

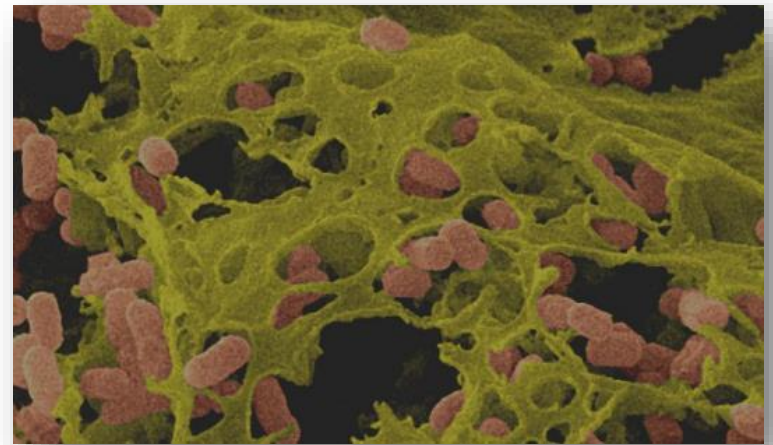
**LALLEMAND
ANIMAL NUTRITION**



**SPECIFIC
FOR YOUR
SUCCESS**



Biosicurezza: caratteristiche, dinamiche e gestione del biofilm ambientale



Source image: INRA

CONTENUTI

Introduzione: Planctonico vs. biofilm – Storia

- Biofilm ambientali e implicazioni
- Definizione
- Formazione
- Quorum sensing
- Resistenza agli antimicrobici
- Dinamiche
- Biofilm in allevamento

Concetto di biofilm positivo

- Concetto di biofilm positivo
- Strumenti di selezione : biofilm ring tests, test di inibizione

Introduzione

➤ Planctonico vs. Biofilm – STORIA parte 1



1684
Antonie van Leeuwenhoek
Inventore del primo microscopio
Prime osservazioni di batteri:
Biofilm della placca dentale!



1843 - 1910
Robert Koch
Indagini di single specie planctoniche
Paradigma delle colture pure
Patogeni per l'uomo, tubercolosi, colera e difterite
→ « Età dell'oro » della microbiologia
Ma lontana dalla diversità batterica presente nel mondo



Inizi 20mo secolo

Henrici, Heukelekian, Heller

Osservazione in natura di batteri non liberamente fluttuanti (superfici sommerse, superficiali)

Zobell osservò che il numero dei batteri presenti sulle superfici era notevolmente maggiore rispetto all'ambiente circostante (in questo caso, acqua di mare).

1950s -1970s

Investigazione dell'habitat microbico naturale e di quelli influenzati dall'uomo:
>99% dei batteri è adesa ad una superficie

Introduzione

➤ Planctonico vs. Biofilm – STORIA parte 2



1973
Characklis

Osservazioni degli impianti idrici industriali dove dimostrò che i biofilm non solo sono molto tenaci ma anche altamente resistenti ai disinfettanti ad esempio il Cloro

90% della biomassa microbica mondiale risiede in un biofilm
Oggi: il biofilm un'attributo universale dei microrganismi
Differenti caratteristiche e proprietà dei batteri tra lo stato planctonico e biofilm



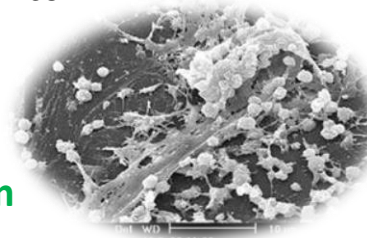
1978
Costerton

Teoria di *biofilms* che illustra i meccanismi e la comprensione di come i batteri interagiscono con l'ambiente, he esso sia la superficie di una roccia, scambiatori di calore, dispositivi medici o tessuti umani.

→ Piena importanza nella comunità scientifica

1980-1990

Numerose scoperte grazie all'utilizzo del microscopio elettronico



1990

Istituzione del Biofilm center all'Università dello Stato del Montana

Fino ai giorni nostri

Interesse crescente
Maggiori conoscenze e scoperte grazie alla genetica e alla scansione laser confocale

Biofilm environments

➤ Forte impatto dei biofilm in tutti i campi

Modalità di vita ubiquitaria osservata su tutti i tipi di superficie:

Minerali (industria, ambiente) , animale (muco , denti) e tessuti vegetali (foglie)



SALUTE

- Infezioni correlate a strumentazioni
- Placca dentale
- Infezioni croniche

Dal 65 al 80% di tutte le infezioni croniche sono attribuibili a microfilm



INDUSTRIA

- Trasformazione del cibo
- Impinati idrici
- Scafi delle navi



NATURA

- Ruoli ecologici (ciclo del carbonio, Ciclo dell'azoto)
- Simbiosi con le piante
- Microflora umana

Impatto dei Biofilm

➤ Salute umana

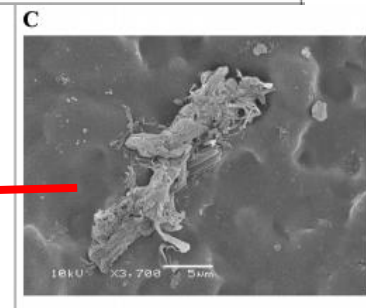
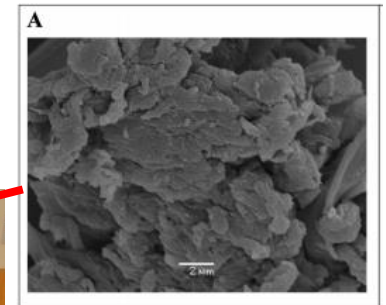
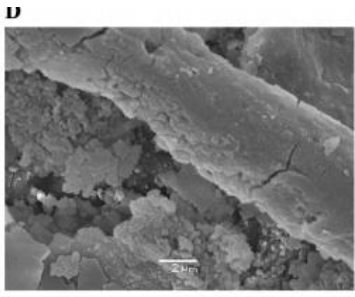
Dal 65 al 80% delle infezioni nosocomiali sono attribuibili a biofilm

Le infezioni nosocomiali (acquisite in ambiente ospedaliero) sono la quarta causa di morte negli U.S.A. con 2 milioni di casi all'anno (~10% dei pazienti ospedalieri Americani)

73% di rischio che un paziente sviluppi un'infezione nosocomiale se permane nella stessa stanza dove il paziente precedente ha contratto un'infezione da enterococchi vancomicina resistenti (VRE), *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti (MRSA), *Clostridium difficile* o da *Acinetobacter baumannii*

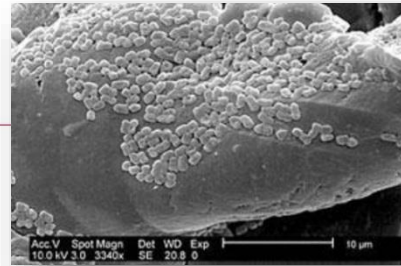
La trasmissione può avvenire

- Tra pazienti,
- Mani degli operatori sanitari,
- Con strumentazione medica
- Dall'ambiente clinico

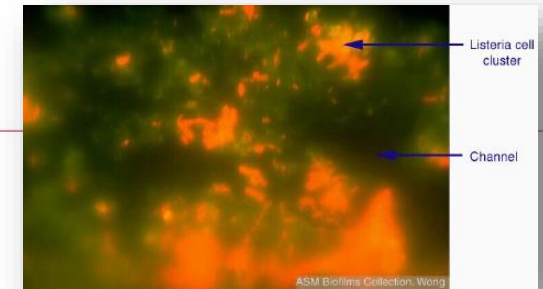


Impatti del Biofilm

Foglia d'insalata



Listeria biofilm – Industria della carne



➤ Trasformazione del cibo

Catena di trasformazione del cibo = un ruolo maggiore nella contaminazione del prodotto

- Tra 1996 e 1998 in Francia, il 40 % delle patologie di origine alimentare sono dovute a contaminazione da strutture/materiali
 - Oggi, il 25% delle patologie di origine alimentare sono dovute alla contaminazione durante il processo di trasformazione
- Es. in Giappone nel 2000 → 14 000 persone intossicate con latte a causa di una contaminazione dei tubi
- Superfici contaminate in cucina costituiscono il 30 % degli eventi di Salmonellosi + E. coli, Campylobacter

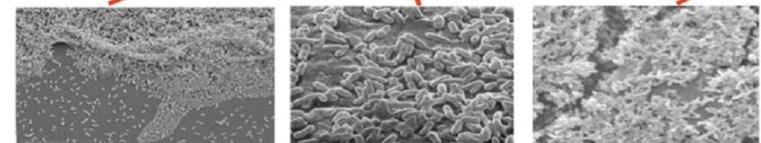
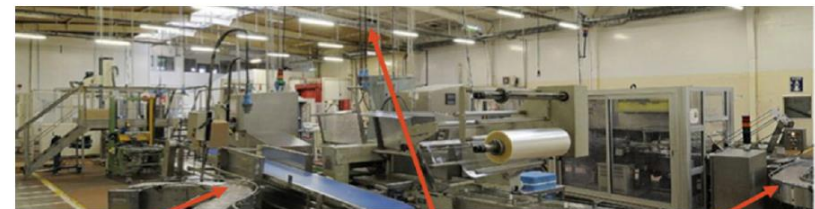
Dove sono i biofilms ?

Carne, pesce, industria casearia : attrezzatura, pareti, pavimenti, ventilazione, sistemi di areazione, tubazioni d'acqua

Attrezzature chiuse: tubazioni per il latte, linea di condizionamento, linea di pulizia

Cucina: superfici, canovacci

Biofilm si sviluppa in ambienti ostili
Resistente alla pulizia/programmi di disfezione

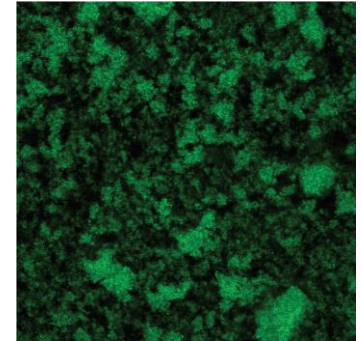


Definizione di Biofilm

➤ Definizione

Comunità strutturata di batteri e/o altri microrganismi come alghe, funghi inglobati in una matrice polimerica autoprodotta, adesa ad una superficie viva od inerte

- Processo Naturale
- Struttura vivente e dinamica, in costante movimento
- Forma dominante in un ambiente ostile
- Struttura e fisiologia chiusa simile all'organizzazione dei tessuti negli eucarioti
 - interazioni sociali



Staphylococcus epidermidis
biofilm- microscopia confocale

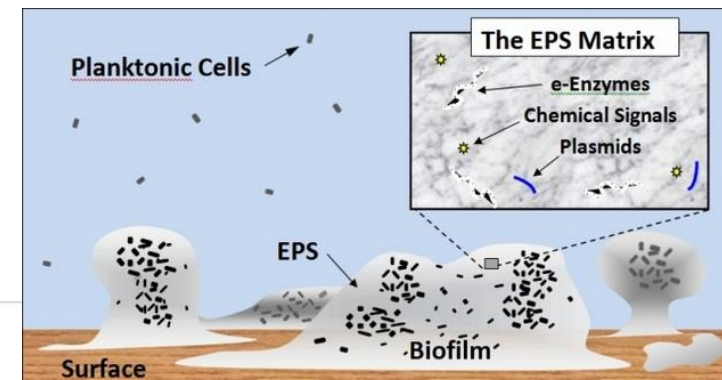
➤ La matrice – responsabile dell'architettura del biofilm

Acqua (più del 97%), esopolisaccaridi, proteine e acidi nucleici secreti dai microrganismi + sostanze esterne

Variazione dipendente dalle condizioni di crescita e specie

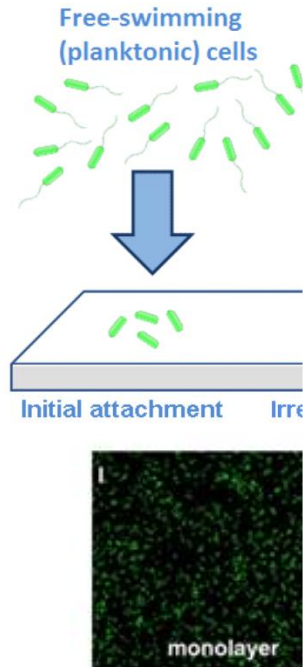
Architettura 3D

- Vuoti interstiziali (canali d'acqua)
- Il flusso di liquidi permette la diffusione di nutrienti, ossigeno



Formazione del Biofilm

➤ Stadi del ciclo vitale del Biofilm

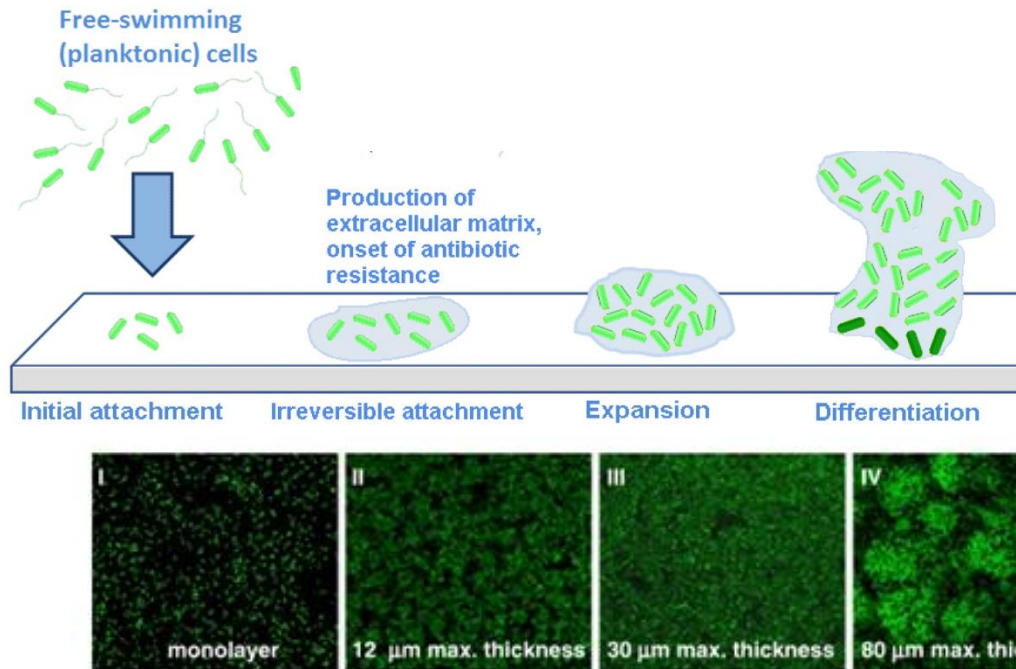


1. Adesione:

- Creazione di un film condizionante di molecole su di una superficie umida
- Funzione nutritiva per i batteri
- I batteri planctonici aderiscono debolmente e reversibilmente alla superficie
- Attrazione elettrostatica, forze di Van der Waals, idrofobicità delle cellule

Formazione del Biofilm

➤ Stadi del ciclo vitale del Biofilm

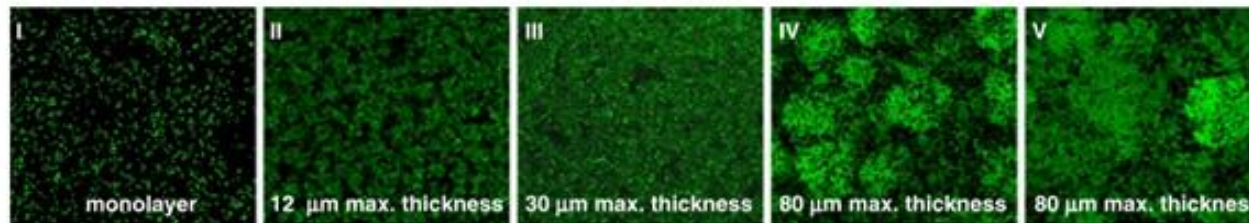
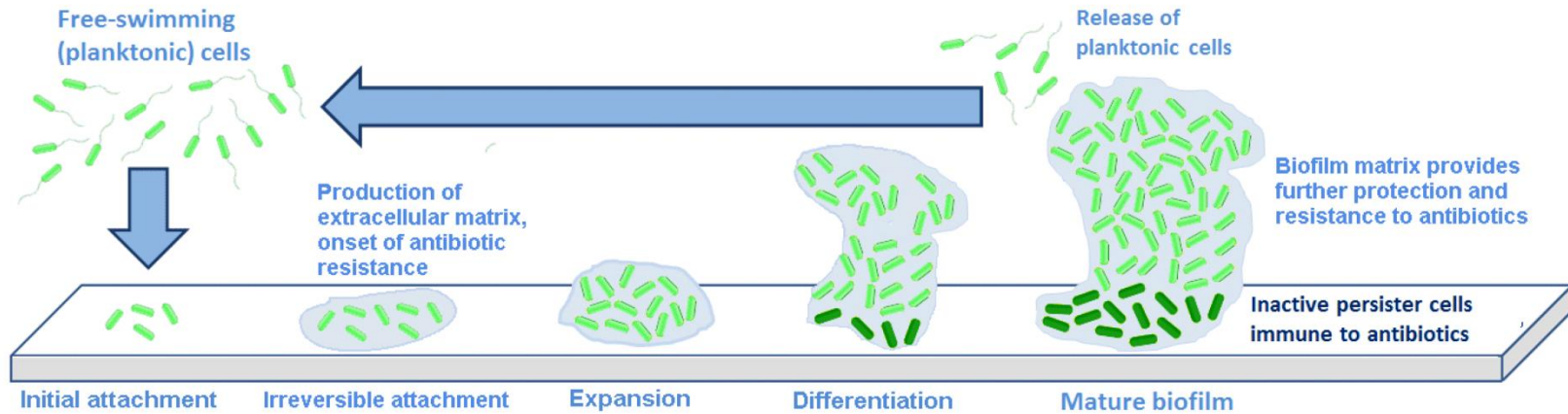


2. Adesione irreversibile e crescita:

- Formazione del glicocalice che comporta un'adesione irreversibile dei batteri
- I batteri del Biofilm secernono polisaccaridi (sostanze polimeriche extracellulari – EPS)
- Incrementano l'adesione tra i batteri
- Costituisce una barriera protettiva
- Ingloba i nutrienti dentro la matrice
- Facilita le comunicazioni tra i batteri.

Formazione del Biofilm

➤ Stadi del ciclo vitale del Biofilm



3. Maturazione e dispersione

- Spesso nel biofilm sono inglobati molteplici organismi (batteri, funghi)
- Promuove ulteriore adesione cellulare
- Spesso i batteri presenti in profondità sono quiescenti
- I batteri di superficie possono ritornare alla forma planctonica e contribuire alla disseminazione dell'infezione

➔ Modalità di vita attivo

Biofilm 3D e conseguenze

➤ Eterogeneità/microambiente/gradienti

Non solo per biofilm da colture miste (come è possibile trovare nell'ambiente) ma anche per biofilm di colture pure

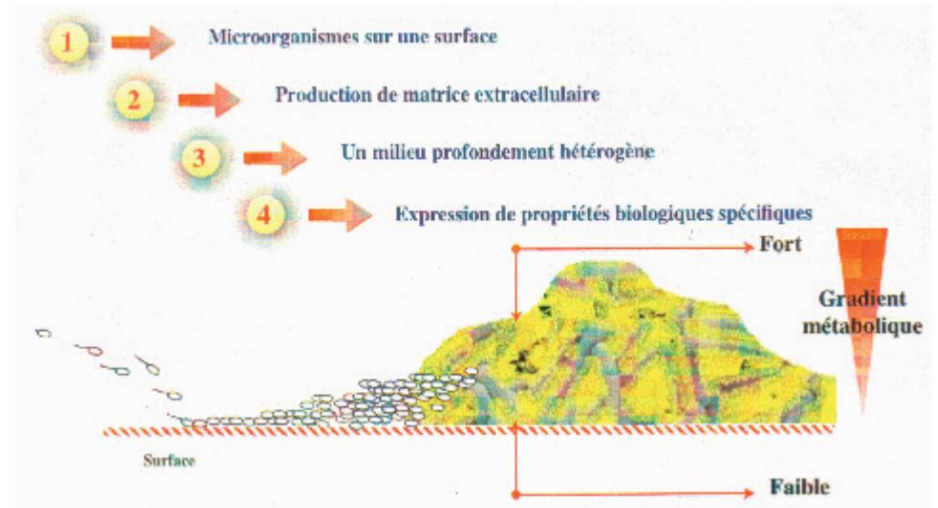
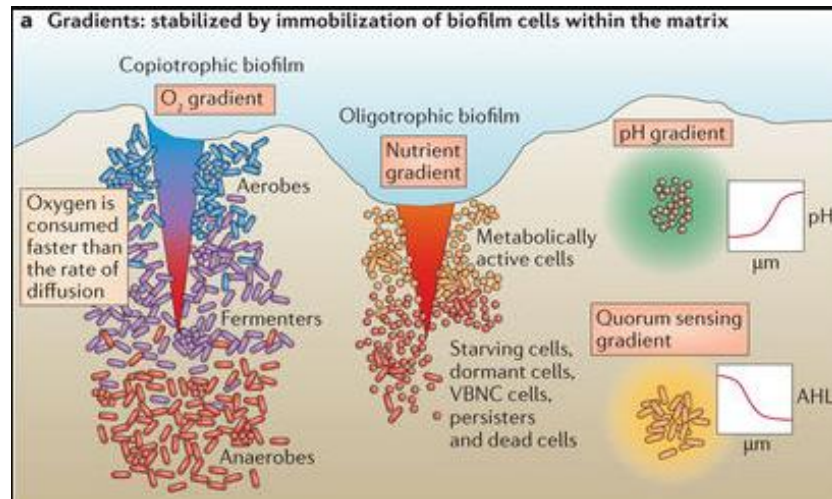


Figure 2 : Points clés de la définition du biofilm.

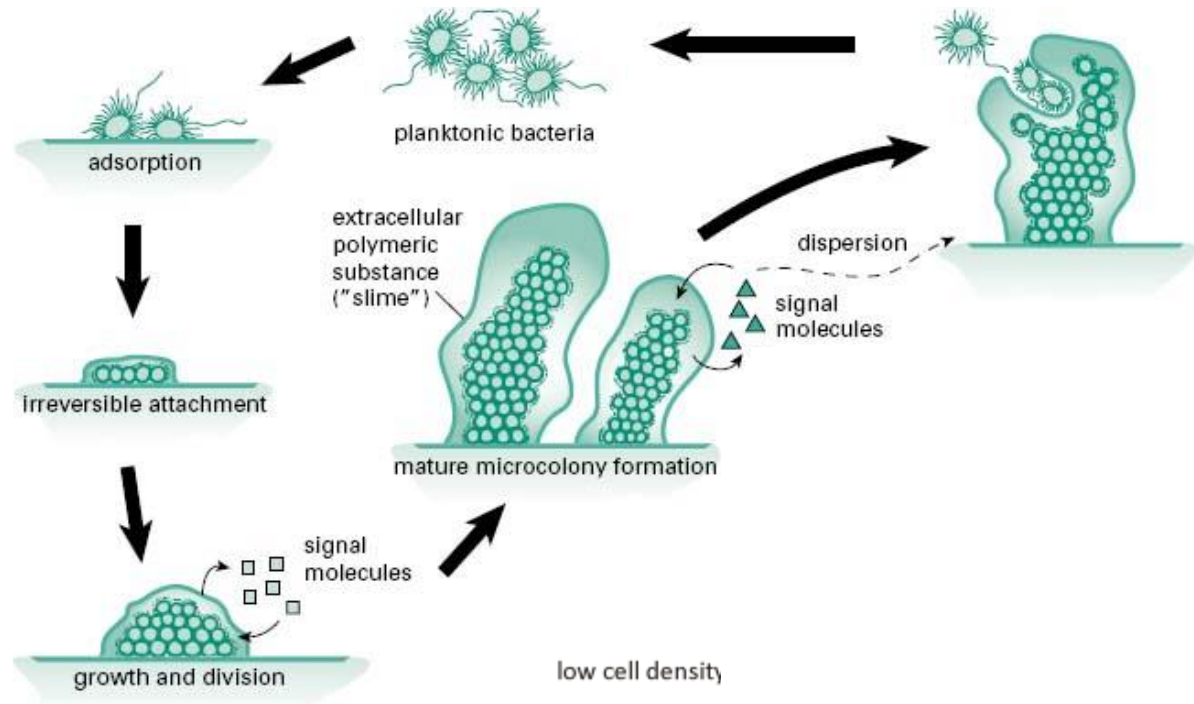
- ➔ Differente espressione genetica vs. planctonico
- ➔ Proprietà specifiche di morfologia, crescita, resistenza, comunicazione
- ➔ Cellule dormienti/quiescenti nel fondo

Quorum sensing

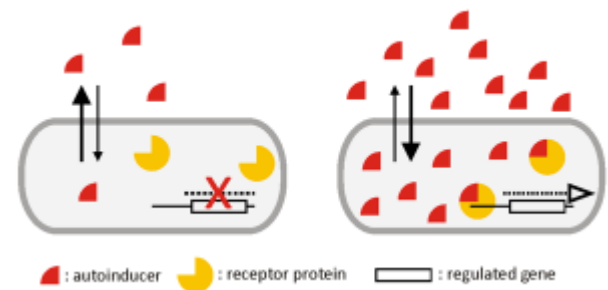
➤ Comunicazione da cellula a cellula nel biofilm

Più facile a causa della vicinanza

- Produzione, secrezione e rilevazione di molecole di segnale dette autoinduttori
- La chiave è la densità cellulare
- Permette l'adozione di specifici comportamenti all'interno della comunità per regolazione dell'espressione genetica



low cell density



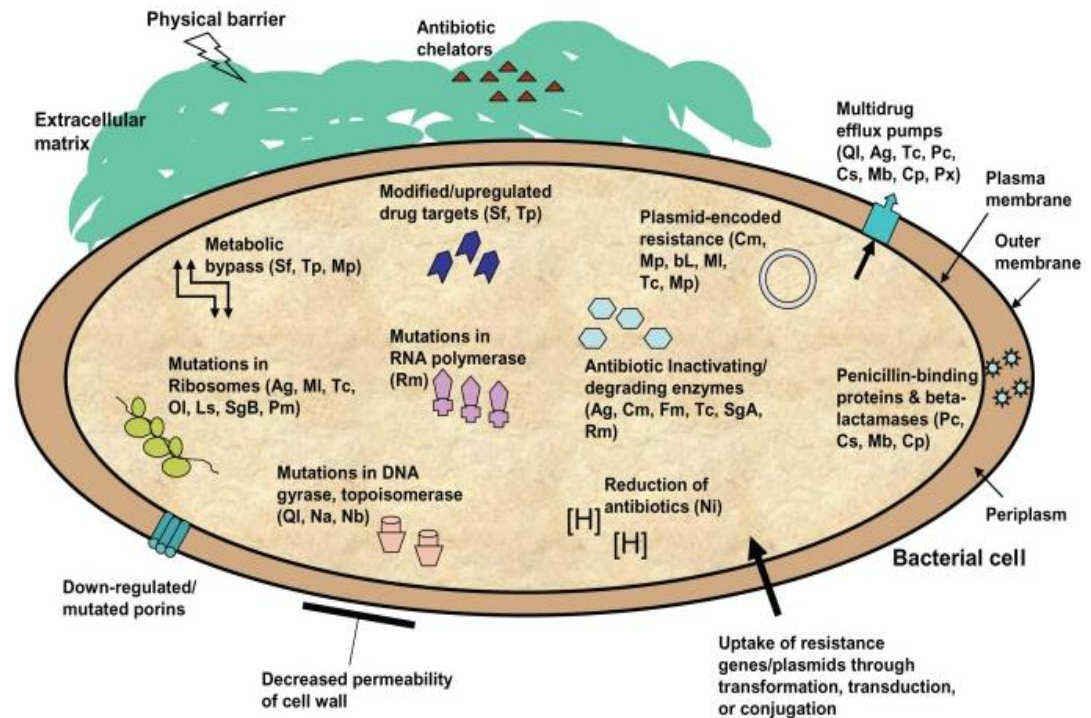
➔ I batteri si comportano come un organismo multicellulare

Resistenza agli antimicrobici

➤ Antibiotici e Biocidi

➤ Meccanismi di resistenza:

- Diffusione limitata attraverso il biofilm
- Resistenza mediata da enzimi
- Interazione e neutralizzazione delle sostanze antimicrobiche dal biofilm (neutralizzate da molecole o dal microambiente)
- Stato metabolico dei microrganismi nel biofilm (dormienza)
- Blocchi alla penetrazione (strutture di membrane, Pompe di efflusso)
- Geni di resistenza

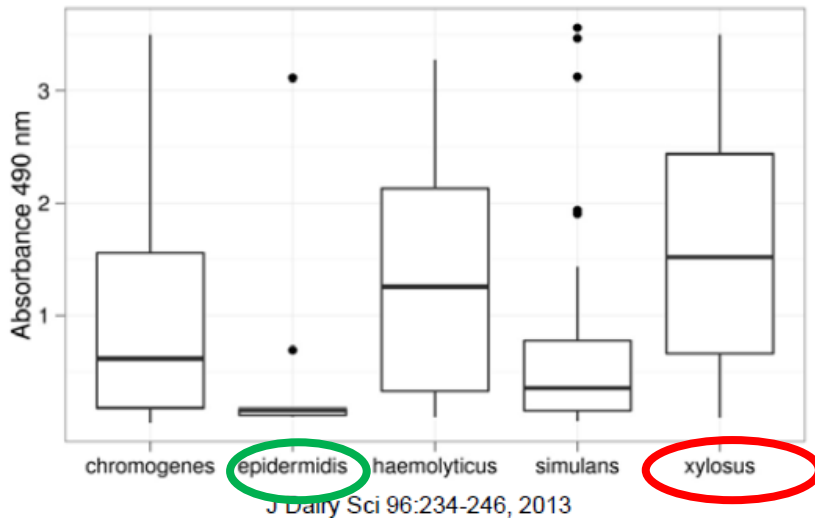


Resistenza agli antimicrobici

- Impatto sull'efficacia del biocida di Staphylococcus spp. Coagulasi Negativo isolati da bovine con mastite

MIC (minimal inhibition concentration) \neq MBEC (minimal biofilm eradication concentration)

Aibilità di formare biofilm



Resistenza a PenicillinaG/Novabiocine

Souches de SCN	CMI	CMEB	X
<i>S. chromogenes</i> 40800059	$\leq 0.5/2$	64/256	128
<i>S. chromogenes</i> 40700281	2/8	>1024/ 4096	>512
<i>S. simulans</i> 32300284	$\leq 0.5/2$	16/64	32
<i>S. xylosus</i> 41206492	$\leq 0.5/2$	8/32	16
<i>S. epidermidis</i> 41500743	$\leq 0.5/2$	64/256	128

CMI: concentration minimale inhibitrice (ug/ml)

CMEB: concentration minimale pour éradiquer un biofilm (ug/ml)

Resistenza ai disinfettanti

- La penetrazione è influenzata
- Matrice multistrato con EPS

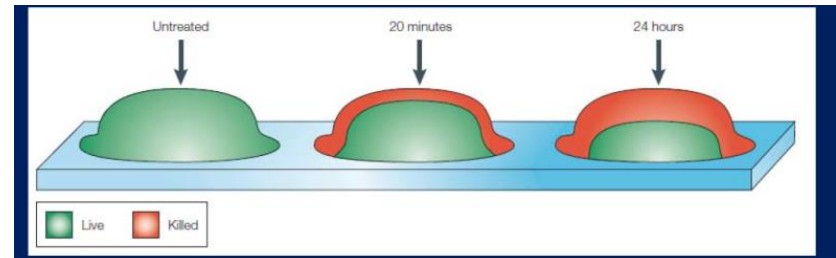


Table 2. Effect of disinfectants on the planktonic cells after treatment for 10 minutes

Disinfectants	Microorganisms					
	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. coli</i>	
	Mean ^a	SD ^b	Mean ^a	SD ^b	Mean ^a	SD ^b
Iodine	0 ± 0	(3) ^c	0 ± 0	(3)	0 ± 0	(3)
Biguanide	0 ± 0	(3)	0 ± 0	(3)	0 ± 0	(3)
Quaternary ammonium	0 ± 0	(3)	0 ± 0	(3)	0 ± 0	(3)
Peracetic acid	0 ± 0	(3)	0 ± 0	(3)	0 ± 0	(3)
Sodium hypochlorite	0 ± 0	(3)	0 ± 0	(3)	0 ± 0	(3)
Positive control ^d	5.4 ± 0.1	(3)	5.6 ± 0.1	(3)	5.6 ± 0.2	(3)

^a Mean, log CFU/cm²

^b SD, standard deviation

^c Numbers in parentheses indicate number of experiments

^d Positive control, biofilm cells not treated with disinfectants

Resistenza ai disinfettanti

- La penetrazione è influenzata
 - Matrice multistrato con EPS

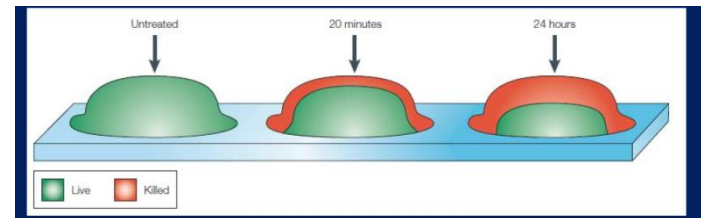


Table 1. Effect of disinfectants on biofilm cells after treatment for 10 minutes

Disinfectants	Microorganisms					
	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. coli</i>	
	Mean ^a	SD ^b	Mean ^a	SD ^b	Mean ^a	SD ^b
Iodine	2.4 ± 1.1	(3) ^c	2.0 ± 0.0	(3)	0.8 ± 1.2	(3)
Biguanide	3.3 ± 1.2	(3)	2.9 ± 0.8	(3)	2.2 ± 0.5	(3)
Quaternary ammonium	2.8 ± 2.5	(3)	1.4 ± 0.4	(3)	1.7 ± 0.5	(3)
Peracetic acid	0.7 ± 0.7	(3)	1.1 ± 0.1	(3)	2.1 ± 0.3	(3)
Sodium hypochlorite	0.2 ± 0.3	(3)	1.0 ± 0.0	(3)	0.3 ± 0.3	(3)
Positive control ^d	5.9 ± 0.8	(3)	6.3 ± 0.6	(3)	4.7 ± 0.4	(3)

^a Mean, log CFU/cm²

^b SD, standard deviation

^c Numbers in parentheses indicate number of experiments

^d Positive control, biofilm cells not treated with disinfectants

Aumento della resistenza a prodotti antimicrobici (antibiotici, disinfettanti)

➔ I batteri nei biofilm sono da **10 a 1000** volte più resistenti dei batteri planctonici

Dinamiche di colonizzazione

➤ Importanza della dispersione

Il processo di dispersione del biofilm è il punto iniziale nelle infezioni sistemiche dal momento che innesca il rilascio di batteri nell'ospite o nell'ambiente

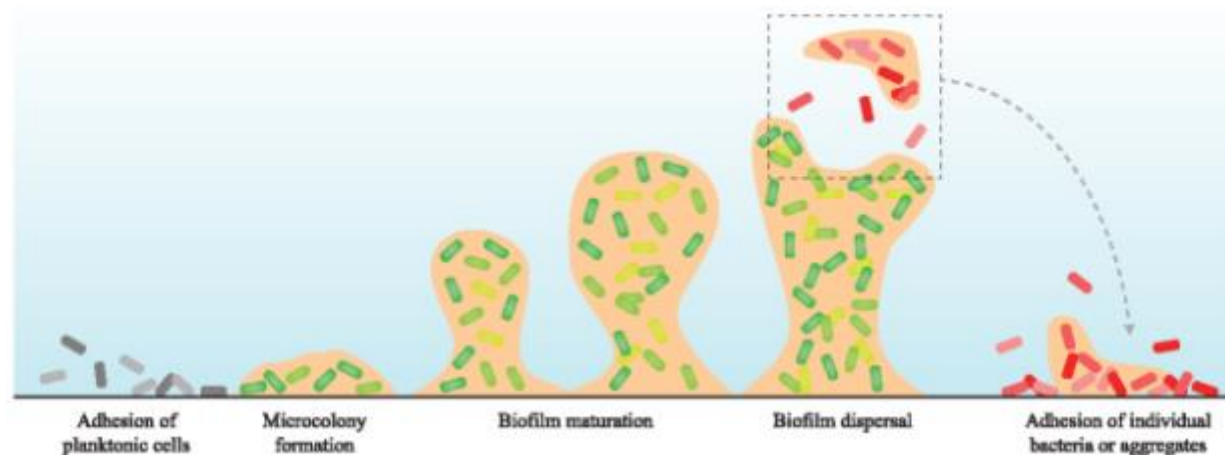
Segnali per la dispersione:

- Eccesso/carenza di nutrienti
- Aumento temperatura
- Limitazioni di O₂
- Variazioni di pH
- Densità cellulare
- Segnali cellulari dell'ospite

Proprietà specifiche:

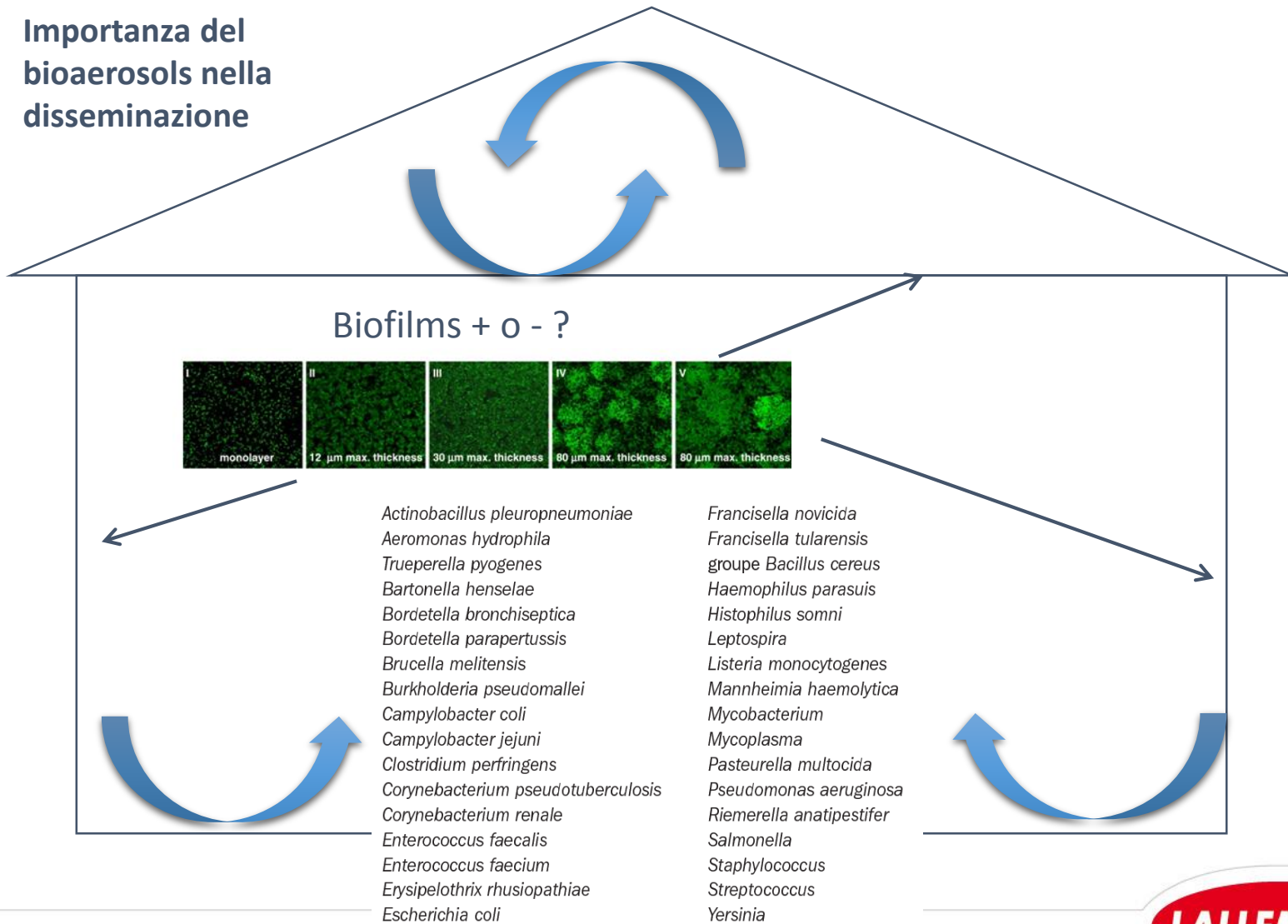
- Incluso aumento dell'espressione dei fattori di adesione e virulenza, comparati con i batteri planctonici o batteri sessili

→ **Cellule individuali e aggregati cellulari conferiscono un vantaggio alla popolazione dispersa in un'ampia varietà di ambienti**

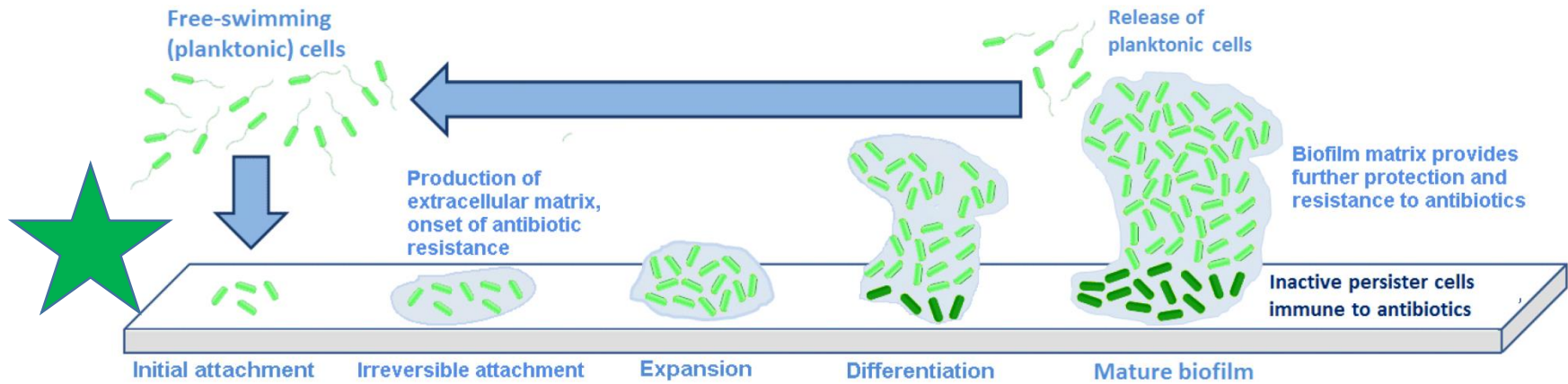


Biofilm nell'ambiente di allevamento

➤ **Importanza del bioaerosols nella disseminazione**



Come controllare al meglio il biofilm?



GESTIONE DELLA BIOSICUREZZA

Limitare l'adesione

Destutturazione del Biofilm

Eliminazione del Biofilm

Biosurfactanti

Enzimi

Azione meccanica

Biofilm positivi

Molecole di inibizione

Azione chimica

Materiali

Batteriofagi

Batteriocine

Biosecurezza come soluzione principale per gestire i biofilm

➤ Rispetto delle regole igieniche tra le bande, incluse le fasi di pulizia /disinfezione:

1. Preparazione della stanza e delle superfici

- Rimozione del letame
- Rimozione della polvere
- Rimozione dell'attrezzatura mobile

2. Detersione

- Pulizia con acqua
- Applicazione del detersivo (materiali, dosaggio, tempo di contatto)
- Risciacquare con acqua a pressione

3. Pulizia dell'impianto idrico

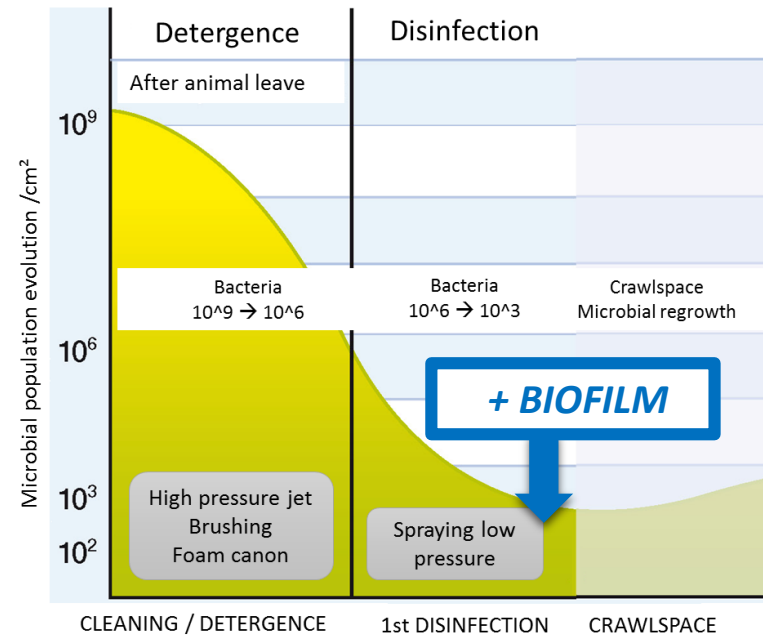
4. Disinfezione

- Applicazione del disinfettante (materiali, dosaggio, tempo di contatto)

+ 5. Applicazione di un biofilm positivo :

Estensione dell'effetto della disinfezione

Può essere applicato in presenza di animali



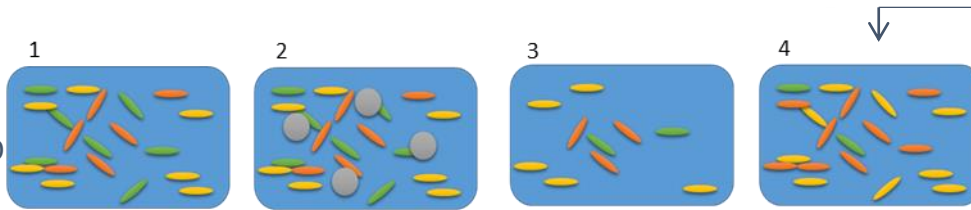
Fonte immagine: adattata da AG France, 2015

Concetto di biofilm positivo

- **Prevenire lo sviluppo di batteri indesiderabili che possono essere potenzialmente patogeni**



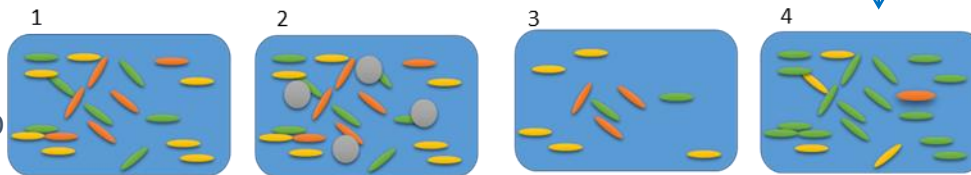
Senza
BIOFILM POSITIVO



Ricolonizzazione e ricostituzione
del biofilm da batteri presenti
nell'ambiente

time

Con
BIOFILM POSITIVO

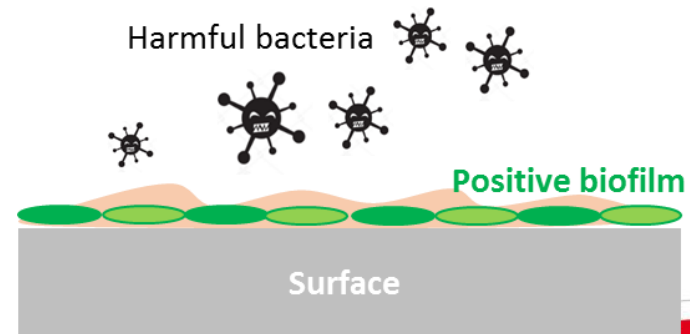


L'applicazione di un BIOFILM
POSITIVO apporta batteri
benefici che colonizzano la
superficie

time

- **Biofilm positivo: barriera protettiva contro batteri potenzialmente indesiderati**

Sviluppando inizialmente un biofilm positivo, non vi sono degli spazi vuoti da colonizzare per batteri indesiderati. Quindi evita la loro persistenza nell'ambiente animale.



Concetto di biofilm positivo

➤ Esempio di biofilm protettivo

Agricoltura

Protezione da biofilm nella rizosfera del frumento con *Pseudomonas chlororaphis* che produce tre antibiotici pigmentati denominati fenazine che inibiscono alcune patologie fungine
 → Strategia di Biocontrollo

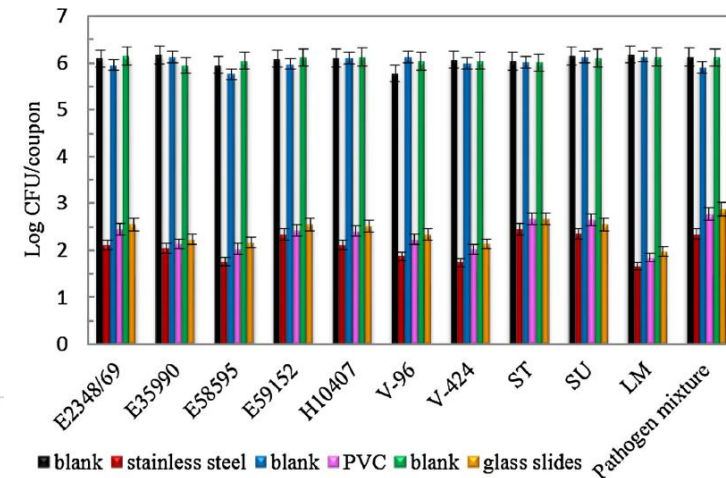
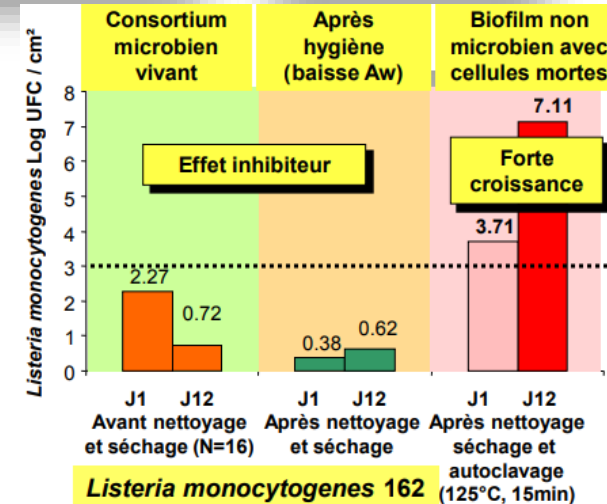
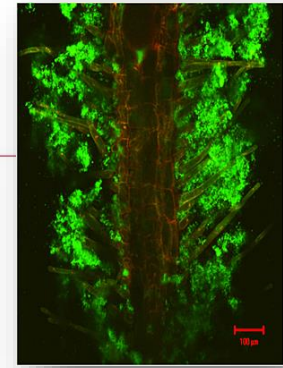
Alimenti

Scaffali di legno per formaggio vs. *Listeria*
 Flora microbica Naturale
 → Adattamento delle fasi di pulizia e disinfezione

Risultati In-vitro su superfici protette con *Pediococcus acidilactici*

→ Strategia per esclusione (*Pedio* biofilm preconstituito)

Il numero di cellule da biofilm di *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* su acciaio inossidabile, PVC e vetro erano effettivamente ridotti di circa 4 log UFC/superficie (Tan 2016)

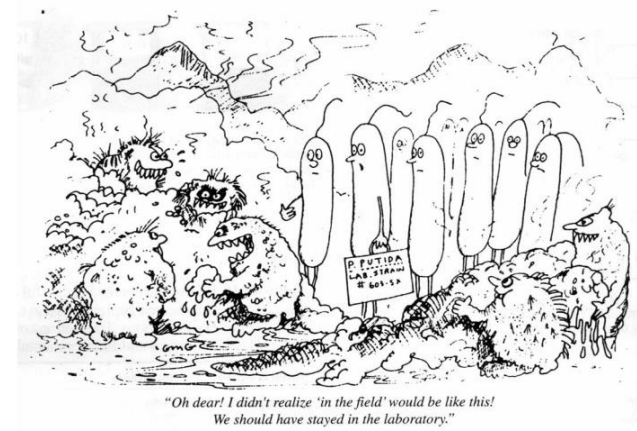


Conclusioni

- Un bio film negativo può causare un impatto negativo sulla salute degli animali
- Resistenza agli antimicrobici e agli antibiotici è in aumento
- Soluzioni alternative agli AB, e disinfettanti chimici, sono richieste
- Utilizzo di disinfettanti durante un ciclo produttivo non è permesso/raccomandato
- Ribilanciamento / orientamento della microflora è già utilizzata con successo in diversi settori incluso l'allevamento
 - Probiotici
 - Inoculi per insilati
- Gli stessi principi sono applicabili all'ambiente

IMPLEMENTAZIONE DI UN BIOFILM POSITIVO E PROTETTIVO

Lab Biofilms vs Industrial Biofilms



Courtesy of Center for Biofilm Engineering, Montana State University

PREVENZIONE

SICUREZZA

NOTICE: This presentation and its contents including any research data is, unless otherwise specifically attributed, the intellectual property of Lallemand Animal Nutrition, a trading division of Lallemand Inc (“Lallemand”) and may not be copied or reproduced or distributed, in whole or in part, without the prior consent of Lallemand.

DISCLAIMER: Although reasonable care has been taken to ensure that any facts stated in this presentation are accurate and that any opinions or advice expressed are fair and reasonable, no warranty is given as to the accuracy, completeness or correctness of the information. To the extent permitted by law, Lallemand, its officers, employees and agents shall not be liable for any loss suffered, howsoever arising, from the use by a third party of the information, advice or opinions contained within this presentation. This presentation does not constitute an offer, invitation, solicitation or recommendation with respect to the purchase of Lallemand products and information within, including the specifications of products, may be amended or withdrawn without prior notice. This presentation may contain information on products which are not available for sale nor are approved for use within certain jurisdictions.

Fonti bibliografiche

- Center for Biofilm Engineering - Montana State University. www.biofilm.montana.edu/
- Maukonen J., Mättö J., Wirtanen G., Raaska L., Mattila-Sandholm T., Saarela M. (2003) “Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review”. J Ind Microbiol Biotechnol. 30, 327–356.
- Briandet R., Fechner L., Naïtali M., Dreanno N. (2012) “Biofilms, quand les microbes s'organisent”. France, QUAE, collection Carnet de sciences.
- Richards J.J., Melander C. (2009) “Controlling bacterial biofilms”. ChemBioChem. 10, 2287–2294.
- Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A., Percival S.L. (2007) “Biofilms and their relevance to veterinary medicine”. Vet. Microbiol. 121, 1–2, 1–17.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999) “Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections”. Science. 284, 1318–1322.
- Tremblay Y., Hathroubi S., Mario J., (2014) “Bacterial biofilms: their importance in animal health and in public health”. Can J Vet Res. 78, 110–116.
- Karatan E., Watnick P. (2009) “Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms”. Microbiol Mol Biol Rev. 73, 310–347.
- Sauer K. (2003) “The genomics and proteomics of biofilm formation”. [Genome Biol.](http://www.genome-biol.org/) 4, 219.
- Evans L.V. (2000) “Biofilms: recent advances in their study and control”. Amsterdam, Harwood Academic Publishers.
- Donlan R.M. (2001) “Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process”. Clin Infect Dis. 33, 1387–1392.
- Ahmer B.M. (2004) “Cell-to cell signaling in Eschericia coli and Salmonella enterica” Mol. Microbiol. 52, 933–945.
- Miller M.B., Bassler B.L. (2001) “Quorum sensing in bacteria”. Annu Rev Microbiol. 55, 165–99.
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., Read, R. R. (2002). “Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics”. Can J Vet Res. 66, 86–92.

Fonti bibliografiche

- Sanchez-Vizueté P., Orgaz B., Aymerich S., Le Coq D., Briandet R. (2015) "Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms". *Front. Microbiol.* 6, 705.
- Chillaci D., Vitale M. (2012) "Biofilm Related to Animal Health, Zoonosis and Food Transmitted Diseases: Alternative Targets for Antimicrobial Strategy?". *J Microbial Biochem Technol.* 4, 7-10.
- Correge I., Fourchon P., Le Brun T., Berthelot N. (2012) "Biosecurity and hygiene in pig farms: current status and impact on technical and economic performances". *Journées Recherche Porcine, France.* 44, 101-102.
- Cameron R.D.A. (2000) "A review of the industrialisation of pig production worldwide with particular reference to asia". *Animal Health and Area-wide Integration.*
- Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hébraud M., Bernardi T. (2007) "A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria". *J. Microbiol. Methods,* 68, 605-612.
- Azeredo J., Azevedo N.F., Briandet R., Cerca N., Coenye T., Costa A.R., Desvaux M., Di Bonaventura G., Hébraud M., Jaglic Z., Kačániová M., Knøchel S., Lourenço A., Mergulhão F., Meyer R.L., Nychas G., Simões M., Tresse O., Sternberg C. (2017) "Critical review on biofilm methods". *Crit Rev Microbiol.* 43, 313-351.
- Johani, K. et al 2017. Characterization of microbial community composition, antimicrobial resistance and biofilm on intensive care surfaces. *Journal of Infection and Public Health* , Volume 0 , Issue 0
- Hu H, et al., Intensive care unit environmental surfaces are contaminated by multidrug-resistant bacteria in biofilms: combined results of conventional culture, pyrosequencing, scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy, *Journal of Hospital Infection* (2015)