti. Pertanto, le vaginiti non devono più essere considerate come infezioni sostenute da un singolo patogeno ma come una **sindrome polimicrobica** caratterizzata da un significativo aumento della carica batterica aerobica, anaerobica e fungina, eventualmente con un ceppo patogeno dominante.

### **Biofilm intracellulari**

La recente scoperta del ruolo dei biofilm endocellulari nella patogenesi di Escherichia coli uropatogeno (U-PEC) ha permesso di osservare come particolari germi possano entrare all'interno delle cellule dell'urotelio, e in particolare delle cellule della parete vescicale, andando a costituire delle **comunità intracellulari** (Intracellular Bacterial Communities, IBCs) e rappresentando un potente "reservoir" di reinfezioni endogene.

La formazione di IBCs in cellule uroteliali spiega come le infezioni della vescica possano persistere anche a fronte di robuste difese dell'ospite. I batteri intracellulari, maturando in biofilm, creano rigonfiamenti simili a bacelli e vengono racchiusi in una matrice polisaccaridica circondata da un guscio protettivo di uroplachina in prossimità della superficie. All'interno del

biofilm, le strutture batteriche interagiscono con la matrice circostante, e le comunità batteriche associate al biofilm possono andare incontro a variazioni regionali di espressione genica.

I biofilm intracellulari sono principalmente presenti in vescica e possono instaurare fenomeni infiammatori cronici come la **sindrome della vescica dolorosa**, oppure fenomeni di **cistite interstiziale**. La durata temporale dalla colonizzazione da parte di cellule batteriche di U-PEC dell'urotelio vescicale, fino alla cistite interstiziale conclamata, può richiedere fino a 5-7 anni, durante i quali si assiste a una persistente infiammazione negletta nelle sue principali caratteristiche fisiopatologiche.

Alcune osservazioni sperimentali hanno mostrato infatti che l'Escherichia Coli può formare biofilm intracellulari, a localizzazione principalmente vescicale, con persistere cell completamente resistenti agli antibiotici e alle cellule effettrici del sistema immunitario, rendendo tali infezioni croniche e ricorrenti.

### **La cronicizzazione delle patologie**

La progressione verso la cronicizzazione è più rapida e gli episodi di cistite più ravvicinati se il biofilm vescicale o vaginale non viene trattato. Oggi è risaputo che la migliore terapia antibiotica a nostra disposizione è solamente in grado di risolvere un episodio acuto di cistite, mentre è completamente inefficace nella prevenzione delle infezioni uro-ginecologiche recidivanti.

Per questi motivi l'attenzione dei clinici e dei microbiologi è rivolta alla ricerca di **alternative alla terapia antibiotica**, che spesso nelle cistiti e vaginiti recidivanti sono inefficaci, stimolano la "SOS response" e la formazione di persistere cell, creando ceppi batterici antibiotico-resistenti, nonché un'elevata disbiosi intestinale e vaginale.

Una diagnosi accurata delle secrezioni vaginali è quindi essenziale per stabilire la terapia più efficace a lungo termine. Lo vedremo nella seconda parte della scheda.