

**Le infezioni di cranioplastica: basi sperimentali per la sostituzione immediata dei sostituti cranici infetti in relazione alle differenti specie batteriche ed all'evidenza clinica**



**Clinica di Neurochirurgia  
Università Politecnica delle Marche  
Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Anno Accademico 2020-2022**

**Dottorando**

**Dr Alessandro Di Rienzo**

**Relatore**

**Prof. Maurizio Iacoangeli**

## **Indice generale**

<b>Introduzione</b>	<b>pag. 3</b>
<b>Capitolo I: Cranioplastica, storia e materiali</b>	<b>pag. 5</b>
<b>Capitolo II: Le infezioni di cranioplastica. L’impatto della letteratura sulle conoscenze attuali</b>	<b>pag.19</b>
<b>Capitolo III: Fenomenologia delle infezioni di cranioplastica</b>	<b>pag. 50</b>
<b>Capitolo IV: Il trattamento chirurgico, lo stato dell’arte</b>	<b>pag. 68</b>
<b>Capitolo V: La flora batterica negli impianti neurochirurgici</b>	<b>pag. 79</b>
<b>Capitolo VI: Biofilm, il nemico semiconosciuto</b>	<b>pag.93</b>
<b>Capitolo VII: Dalla teoria alla pratica, una visione d’insieme della complessa interazione fra biofilm e protesi nella medicina moderna</b>	<b>pag. 129</b>
<b>Capitolo VIII: La nostra esperienza sperimentale</b>	<b>pag.167</b>
<b>Capitolo IX: dalla sperimentazione di laboratorio all’analisi dei risultati clinici</b>	<b>pag. 220</b>
<b>Considerazioni conclusive</b>	<b>pag. 224</b>

## **Introduzione**

Le infezioni di cranioplastica rappresentano uno dei temi di maggiore attualità nella disciplina neurochirurgica. Il risorgere a nuova vita dell'impiego della craniectomia decompressiva ed il frequente selezionarsi nei pazienti decompressi di germi ospedalieri ad elevata aggressività, resistenti a pressochè tutte le molecole antibiotiche disponibili, hanno focalizzato l'attenzione su questo fenomeno. L'antico paradigma secondo il quale rimuovere una porzione di osso autologo infettatosi dopo essere stata reinserita nella sua posizione naturale e sostituirla con un materiale plastico (n.b., al tempo consistente nella sola resina acrilica modellata a mano e nelle mesh di titanio) dopo un adeguato periodo di attesa (6 -12 mesi), sembra non essersi modificata significativamente negli ultimi 40 anni. Nonostante ciò, esiste ormai una serie di resoconti, per lo più aneddotici ma in costante incremento, di casi nei quali l'attesa di tale periodo di tempo non sembra avere un reale impatto in termini di incremento della sicurezza di posizionamento di un nuovo impianto. A ciò vanno aggiunti i reports di pazienti per i quali attendere potrebbe essere difficoltoso o impossibile per varie ragioni (presenza di valvole controlaterali con seri problemi di difficile controllo dello shunt, rapido deterioramento neurologico in caso di riapertura della scatola cranica per comparsa di sindrome da sinking flap). Non vanno infine dimenticati i casi di fallimento, peraltro già ben noti in passato, di posizionamenti di cranioplastica rapidamente naufragati per il recidivare di infezione dopo breve tempo. Una maggiore conoscenza della fisiopatologia cerebrale a cranio aperto (particolarmente in relazione alla dinamica liquorale ed agli influssi sulla vascolarizzazione) e l'introduzione in commercio di sostituti cranici progressivamente più tecnologizzati, sembrano entrambi elementi in grado di pesare sulla vecchia attitudine identificata con la triade remove-wait-replace.

Il presente lavoro è partito esattamente da queste considerazioni e dall'evidenza clinica accumulata in alcuni casi, inizialmente isolati, di trattamento in pazienti nei quali l'opzione di mantenere aperto il comparto cranico per attendere l'efficacia della bonifica microbica presentava comunque rischi inaccettabili.

A ciò va aggiunta l'aumentata coscienza da parte dei pazienti della propria condizione e la necessità emergente del paziente stesso di partecipare attivamente a scelte terapeutiche che avranno un profondo impatto non solo sul suo quadro neurologico ma potenzialmente anche su quello sociale e dell'autostima personale, insieme con la subentrata maggiore offerta terapeutica di antibiotici sempre più potenti, che uniti ad una più spinta aggressività chirurgica in sede di cleaning del focolaio infettivo potrebbero rappresentare gli elementi chiave per una nuova svolta in questo campo.

## Capitolo I: Cranioplastica, storia e materiali

Con il termine di cranioplastica si intende genericamente la procedura effettuata per ricostruire difetti cranici di varia entità. Sebbene originariamente e, come lo stesso termine sottintende, con cranioplastica si definisse la sostituzione di una porzione di osso cranico con un materiale alternativo, nel tempo questo concetto si è progressivamente modificato, in particolare in seguito alla già citata rinascita a nuova vita del trattamento di craniectomia decompressiva. Il riposizionamento della porzione di osso rimossa in occasione di tale evento e preservata secondo differenti modalità, ha finito negli ultimi 20 anni per essere identificato anch'esso con la procedura di cranioplastica<sup>1</sup>. Da qui la necessità di distinguere una ricostruzione “autologa” da una “artificiale”. Nel tempo si sono osservati numerosi avanzamenti nel campo dei materiali alternativi all'osso autologo, divisi essenzialmente in due grandi categorie: biologici e sintetici<sup>2</sup>. I primi sono stati ulteriormente suddivisi in autologhi, allotrapianti, xenotrapianti<sup>3</sup>. Gli allotrapianti (materiale osseo e cartilagineo proveniente da cadavere) e gli xenotrapianti (materiale osseo di origine animale) sono stati gradualmente abbandonati, a causa degli elevati tassi di infezione, riassorbimento e rigetto. La storia dei materiali da cranioplastica è estremamente complessa, con alti e bassi legati ad entusiasmi iniziali poi rapidamente spentisi alla luce dei risultati clinici.

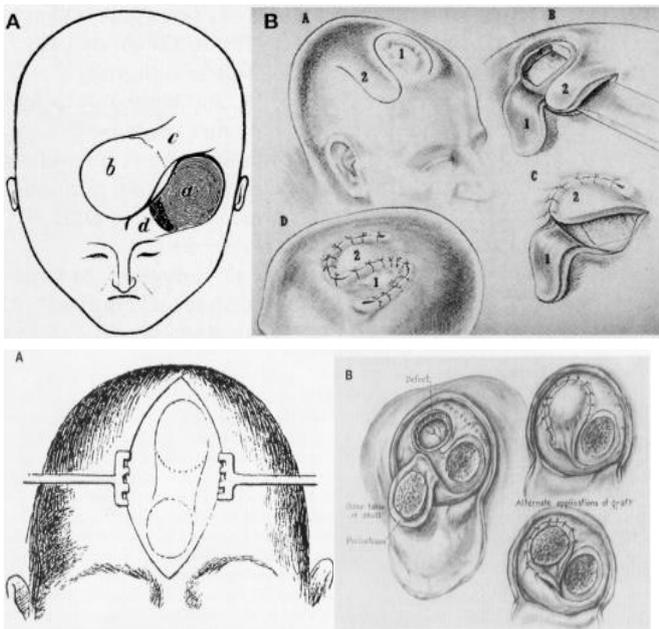
Nel 1668 il chirurgo olandese von Meekeren riportò nel suo libro, dal titolo le “Osservazioni Medico-Chirurgiche”, il primo vero innesto osseo con esito favorevole, effettuato utilizzando parti del cranio di un cane deceduto<sup>4</sup>.



La copertina del libro di von Meekeren, *Observationes Medico-Chirurgicae*

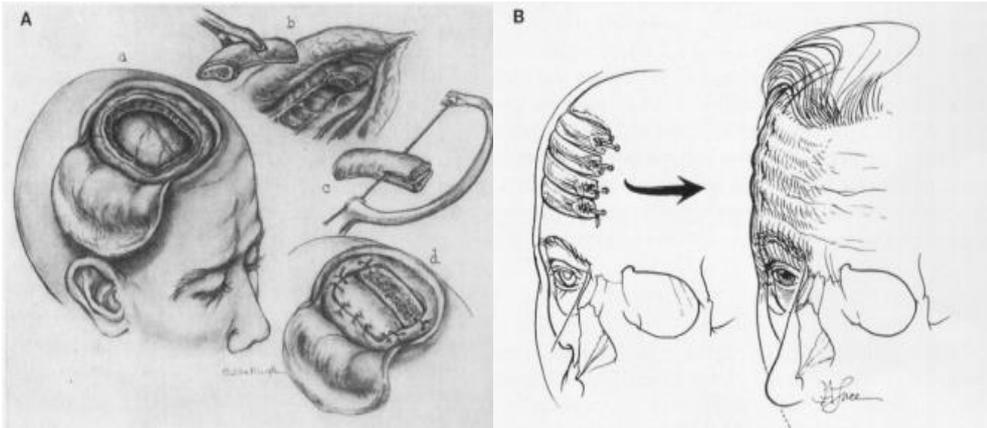
L'impianto era stato selezionato secondo una dimensione sufficiente a riempire il difetto osseo, creato nel cranio di un nobile da una ferita da spada. Prima di questo resoconto, Falloppio (1523-1562) descrisse l'uso di una lamina d'oro per sostituire una lacuna ossea in un paziente che aveva subito una lesione penetrante della dura madre. La maggior parte degli antichi tentativi simili a quello di Falloppio erano sostanzialmente consistiti nel posizionare rivestimenti o bendaggi sulle meningi esposte, pertanto non vere forme di cranioplastica. I concetti di auto-, allo e xenotrapianto vengono fatti risalire all'opera del chirurgo francese Ollier (1859)<sup>5</sup>.

Nel 1821, Walter fu il primo a documentare l'uso di un autotrapianto autologo allo scopo di chiudere un difetto osseo causato da una trapanazione cranica<sup>6</sup>. Il suo lavoro fu seguito da una serie di 3 tentativi, tutti riusciti, da parte di Macewen (1885), considerate il padre delle moderne tecniche di ricostruzione autologa<sup>6</sup>. Nonostante ciò, una caratteristica comune a queste procedure era l'estrema lentezza di guarigione delle ferite, messa in luce da Muller nel 1890<sup>5</sup>. Quest'ultimo fu il primo ad utilizzare un lembo di cute, periosteo e tavolato osseo esterno per riparare un difetto cranico. La prima modifica alla tecnica di Muller fu introdotta circa 5 anni dopo da Hacker, che utilizzò con successo solo il periostio ed il tavolato esterno.



**In alto la tecnica dei lembi gemelli di Muller-Koenig. In basso la tecnica di incisione e rotazione di Hacher (1903)**

Attraverso la storia sono stati utilizzati differenti tipo di materiale osseo, inclusi autotrapianti da tibia (Seydel, 1889), coste (Dobrotowoski 1911)<sup>7</sup>, scapola (Ropke, 1912), ilio (Mauclair, 1914) e sterno (Muller, 1915). Nel frattempo vennero fatti tentativi di trapiantare osso cosiddetto nudo, nel 1890 da tavolo osseo esterno (Sohr) e tibia (Axhausen, 27 pazienti).

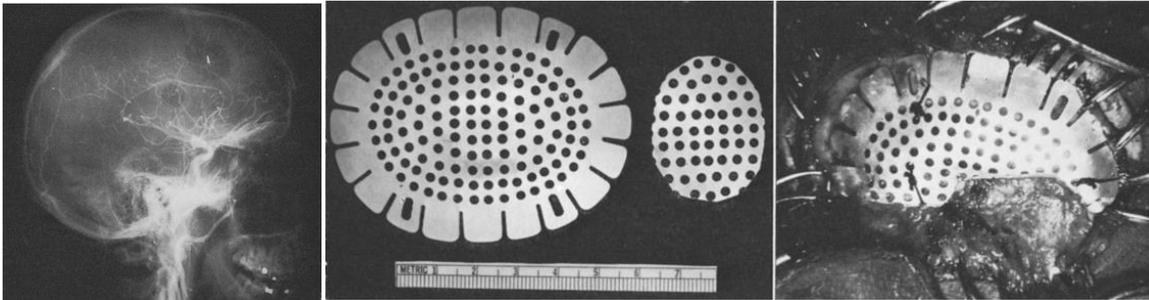


#### **Impianto cranico da coste (Dobrotowoski)**

L'uso delle coste venne rapidamente abbandonato, a causa delle complicanze respiratorie. Nonostante i progressivi miglioramenti, emerse rapidamente il nodo non sciolto della difficoltà di trovare impianti grandi abbastanza da colmare lacune ossee di ampie dimensioni, in unione con la difficoltà di modellare e fissare gli impianti stessi. Fra il 1915 ed il 1919 numerosi autori (Morestin, Gosset, Sicard, Dambrin) descrissero l'uso dell'osso da cadavere, in realtà rapidamente abbandonato a causa degli elevatissimi tassi di infezione e riassorbimento<sup>8</sup>. Allo stesso modo si vide rapidamente scomparire l'iniziale entusiasmo per gli innesti provenienti da animali.

Gli avanzamenti tecnologici emersi alla fine del XIX° secolo, in particolare l'incrementata conoscenza delle tecniche di lavorazione industriale dei metalli, cominciarono a far crescere l'interesse degli studiosi nei confronti di questi materiali, in associazione alla forte evidenza della loro resistenza e malleabilità. Nel 1893 Booth e Curtis furono i primi ad utilizzare l'alluminio, sebbene con esiti avversi. L'alluminio era in grado di fornire i risultati attesi sia in termini funzionali

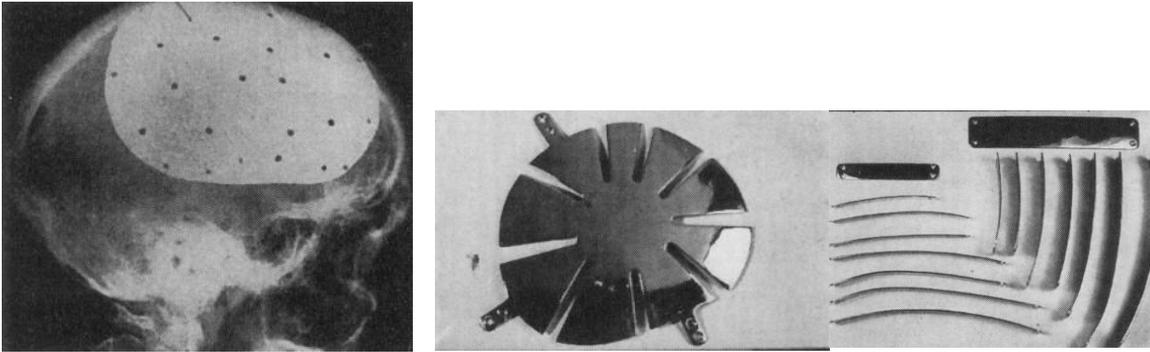
che cosmetici, ma si associava ad un'evidente aumento dei fenomeni epilettogeni ed irritativi, con pazienti che lamentavano spesso disturbi generici ma estremamente invalidanti come cefalea, nausea, stato confusionale, senso di calore locale. A ciò si associava un'elevata incidenza di fenomeni infettivi<sup>9</sup>.



**Dal lavoro storico del 1968 di Samuel Black, J. Neurosurgery: Aluminum Cranioplasty**

L'uso dell'oro per le cranioplastiche era ben noto sin dai tempi degli Incas. Nonostante ciò l'applicazione in epoca moderna subì in modo significativo la proibitività dei costi e dalla sostanziale incapacità del metallo a mantenere la resistenza per lungo tempo, essendo soggetto a facile deformabilità. I tentativi di utilizzare altri metalli, incluso il piombo, l'argento, il vitallio ed il tantalio (quest'ultimo forse quello dotato di un periodo di maggior fortuna), si conclusero piuttosto rapidamente a causa di alcuni svantaggi tecnici (il piombo ad esempio portava rapidamente ad intossicazione organica), difficoltà tecniche ed effetti collaterali soprattutto in termini di retrazione della cute e conseguente perforazione della stessa. In particolare l'argento divenne tristemente noto per la sua facile deformabilità, oltre che per la tendenza ad ossidarsi, con il conseguente cambiamento di colore della cute sovrastante gli impianti. Anche trasformato in maglie a rete non compatte, le complicanze non mostrarono alcuna riduzione di frequenza. Il tantalio, ampiamente utilizzato nella seconda guerra mondiale, divenne un materiale obsoleto soprattutto a causa della elevata conduttività termica e delle difficoltà di reperimento del materiale nella sua forma pura<sup>10,11</sup>. Il vitallio, una lega composta per il 65% da cobalto, per il 30% da cromo e il 5% da molibdeno, era stato in precedenza

usato per gli impianti dentali, mostrando una elevata proprietà anticorrosiva. Allo stesso modo il Ticonio, un'altra lega con in aggiunta una piccola quantità di nichel, venne popolarizzato negli anni '50. In nessuno dei due casi però il materiale fu trovato soddisfacente e progressivamente queste leghe scomparvero dalla pratica clinica.



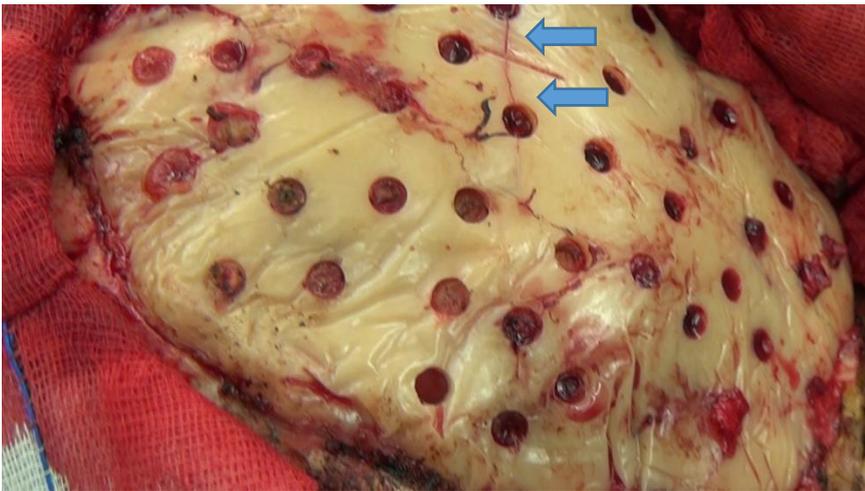
**Pudenz e Fulcher, 1943: uso del tantalio per le ferite di guerra**

La storia dei materiali metallici cambiò sostanzialmente con l'ingresso sul mercato del Titanio (Simpson, 1965) metallo leggero, lucido, resistente alla corrosione, ampiamente disponibile in quanto recuperabile in numerosi minerali (principalmente rutilo e ilmenite) e del tutto atossico<sup>12</sup>. Il titanio è divenuto per questo il metallo principe sostitutivo a livello cranico, evolvendosi per primo nelle nuove forme di plastiche computerizzate tridimensionali custom-made.



### **Un esempio di rete in titanio emisferica**

Il polimetilmetacrilato o PMMA (come iniziò ad essere chiamato dalla sigla dei suoi elementi di base), aveva diversi vantaggi rispetto ai suoi cugini metallici. Era infatti facile da modellare, molto più leggero, nettamente meno capace di accumulare e condurre calore, radiotrasparente. Dapprima usato negli animali venne poi rapidamente adattato agli esseri umani dopo la seconda guerra mondiale<sup>2</sup>.



**PMMA modellato a mano, Si notano le irregolarità nella curvatura ed una possibile rima di frattura (freccia)**

Gli esperimenti sugli animali avevano infatti dimostrato che l'acrilico aderiva alla dura madre senza reazioni sugli strati circostanti. Utilizzato ampiamente nel lavoro di Spence (1954), per alcuni anni venne ferocemente criticato dati i rischi di rottura, legati prevalentemente alla formazione di bolle durante la manovra di confezionamento manuale. Uno degli elementi problematici del PMMA era insito nella procedura di preparazione, durante la quale si determina una reazione esotermica, con sviluppo di temperature elevate potenzialmente dannose. Proprio durante tale fase il materiale cominciava ad indurirsi, prendendo curvature spesso non corrispondenti a quanto inizialmente progettato, motivo per il quale era necessario continuare la modellazione irrigando con elevate quantità di soluzione fisiologica fredda, fino al completamento della consolidazione, ove possibile mantenendo il contatto con il difetto osseo, ponendo pertanto a rischio di danno termico il tessuto cerebrale.

Uno dei materiali più interessanti introdotti negli ultimi vent'anni sul mercato è stato sicuramente l'idrossiapatite.



**Cranioplastica in idrossiapatite, fissata con mesh in titanio ai bordi. Punti transdurali attraversano la cranioplastica stessa.**

Composta da una struttura di base identica alla matrice inorganica dell'osso (fosfato tricalcico), l'idrossiapatite è quanto di più vicino all'osso stesso l'uomo sia riuscito a realizzare. E' dotata di macropori e proprietà osteogeniche, grazie alle quali può essere integrata in modo completo nell'osso in modelli animali. E' stata largamente utilizzata nella chirurgia pediatrica, grazie alle sue caratteristiche espansive, alla composizione chimica biomimetica ed alla flessibilità<sup>13</sup>. Nonostante ciò, la stessa natura biologica del materiale lo rende suscettibile ai fenomeni infettivi ed il processo di osteointegrazione non richiede meno di 6 mesi. La modellazione intraoperatoria delle protesi preformate è fortemente limitata dalla elevata infrangibilità, il profilo di struttura estremamente spesso, il che la rende poco adatta a pazienti con lembi cutanei particolarmente sottili o in cui, in seguito ad interventi multipli precedenti, la cute sia retratta e fissa. Infine, in caso di rimozione dopo l'avvenuta osteointegrazione, è necessario procedere ad una nuova craniotomia per estrarre l'impianto, che ha però la tendenza a frammentarsi liberando granuli potenzialmente in grado, se non rimossi in modo pressochè totale, di portare a granulomi a distanza e perforazioni del lembo. Va

aggiunto come la natura porosa sia della superficie esterna che di quella interna della cranioplastica sia associata ad una reazione cicatriziale imponente, con la formazione di veri e propri fittoni diretti dalla cute e dalla meninge verso l'impianto, con la conseguenza di rendere anche gli impianti non consolidati all'osso estremamente difficili da rimuovere. A causa di tali caratteristiche l'iniziale entusiasmo nei confronti di questo materiale si è progressivamente ridotto, rendendola prevalentemente indicata in pazienti in giovanissime età dove non si voglia rischiare l'impianto di materiali artificiali.

Il polietileterterchetone, anche noto come PEEK, è stato uno dei materiali di nuova generazione meglio accolti dal mercato<sup>14</sup>.

Il PEEK è un polimero aromatico con catene eteriche e chetoniche. Attualmente è disponibile come impianto prefabbricato paziente-specifico (PSI patient-specific implant). Tale procedura prevede l'esecuzione di una TC spirale a strato sottile con spessore di 0.1mm e gantry 0°, seguita dalla creazione di un modello digitale del difetto cranico e del circostante scheletro. Il modello digitale viene modificato secondo le esigenze, per poi essere approvato e prodotto.



**Cranioplastica in PEEK bifrontale. SI apprezza la perfetta unione dei due segmenti ed il fissaggio con placche ai bordi ossei circostanti.**

Come per gli altri impianti basati su tecnica computerizzata, il PEEK si adatta perfettamente al difetto in questione. In aggiunta all'elevata resistenza alle alte temperature, agli agenti chimici, le radiazioni e l'inerzia biologica, è dotato di numerosi vantaggi rispetto agli altri materiali alloplastici, in termini di tenuta, rigidità, durata, ridotta conduttività al calore e radiotrasparenza all'imaging. Inoltre ha significative proprietà elastiche e di assorbimento dell'energia, che rassomigliano più strettamente al titanio e forniscono una migliore protezione per il parenchima in assenza di qualunque interazione da attrito fra materiale e superficie ossea. Come nel caso dell'idrossiapatite e della resina acrilica preformata, i costi di produzione rappresentano il vero ostacolo, essendo compresi mediamente fra gli 8000 ed i 10000 euro.

Pochi anni prima dell'introduzione sul mercato del PEEK un altro materiale plastico venne significativamente pubblicizzato, il polietilene poroso<sup>15</sup>. Parzialmente malleabile, non rigido, biologicamente ben compatibile con i tessuti circostanti, ha incontrato una buona attenzione per difetti cranici di dimensioni limitate, in particolare nel distretto cranio-facciale. Proprio la scarsa rigidità e pertanto la limitata capacità di resistenza ad eventuali urti ne hanno però limitato considerevolmente l'uso per difetti cranici di grandi dimensioni, sebbene le poche serie che lo paragonavano ad altri materiali recenti sembrassero dare risultati più che soddisfacenti in termini di protezione da complicanze, in particolare di natura infettiva.

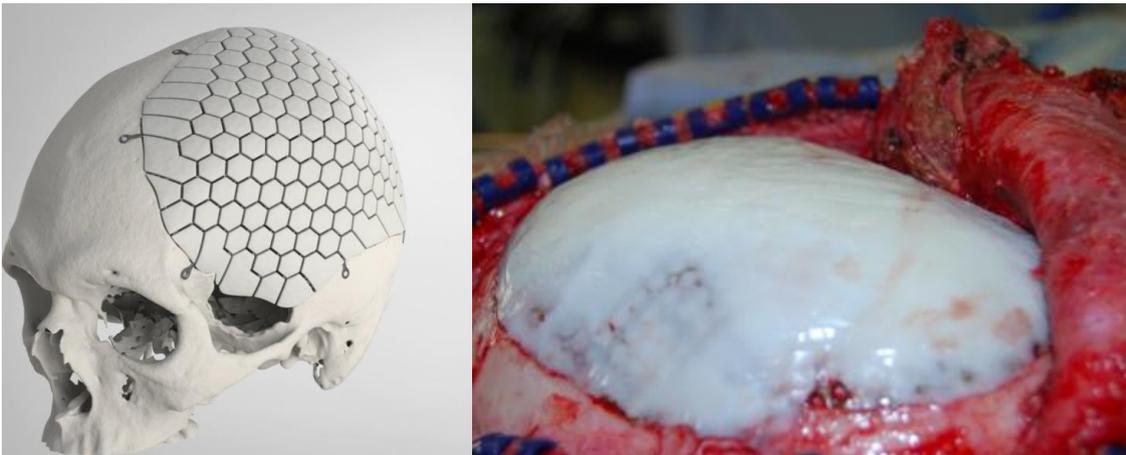
Uno degli aspetti da sempre più controversi nella storia dei materiali da cranioplastica è stato rappresentato dai rischi correlati alla mescolanza di sostanze differenti in caso il principale sostituto venisse ad essere, in sede intraoperatoria, insufficiente ai fini della copertura del difetto. Uno degli esempi è rappresentato dai primi periodi di criopreservazione dell'osso all'interno dell'addome, quando vi era la possibilità che al momento dell'estrazione lo stesso non fosse più del tutto compatibile con il gap craniectomico. In tali condizioni l'utilizzo delle reti in titanio a coprire lo spazio mancante o l'aggiunta di una copertura in resina acrilica modellata al momento

rappresentavano un evento non raro. Tali combinazioni di materiali sono però sempre state viste come un evento predittivo di maggiori complicanze, data la differente natura e caratteristiche bio-strutturali dei materiali associati. Da questo punto di vista l'associazione resina acrilica-mesh in titanio è stata indubbiamente una delle più temute. Se infatti da un lato l'irregolarità di profilo di un'acrilico non perfettamente modellato può essere facilmente ammorbidita da una copertura in titanio, il comportamento dei due materiali nei confronti dei tessuti circostanti è estremamente diverso, con la creazione di una sorta di ispessimento ad imbottitura intorno alla resina, rispetto alla crescita attraverso i pori della maglia in titanio. La rimozione di un impianto di tal genere in caso di infezione è stata tradizionalmente considerata come una delle situazioni di maggior rischio non solo per i tegumenti che coprono la calotta ma anche e soprattutto per il sottostante piano durale.

Nonostante ciò, proprio le combinazioni di differenti materiali sembrano essere oggi al centro di un rinnovato interesse. Due in particolare sono le soluzioni maggiormente rilevanti: 1) la realizzazione di impianti completamente in titanio ma i cui bordi non sono inerti, ospitando alloggiamenti per posizionamento di paste di idrossiapatite, così da colonizzare gradualmente nel tempo l'intera protesi; 2) il confezionamento di impianti custom made con base in titanio diviso in celle, di forma variabile, per lo più ad alveare esagonale, coperto da innesti in idrossiapatite, che vengono a costituire un guscio unico, completamente osteointegrabile<sup>16</sup>. Al momento l'esperienza con questi prodotti è assolutamente in fase iniziale, la più grande serie della prima tipologia di sostituto cranico è stata riportata da un centro americano nel 2022 con soli 18 casi raccolti in 3 anni. Sebbene le attuali stime di risultato siano buone, sarà necessario attendere dai 5 ai 10 anni per valutare l'effettivo impatto ma soprattutto i rischi e la difficoltà di trattamento di eventuali complicanze.

Sta inoltre emergendo una seconda nuova generazione di cranioplastiche, il cui progetto di base non è modificato in termini di struttura bensì di protezione dagli eventi infettivi grazie ad un bagno in antibiotici<sup>17-19</sup>.

Sebbene la copertura antibiotica mediante impregnazione fosse un'opzione in qualche modo già sperimentata in passato, in particolare grazie alle descrizioni in pazienti sottoposti a revisione di cranioplastiche infette che venivano rimosse, ri-sterilizzate ed appunto immerse in vancomicina o rifampicina, nonché di pazienti che venivano sottoposti ad una procedura di irrigazione continua nel post-operatorio, solitamente con vancomicina, per non meno di 72 ore, il concetto di questi nuovi impianti è completamente diverso.



**A sinistra protesi in titanio ricoperta da idrossiapatite. A destra, PMMA impregnato da antibiotico**

I primi ad essere realizzati con questa metodica sono stati i sostituti cranici in PMMA, in alcune serie impregnati con gentamicina, in altre con eritromicina e colistina. La casistica più ampia riportava 5 complicanze su 58 casi, una percentuale non indifferente ma parzialmente comprensibile in considerazione del fatto che tutti i pazienti erano già stati sottoposti in precedenza a revisioni fallite del cavo chirurgico.

Nonostante la continua innovazione in questo campo numerose domande restano ancora aperte: esiste il materiale sostitutivo perfetto, che possa essere impiantato con una relativa sicurezza di buon risultato clinico perdurante nel tempo e bassa incidenza di complicanze di tipo infettivo? Sarebbe eticamente corretto, se questo materiale esistesse, procedere direttamente al suo impianto anche al posto di un opercolo osseo autologo perfettamente preservato? Esistono indicazioni ad una scelta del

materiale in relazione alla tipologia di vita futura prevista per il paziente, ovvero alla sua autonomia funzionale?

Queste e molte altre domande restano in realtà ancora estremamente aperte.

## **Bibliografia**

- 1) Kiran S Mahapure 1, Dylan J Murray 2: "The historical timeline of cranioplasty". *J. Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2021 Mar;74(3):632-633. doi: 10.1016/j.bjps.2020.11.048. Epub 2020 Dec 9. DOI: 10.1016/j.bjps.2020.11.048
- 2) Harris DA, Fong AJ, Buchanan EP, Monson L, Khechoyan D, Lam S. History of synthetic materials in alloplastic cranioplasty. *Neurosurg Focus.* 2014 Apr;36(4):E20. doi: 10.3171/2014.2.FOCUS13560
- 3) Zanotti B, Zingaretti N, Verlicchi A, Robiony M, Alfieri A, Parodi PC: Cranioplasty: Review of Materials. *J Craniofac Surg.* 2016 Nov;27(8):2061-2072. doi: 10.1097/SCS.00000000000003025
- 4) Shah AM, Jung H, Skirboll S: Materials used in cranioplasty: a history and analysis. *Neurosurg Focus.* 2014 Apr;36(4):E19. doi: 10.3171/2014.2.FOCUS13561
- 5) J L Durand 1, D Renier, D Marchac. The history of cranioplasty. *Ann Chir Plast Esthet*1997 Feb;42(1):75-83
- 6) Alkhaibary A, Alharbi A, Alnefaie N, Oqalaa Almubarak A, Aloraidi A, Khairy S. Cranioplasty: A Comprehensive Review of the History, Materials, Surgical Aspects, and Complications. *World Neurosurg.* 2020 Jul;139:445-452. doi: 10.1016/j.wneu.2020.04.211. Epub 2020 May 6.

- 7) I R Munro, B Guyuron. Split-rib cranioplasty. *Ann Plast Surg.* 1981 Nov;7(5):341-6. doi: 10.1097/00000637-198111000-00001. DOI: 10.1097/00000637-198111000-00001 *Ann Chir Plast Esthet*
- 8) Aatman M. Shah. Henry Jung., and Stephen Skirboll. Materials used in cranioplasty: a history and analysis. *Neurosurg Focus* 36 (4):E19, 2014 doi.org/10.3171/2014.2.FOCUS13561
- 9) Samuel P. W. Black, Calvin C. M. Kam., And Warren P. Sights, Jr. Aluminum Cranioplasty Technical Note *J. Neurosurg.* / Volume 29 / November, 1968
- 10) Flanigan P, Kshetry VR, Benzel EC. World War II, tantalum, and the evolution of modern cranioplasty technique. *Neurosurg Focus.* 2014 Apr;36(4):E22. doi: 10.3171/2014.2.FOCUS13552.
- 11) TURNER OA. Tantalum cranioplasty and repeated trauma. *J Neurosurg.* 1952 Jan;9(1):100-3. doi: 10.3171/jns.1952.9.1.0100.
- 12) Barker FG. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery.* 1997 Oct;41(4):999. doi: 10.1097/00006123-199710000-00067.
- 13) Stefini R, Esposito G, Zanotti B, Iaccarino C, Fontanella MM, Servadei F. Use of "custom made" porous hydroxyapatite implants for cranioplasty: postoperative analysis of complications in 1549 patients. *Surg Neurol Int.* 2013;4:12. doi: 10.4103/2152-7806.106290. Epub 2013 Jan 28.
- 14) Punchak M, Chung LK, Lagman C, Bui TT, Lazareff J, Rezzadeh K, Jarrahy R, Yang I. Outcomes following polyetheretherketone (PEEK) cranioplasty: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Neurosci.* 2017 Jul;41:30-35. doi: 10.1016/j.jocn.2017.03.028. Epub 2017 Apr 1.
- 15) Liu JK, Gottfried ON, Cole CD, Dougherty WR, Couldwell WT. Porous polyethylene implant for cranioplasty and skull base reconstruction. *Neurosurg Focus.* 2004 Mar 15;16(3):ECP1. doi: 10.3171/foc.2004.16.3.14.

- 16) D Henderson, S Sinha. OssDsign cranioplasty in children: a single-centre experience. *Childs Nerv Syst* . 2020 Aug;36(8):1773-1776. doi: 10.1007/s00381-020-04584-9. Epub 2020 Mar 25
- 17) Hsu VM, Tahiri Y, Wilson AJ, Grady MS, Taylor JA. A preliminary report on the use of antibiotic-impregnated methyl methacrylate in salvage cranioplasty. *J Craniofac Surg*. 2014 Mar;25(2):393-6. doi: 10.1097/SCS.0000000000000655.
- 18) Ogino A, Nakamichi M, Takeda K, Onishi K. Cranial Reconstruction Using Antibiotic-Impregnated Calcium Phosphate Bone Cement With a Titanium Mesh Sheet. *J Craniofac Surg*. 2020 Jul-Aug;31(5):1452-1454. doi: 10.1097/SCS.00000000000006427.
- 19) Worm PV, do Nascimento TL, do Couto Nicola F, Sanches EF, Dos Santos Moreira CF, Rogério LP, Dos Reis MM, Finger G, Collares MV. Polymethylmethacrylate imbedded with antibiotics cranioplasty: An infection solution for moderate and large defects reconstruction? *Surg Neurol Int*. 2016 Nov 9;7(Suppl 28):S746-S751. doi: 10.4103/2152-7806.193725. eCollection 2016.

## **Capitolo II: Le infezioni di cranioplastica. L'impatto della letteratura sulle conoscenze attuali**

Le infezioni di cranioplastica rappresentano uno dei principali capitoli della attuale neurochirurgia, a livello mondiale. Come già accennato in precedenza, il risorgere a nuova vita delle tecniche di craniectomia decompressiva, ha portato ad una incredibile mole di reinterventi per il riposizionamento degli opercoli in precedenza rimossi. La riapertura di lembi cutanei di dimensioni ragguardevoli, in pazienti spesso sottoposti a prolungati periodi nei reparti di rianimazione, ove la colonizzazione dell'organismo da parte di germi super-selezionati ed ormai, spesso, multi- o toti-resistenti alle terapie antibiotiche, incluse quelle di ultima generazione, è un fatto comune, rende già di per sé questi interventi gravati da un elevato rischio di carattere infettivo. A ciò va aggiunto che le condizioni neurologiche di tale categoria di pazienti sono frequentemente, spesso anche nelle fasi pre-riposizionamento, gravemente scadute, raramente il livello di coscienza, anche solo parziale, viene ripristinato prima di 3-4 settimane, il che espone ad una severa riduzione delle difese immunitarie. Non va inoltre dimenticato che molti di questi pazienti, per quanto la nutrizione venga rapidamente iniziata allo scopo di mantenere il metabolismo in una forma attiva, nelle prime fasi sviluppano una tendenza catabolica, che li vede indebolirsi ancora più di quanto la condizione di partenza stessa porterebbe a prevedere. Non va poi dimenticato che in questi casi il paziente è spesso affetto da problematiche multiple, parte delle quali preesistenti all'evento che lo ha condotto in terapia intensiva, parte legate proprio a quest'ultimo. Può essere fatto l'esempio di un soggetto politraumatizzato, con fratture delle ossa lunghe e trauma addominale, che abbiano anch'essi richiesto una procedura chirurgica. La presenza di ferite multiple, semi-contemporanea o contemporanea, aumenta enormemente il rischio di infezione non solo del distretto cranico ma anche di tutti gli altri ed ovviamente viceversa. Pazienti di questo genere sono spesso affetti da complicanze respiratorie, con drenaggi toracici per pneumotorace o consolidazioni polmonari associate con focolai pneumonitici conseguenti a fenomeni di ab ingestis o legati alla perdita di autonomia respiratoria al momento dell'intubazione su strada. Per tutti i predetti motivi, il rischio infettivo di un paziente simile

è estremamente elevato anche se il paziente stesso è in giovane età ed in perfetta salute al momento dell'arrivo in Ospedale.

Un secondo caso potrebbe essere rappresentato dal tipico paziente che giunge in coma per un sanguinamento intracerebrale da rottura di aneurisma o di natura ipertensiva. Tale paziente si trova abitualmente in una fascia compresa fra i 55 ed i 70 anni, era già in precedenza in terapia con farmaci anti-ipertensivi, potenzialmente associati a terapia anticoagulante, spesso diabetico/a e con patologia strutturale del miocardio per pregresso infarto. In casi di questo genere, la precarietà delle condizioni generali, associata alla disregolazione immunitaria conseguente alla lesione cerebrale operata, insieme con l'effetto delle manipolazioni chirurgiche multiple (es. embolizzazione endovascolare seguita da decompressione cranica con evacuazione di ematoma) ed in alcune situazioni la prolungata presenza di drenaggi liquorali, in grado di aprire una porta di penetrazione diretta per i germi verso il comparto intracranico, espongono il paziente ad un rischio infettivo aumentato esponenzialmente. A completamento di quanto detto, va considerato che nella stragrande maggioranza dei casi i pazienti in oggetto saranno portatori di catetere vescicale a permanenza e, visto il ritardo nel riprendere coscienza, anche sottoposti a tracheostomia, di per se stessi fattore di estremo rischio per una contaminazione da parte dei germi multi-resistenti cui si è fatto accenno sopra. A chiudere il cerchio, la comparsa di fenomeni febbrili è spesso un evento precoce, per il quale il rianimatore procederà subito ad iniziare una terapia su larga scala, anche in questo caso destinata a selezionare ulteriormente germi a maggiore aggressività. Va ancora aggiunto che la mobilitazione sul letto di rianimazione può essere complessa e molto ridotta, soprattutto qualora coesistano fratture vertebrali e nel caso di alcuni tipi di tutori esterni (ad esempio collari come il Minerva-Halo o i tutori per fratture delle ossa lunghe), gli stessi possono da un lato indurre la comparsa di nuovi decubiti (ancora una volta in grado di esercitare un effetto incrementale sulla colonizzazione batterica del malato), dall'altro facilitare la rottura di ferita a causa della persistenza in una stessa posizione. I rischi cui il paziente decompresso va incontro non terminano con il periodo rianimatorio. Una volta trasferito presso le strutture di cura

secondarie o i centri riabilitativi, l'incontro con compagni di stanza colonizzati da germi resistenti gioca spesso un ulteriore ruolo nella lunga e complessa storia infettiva del nostro paziente.

Uno dei principali problemi legati al rischio infettivo della procedura di cranioplastica è rappresentato proprio dalla colonizzazione persistente del paziente a lungo ospedalizzato. I germi più frequentemente riscontrati in questi casi appartengono alla famiglia dei gram negativi ed includono prevalentemente la *Klebsiella pneumoniae*, l'*Acinetobacter Baumannii* e la *Pseudomonas Aeruginosa*. Germi molto diversi fra di loro ma con una storia ormai ben stabilita di resistente antibiotiche al limite dell'intrattabilità. Non è infrequente osservare pazienti con colonizzazione rettale permanente ad opera della *Klebsiella* stessa, così come casi di periodiche riacutizzazioni di infezioni respiratorie ad opera di *Acinetobacter* e *Pseudomonas* residenti nelle secrezioni bronchiali. In tali condizioni è inoltre piuttosto comune osservare la completa assenza, anche per periodi prolungati, di episodi febbrili o in alcuni casi di riaccensioni di piccoli rialzi termici, senza un reale impatto sulle condizioni cliniche del malato. In questo tipo di paziente non è generalmente indicata una terapia antibiotica, che non avrebbe in particolare una vera efficacia nell'eradicare il germe, potendo solo obbligarlo ad una condizione di maggiore quiescenza. L'interrogativo principale in queste situazioni consiste proprio nella valutazione dei pro e dei contro rispetto all'eventuale riposizionamento di un opercolo osseo autologo o, con dubbi ancora maggiori, di una cranioplastica artificiale. Sebbene utilizzati comunemente nelle infezioni acute allo scopo di discriminare l'andamento del processo flogistico, i principali indici infiammatori (velocità di eritrosedimentazione, proteina C reattiva ed il più recente dosaggio della pro-calcitonina), perdono in questi casi gran parte della loro utilità e capacità predittiva. Non è infatti raro riscontrarli nei limiti di norma o solo minimamente mossi, proprio a causa della convivenza instauratasi fra germe ed ospite. Alcuni autori suggeriscono che pazienti afebrili da almeno 7-10 giorni, con indici di flogosi nei limiti, possano essere sottoposti ad una procedura di cranioplastica in relativa sicurezza. Altri ritengono invece che i rischi siano eccessivamente elevati e che data la necessità di limitare il numero di ulteriori re-interventi, allo scopo

di prevenire il rischio di infettare l'opercolo autologo criopreservato e dunque di dover poi effettuare una rimozione dello stesso (3° intervento) ed ancora una riapertura per plastica artificiale (4° intervento), è necessario giungere ad uno stato di sterilizzazione del paziente dai germi suddetti, con emo-, urino- e colture del tracheo-aspirato indubitalmente negative. In caso di ricomparsa anche di un solo episodio febbrile si dovrebbe pertanto ripartire da zero.

Un caso particolare è rappresentato dall'*Acinetobacter Baumanii*. Batterio residente della flora saprofitica umana, è generalmente un ospite del tutto innocuo. Nonostante ciò, nei pazienti con grave depressione delle difese immunitarie sottoposti a lunga ospedalizzazione e numerose terapie antibiotiche, assume un carattere di multiresistenza con due principali ceppi ospedalieri, uno dei quali sensibile solo alla colimicina, l'altro resistente sostanzialmente ad ogni terapia. Nei soggetti portatori di *Acinetobacter*, il rischio di infezione di cranioplastica raggiunge livelli elevatissimi, data la presenza dello stesso sulla superficie cutanea.

Uno degli aspetti più discussi in relazione alle infezioni di cranioplastica si riferisce alle tecniche di criopreservazione dell'opercolo autologo<sup>1-5</sup>. Questa procedura ha subito nel tempo alcune modifiche. Dapprima l'opercolo veniva posizionato negli strati superficiali della parete addominale, subito al di sopra della fascia, tecnica che viene ancora utilizzata anche in alcuni paesi europei, successivamente si è passati alla criopreservazione. Inizialmente effettuata in frigoriferi ospedalieri, con posizionamento dell'osso in una doppia busta sigillata, condizione essenziale era che il congelatore stesso fosse mantenuto a temperatura costante e controllata, fra 18 e 80° sotto lo zero. Esistono numerosi resoconti di letteratura che hanno paragonato le due procedure, che, riguardo al di rischio infettivo, vengono considerate da alcuni sostanzialmente sovrapponibili, da altri del tutto differenti, in termini di rischio contaminativo<sup>2,3</sup>. Il posizionamento sottocutaneo addominale ha il vantaggio di poter recuperare l'opercolo in qualunque momento senza allontanarlo dal possessore. D'altra parte, il progressivo incrementarsi delle dimensioni dei lembi decompressivi ha fatto sorgere dubbi sull'opportunità del confezionamento di tasche di dimensioni ragguardevoli, a volte peraltro

comunque non sufficienti. Basta infatti pensare alle decompressioni bi-frontali, ove l'eccessiva curvatura rendeva impossibile posizionare il frammento di calotta sottocute, rendendosi necessario dividerla in 2 frammenti. E' ormai noto però come la multi-frammentazione dell'opercolo sia proprio uno dei principali effetti favorevoli al riassorbimento dello stesso, che, come vedremo in seguito, è fenomeno proporzionalmente legato allo sviluppo di infezione, non fosse altro perché quando si verifica il paziente necessita una nuova procedura di ricostruzione della calotta<sup>2,4</sup>. Inoltre, i detrattori del posizionamento sottocutaneo sostengono che, data la tipologia di paziente, frequentemente affetto da infezioni sistemiche, eventi molto comuni come una sepsi urinaria renderebbero l'opercolo immediatamente suscettibile ad una colonizzazione<sup>5</sup>. Ultimo ma non meno importante, qualora il tempo di riposizionamento diventi eccessivamente lungo, è piuttosto comune nei pazienti lo svilupparsi di una intensa sintomatologia dolorosa, che diventa pressochè costante al semplice cambio di posizione e che può essere associata a severe retrazioni cicatriziali in corrispondenza della cicatrice addominale. Non appare comunque senza rischi neanche la metodica di crio-preservazione. La principale limitazione della stessa è infatti causata dalla serie di steps che vengono richiesti per completare la procedura. In primo luogo all'atto del prelievo l'opercolo viene passato sterilmente dall'operatore allo strumentista, il quale lo immerge in un contenitore sterile ripieno di liquido di lavaggio antibiotico adatto per la preservazione a freddo. Il contenitore viene inserito in una prima busta, questa in una seconda, anch'essa sigillata. In alcuni centri si utilizza un ulteriore passaggio in un terzo involucro sterile. Non è però infrequente che al momento del completamento della craniotomia l'operatore non sia ancora in grado di stabilire se trasformarla in craniectomia o se sia invece possibile riposizionare l'opercolo. Durante questo periodo di "incertezza", l'opercolo resta immerso in betadine, coperto da un panno sterile, su un servitore accessorio, così da essere pronto per il suo eventuale riposizionamento. Alcuni autori sostengono che proprio questa sia la fase nella quale l'opercolo è a maggior rischio di contaminazione. Eventuali manipolazioni dello stesso, ad esempio nel riportarlo sulla breccia ossea per valutare se il posizionamento possa essere adeguato in relazione allo stato di edema del parenchima o un tempo di attesa molto lungo a causa del protrarsi della parte

centrale della procedura, come nei casi in cui si proceda per esempio alla bonifica in microscopia ottica di grossolani focolai contusivi, produrrebbero un incremento significativo del rischio di contaminazione dell'opercolo, anche in conseguenza del sostanziale calo di attenzione degli operatori, in particolare qualora l'intera procedura dovesse completarsi nelle prime ore del mattino. Questa problematica sarebbe in teoria presente anche nella preservazione sottocutanea. In secondo luogo, le cosiddette banche dell'osso non si trovano, se non in rari casi, presso la sede di prelievo dell'opercolo. Questo fa sì che lo stesso debba essere dapprima condotto a distanza con mezzo medicale, poi portato nuovamente in ospedale al momento del prelievo. In tale situazione l'opercolo dovrà essere scongelato, per circa 48 ore, prima dell'utilizzo. Sebbene sia prevista entro le prime 72 ore la possibilità di ricongelarlo e reinviarlo nuovamente nella struttura di storage, ad esempio qualora il paziente selezionato per la procedura dovesse essere divenuto febbrile durante l'attesa di intervento, tale procedura è considerata ad alto rischio, in particolare per l'elevata probabilità conseguente di deterioramento dopo il secondo congelamento e dunque per il rischio di riassorbimento. A questo va aggiunto che l'opercolo, una volta portato al di fuori dal frigorifero di sala con temperatura standard a  $-4^{\circ}\text{C}$ , non può essere riposizionato come tale, proprio a causa del rischio termico per il parenchima cerebrale. Deve pertanto essere rimosso dalle buste e lasciato riposare per un tempo di almeno 1 ora in soluzione fisiologica a temperatura ambiente. Ancora una volta, il tessuto osseo resta dunque a contatto con l'aria, stavolta non in una soluzione battericida, durante lo svolgimento della procedura di apertura. È facile immaginare come la manipolazione da parte dei chirurghi, che hanno provveduto ad esporre ancora una volta l'area di meninge sottoposta a decompressione, possa mettere a rischio di contaminazione l'intera area chirurgica e di conseguenza l'opercolo. Ulteriore motivo di discussione in letteratura è proprio la procedura di crio-preservazione<sup>1,4</sup>. Le temperature descritte variano a seconda delle singole banche dell'osso, con una media che va da  $-40$  a  $-82^{\circ}\text{C}$ , sebbene esistano centri che descrivono la conservazione in azoto liquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ <sup>6-8</sup>. Nonostante ciò, non vi sono evidenze sufficienti per sostenere che quanto più bassa la temperatura tanto più probabile sia un azzerramento del rischio infettivo<sup>9-10</sup>. Va infatti considerato come temperature estremamente ridotte

possano essere in grado di agire negativamente sulla struttura molecolare dell'osso, portando ad una disgregazione dei legami e dunque, già in fase di crio-preservazione, ad un processo di deterioramento che, seppur non evidente al momento del riposizionamento, continuerebbe successivamente, portando in modo inevitabile al riassorbimento e pertanto ai rischi precedentemente enunciati, inclusa una maggiore facilità all'infezione. Ultimo aspetto, la cui rilevanza in letteratura sembra essere stata scarsamente considerata, riguarda le procedure di campionamento della sterilità<sup>9</sup>. Viene infatti criticata da alcuni l'idea che il campionamento stesso sia necessario, data la possibilità: A) che un opercolo sterile venga erroneamente identificato come contaminato; B) che un opercolo sterile venga contaminato al momento della procedura ma non risulti come tale all'atto del riposizionamento. In caso di contaminazione le banche dell'osso effettuano una comunicazione all'ente ospedaliero prelevatore. Esistono però essenzialmente due possibili situazioni: 1) la prima, il germe identificato può essere eradicato con procedure di sterilizzazione avanzata mediate raggi gamma, riportando l'opercolo in una condizione di sostanziale sicurezza; 2) si identificano germi non comuni, per i quali viene consigliata la procedura di eliminazione dell'opercolo stesso. In entrambi i casi, i costi divengono paragonabili a quelli del confezionamento di una cranioplastica ex-novo. Tale situazione, sebbene rara, apre dunque al dilemma se posizionare un opercolo apparentemente sicuro ma che è stato ulteriormente spostato e manipolato nella sua struttura di base, ovvero se decidere di scartarlo, scegliendo "a priori" un sostituto artificiale con tutti i rischi ad esso connessi.

### **Materiali e suscettibilità alle infezioni: un dilemma irrisolvibile?**

Esiste una suscettibilità materiale-specifica alle infezioni? Questo interrogativo rappresenta una delle chiavi di volta dell'intero problema delle infezioni post-cranioplastica. Da un punto di vista storico, l'introduzione dei nuovi materiali per cranioplastica e quella che abbiamo già in precedenza chiamato ingegnerizzazione degli stessi, ovvero la creazione di modelli tridimensionali realizzati mediante

tecniche computerizzate ed in grado di riempire perfettamente le lacune ossee lasciate dalle craniectomie, ha aperto un complesso fronte di discussione. Nel ventennio '80-'90 gli unici materiali disponibili per sostituire un opercolo erano rappresentati dall'acrilico modellato a mano e dalle reti in titanio<sup>11-16</sup>. La scarsa anatomicità dei materiali ed in particolare la non praticità d'uso per coprire difetti di grosse dimensioni, facevano sempre propendere in prima ipotesi per il riposizionamento dell'osso autologo. A ciò andava aggiunta la conoscenza accumulata nel tempo, grazie alle esperienze di semplice riempimento di craniolacunie ove l'osso non era più disponibile (ad esempio a seguito di traumatismi) dei limiti degli stessi materiali. La riuscita della modellazione a mano dell'acrilico era fortemente vincolata non solo dalla dimensione ma anche dalla forma della craniolacunia<sup>12</sup>. La ricostruzione della regione fronto-temporale può rappresentare da questo punto di vista un interessante elemento di riflessione. La doppia curvatura presente a circondare lo pterion (la bozza frontale e la convessità temporo-basale, risultavano estremamente difficili da ricreare, perché durante il processo di polimerizzazione intraoperatoria la resina, seppure perfettamente modellata, tendeva a riprendere una forma più orizzontale. Anche continuando a modificare la protesi durante il raffreddamento, si finiva comunque per ottenere una struttura relativamente irregolare, con la possibile presenza di spicule sporgenti oltre i bordi ossei. La storia di cranioplastiche con questi difetti era irrimediabilmente segnata, poiché la maggiore irregolarità portava facilmente a perforazione della cute nella stessa zona, con conseguente infezione della protesi e del lembo. E' facile immaginare come tale condizione potesse venire resa ancor più complessa quando dovesse venire aggiunta una terza curva, quella corrispondente alla regione parietale. In questi casi la tendenza a conformare protesi con almeno due confini irregolari finiva per rendere ancor più facili le complicanze. L'uso delle reti in titanio non rappresentava da questo punto di vista una soluzione migliore. Le meshes risultavano ovviamente più facili da modellare, ma anche in questo caso la tendenza era quella ad ottenere un prodotto sostanzialmente piatto, poiché laddove si cercasse di ricostruire una curvatura, le meshes ledevano la cute in brevissimo tempo, assottigliandola dall'interno per poi lacerarla. Il secondo problema correlato alle reti in titanio stava nella struttura ad alveare. Tale struttura facilita

infatti la colonizzazione sia da parte dei tessuti sovrastanti che di quelli sottostanti. In pazienti sottoposti a più riaperture e pertanto gravati da un cuoio capelluto scarsamente vascolarizzato e stirato, la rottura della cute non era un evento infrequente. Infine, dal punto di vista cosmetico, il risultato delle reti in titanio era quello di un sostanziale appiattimento di tutte le curvature, con il potenziale aggiuntivo di una compressione del parenchima sottostante.

L'introduzione delle cranioplastiche preformate ha inizialmente fatto sperare in una significativa riduzione dei rischi infettivi<sup>18-21</sup>. La struttura fisica delle protesi ha infatti subito un netto cambiamento. Il titanio tridimensionalmente realizzato riproduce pressochè perfettamente la curvatura cranica, sia nelle forme compatte che in quelle dove la rete è preformata ma circondata da un bordo regolare per poterlo agganciare all'osso circostante<sup>22-24</sup>. Ovviamente, nelle forme con rete permane il rischio di una successiva interazione con i tegumenti.

Le prime protesi introdotte sul mercato come custom-made, ovvero realizzate su misura dal modello computerizzato dal paziente, sono state quelle in idrossiapatite porosa<sup>25</sup>. Sebbene il tasso di porosità possa essere modificato, la stessa è essenziale ai fini della colonizzazione da parte del tessuto osseo circostante. Ancora una volta però, la porosità rappresenta un limite della struttura, poiché da un lato rende la protesi meno compatta e più facile alla frammentazione, dall'altro favorisce la colonizzazione batterica, mediante un meccanismo di "trasudo". Non è infatti infrequente, all'atto della rimozione degli impianti infetti, trovare uno strato di materiale purulento disposto a verniciare la superficie esterna della protesi ed uno strato interno, a contatto con il panno infettivo disposto sulla meninge, che corrisponde in modo pressochè perfetto alla suddetta distribuzione esterna del materiale infetto.

Il PEEK è giunto sul mercato anch'esso in forma tridimensionale<sup>26-28</sup>. Ha il vantaggio di poter essere realizzato molto rapidamente e la sua struttura è effettivamente, compatta, su entrambi i versanti protesici. Apprezzato per la facilità di fissaggio con viti e placche di ogni sorta, non aderisce ai tessuti circostanti ed è estremamente agevole da rimuovere in caso di infezione. Al momento è sicuramente

uno dei materiali più validi dal punto di vista dell'innovazione e della sicurezza dell'impianto. Il principale vantaggio consiste nella possibilità, in caso di impianto infetto, di rimuoverlo e ri-sterilizzarlo, per poi re-impiantarlo nuovamente.

Accodatasi per ultima alla realizzazione tridimensionale, la resina acrilica è approdata con due importanti miglioramenti a questo step<sup>29,30</sup>. Il primo, la forma perfettamente regolare ed anatomica, che ha virtualmente eliminato il rischio di lesioni cutanee. Il secondo, ben più importante, la rimozione, durante la colatura intraoperatoria negli appositi stampi realizzati per colmare la cranioiacunia, delle bolle d'aria che si formavano tipicamente nella modellazione manuale. Secondo alcuni autori le bolle stesse sarebbero state uno degli elementi favorevoli da un lato la rottura delle protesi e dell'altro le colonizzazioni batteriche.

Alcuni lavori di letteratura hanno preso in considerazione i singoli materiali in relazione al rischio infettivo, altri, sebbene sempre con casistiche limitate, ne hanno paragonati alcuni fra loro.

La mole di resoconti riguardante i fenomeni infettivi a carico dell'opercolo osseo autologo è particolarmente notevole, essendo ancora questo il materiale usato più di frequente nelle ricostruzioni.

La maggior parte di questi lavori data non oltre il 2013, poiché negli anni precedenti l'attenzione era prevalentemente concentrata sui rischi di utilizzo degli opercoli conservati in addome o sottoposti a passaggio in autoclave.

Uno dei primi lavori in questo campo risale ad oltre 20 anni or sono e venne pubblicato dal gruppo di Nagayama nel 2002<sup>31</sup>. Al momento della rimozione dell'opercolo gli autori lo immergevano in una soluzione di Amicacina solfato (200 mg), per poi congelarlo a -16 °C. La serie esaminava il periodo 1980-1998, in 206 pazienti, inclusi casi pediatrici. Il tasso di infezione osservato era pari al 3.88% (8 casi) e gli autori osservavano che il periodo di conservazione dell'osso autologo era stato nettamente minore nel gruppo infetto (31 giorni) rispetto ai 59 giorni dei soggetti privi di infezione. Nessun altro dei fattori esaminati, inclusa la causa che aveva condotto alla rimozione, l'età e il sesso dei pazienti

ed eventuali comorbidità, sembravano avere alcun peso sul quadro infettivo. Nel 2006 Movassaghi documentava 3 casi di infezione in una serie di 53 pazienti operati riposizionando l'opercolo preso da una tasca addominale<sup>32</sup>. Nella stessa serie 2 opercoli venivano estratti in condizioni considerate di infezione e pertanto scartati. Nel 2011 il gruppo di Morina riportava un tasso di infezione di appena 2 su 75 casi, in pazienti sottoposti a craniectomia per incidenti nella guerra del Kosovo, un tasso estremamente ridotto rispetto anche a lavori successivi<sup>33</sup>.

Nel 2011 Chiang e coll. presentavano una revisione retrospettica, seguita da una piccola serie prospettica (di un campione di pazienti operati in un arco temporale di appena 2 anni) presso l'università dell'Iowa<sup>34</sup>. Gli autori ottenevano culture microbiologiche dal lembo osseo sia durante la craniectomia che al momento del riposizionamento. Questa serie includeva 373 pazienti e 393 craniectomie. Al momento della rimozione il 50% dei lembi risultava contaminato da flora cutanea del paziente, inclusi *Propionibacterium Acnes*, *Stafilococchi coagulasi negativi*, *Stafilococco Aureo*. Nonostante ciò, il reimpianto di opercoli trovati positivi non incrementava il rischio di infezione. Gli autori documentavano peraltro un ridotto tasso infettivo nei casi nei quali la procedura di disinfezione superficiale era stata completata dall'attesa di un tempo adeguato perché la soluzione sterilizzante si asciugasse del tutto. Nel 2012 Lee riportava i risultati dell'uso dell'opercolo criopreservato in 140 pazienti operati fra il 2000 ed il 2009. Un'infezione dell'opercolo si presentava in 11 pazienti (il 7.86%), apparendo statisticamente correlata con il numero di interventi, la durata delle procedure chirurgiche e la presenza di diabete mellito. Il totale delle procedure in questa serie incrementava il tasso di infezione dal 4.3 al 33%, con un aumento particolarmente elevato dopo il terzo intervento. Il tasso di infezione risultava al contempo ridotto del 10% quando la procedura di cranioplastica non superava i 199 minuti, passando al 20% alla soglia dei 200.

E' del 2014 (Cheng e coll.) la prima analisi comparativa dei rischi infettivi nell'utilizzo dell'osso autologo criopreservato (180 casi) rispetto alla sua conservazione in addome (110 casi)<sup>4</sup>. Un'infezione del sito chirurgico si verificava in 20 casi (11.1%) in caso di conservazione a freddo,

in 20 (18.2%) se mantenuto in addome. Dopo aver diviso i pazienti in relazione alla presenza/assenza di trauma cranico come causa della rimozione, i tassi di infezione erano del 17.3% per i traumatizzati e del 20.7% per gli altri, rispetto all'11.9% e 9.7% negli opercoli preservati in addome. Sebbene la tendenza al riassorbimento fosse più elevata negli opercoli criopreservati, il tasso di infezione non sembrava esserne gravato in modo statisticamente significativo. Un recente lavoro di revisione da parte del gruppo di Rosinsky (2019), valutava un gruppo di 94 pazienti, dei quali 45 sottoposti a cranioplastica con osso conservato in addome e 59 congelato<sup>36</sup>. I due gruppi erano simili per caratteristiche demografiche, comorbidità e indicazioni alla craniectomia, con minime differenze per indice di massa corporea e razza. Il tempo chirurgico era maggiore nel primo gruppo, nel quale si osservava anche la presenza di un maggior numero di shunt v-p. Venivano rilevate un totale di 6 infezioni di cranioplastica, 2 nel gruppo sottocutaneo, 4 nei congelati, ma tale differenza non raggiungeva il livello di significatività statistica. Gli autori confermavano pertanto che non sussistono reali differenze fra le due tecniche di preservazione in termini di complicanze infettive. La serie più ampia in questo ambito è stata pubblicata da Fan, nel 2018<sup>37</sup>. L'autore prendeva in considerazione un totale di 946 pazienti, sottoposti a riposizionamento di opercolo autologo conservato in azoto liquido (- 196° C) con dimetilsufossido. Un'infezione di opercolo veniva osservata in 39 casi (4.06%), un valore sostanzialmente allineato con la restante letteratura, a dimostrazione che anche una procedura complessa come l'uso dell'azoto liquido non contribuiva in alcun modo a ridurre i rischi infettivi.

Le serie riguardanti le infezioni di sole cranioplastiche in acrilico sono molto più rare, essendo più frequente il confronto fra osso autologo e acrilico o fra quest'ultimo ed altri materiali ricostruttivi. Da questo punto di vista uno dei lavori più interessanti è quello di Lee (2009), in cui veniva introdotto per la prima volta un paragone fra PMMA modellato a mano, customizzato 3D e opercolo autologo<sup>38</sup>. Sebbene il numero di pazienti fosse nettamente diverso fra i gruppi (92 opercoli contro 23 PMMA modellati e 17 3D), il tasso di complicanze infettive era il 5.5% nel primo gruppo, il 13% nel secondo ed il 5.8% nel terzo. Gli autori concludevano che la modellazione manuale del secondo gruppo

sembrava avere un impatto significativo sui rischi infettivi, presumibilmente data la sua imprecisione ed il prolungamento dei tempi chirurgici, che portava al fallimento precoce della plastica. La serie più numerose veniva descritta nel 2013 da Jaber. Venivano esaminati un totale di 70 pazienti trattati fra il 2003 ed il 2010<sup>39</sup>. In 6 casi l'impianto falliva e il PMMA doveva essere rimosso venendo sostituito dallo stesso materiale, in 2 veniva rimpiazzato da un differente sostituto. Il tasso di infezione era comunque estremamente elevato (13%). Nel 2014 il gruppo di Hsu presentava la prima esperienza di impianti in PMMA impregnati di antibiotico dopo rimozione di opercolo infetto, ovvero in quella condizione che viene comunemente denominata cranioplastica in sito ostile<sup>40</sup>. Questo autore immergeva il PMMA in vancomicina e tobramocina, per poi distenderlo su una rete in titanio preformata. Venivano sottoposti a questa procedura un totale di 9 pazienti, con isolamento dei seguenti germi: *Propionibacterium acnes* (n = 3), *Stafilococco coagulasi negativo multiresistente* (n = 3), *Stafilococco aureo meticillino-resistente* (n = 2) ed *Enterobacter* (n = 2). Non venivano rilevate nuove infezioni a distanza e nessun impianto doveva essere rimosso. Nel 2016 Worm presentava un'ulteriore serie prospettica di pazienti sottoposti a plastica in PMMA impregnata con antibiotico, (eritromicina 0.5 g e colistina 3.00 milioni di UI)<sup>41</sup>. I pazienti venivano seguiti per 2 anni. Il gruppo era composto da 58 soggetti, con una incidenza di 2 casi di deiscenza di ferita e 2 casi di infezione del sito chirurgico, (3.4% in entrambe), percentuale sostanzialmente più bassa di quanto riscontrato in letteratura. Gli autori ritenevano che l'immersione in antibiotico avesse avuto un impatto significativo da questo punto di vista, sebbene non potessero provarlo statisticamente. Nel 2018 il gruppo di Morales-Gomez descriveva l'utilizzo di una metodica di realizzazione di impianti in PMMA 3D realizzati con una stampante desktop a basso costo<sup>42</sup>. Oltre a rilevare un ottimo risultato cosmetico, l'autore non riferiva di complicanze di tipo infettivo. Sfortunatamente, il campione era costituito da soli 22 pazienti ed il follow-up fra 1 e 6 mesi, decisamente insufficiente per valutare l'effettiva accuratezza dei risultati. Nonostante ciò, questo studio metteva in risalto la necessità di impianti con contorno perfettamente adattato, confermando ancora una volta come la modellazione manuale sia considerato uno dei punti deboli del PMMA.

La prima descrizione esaustiva dell'uso del titanio per ricostruire difetti cranici di grandi dimensioni risale al lavoro di Joffe (1993)<sup>43</sup>. L'autore analizzava un totale di 66 casi seguiti per 3 anni. Al di là dell'insoddisfacente esito estetico per le protesi applicate nelle regioni frontali, veniva osservato un 10% (5 pazienti) di casi che richiedevano una revisione. Sebbene l'autore non specificasse chiaramente quale fosse la natura della stessa, in 3 casi presentati si evince trattarsi di infezioni, che portavano alla rimozione dell'impianto, seguita da un successivo riposizionamento. In altri 3 casi sembra essersi trattato di una revisione di ferita, poiché la protesi veniva lasciata in sede.

Nel 2006 Eufinger presentava una revisione di 166 pazienti sottoposti ad un totale di 169 impianti di cranioplastica in titanio<sup>44</sup>. Il 13.5% dei pazienti sviluppava complicanze, che nell'8.5% dei casi portavano a rimozione delle protesi. Le cause principali, messe in relazione dall'autore alle dimensioni degli impianti, erano rappresentate da infezioni dei tessuti molli, osteomielite, perforazioni della cute.

Nel 2009 Cabraja documentava una serie di 26 pazienti sottoposti ad impianto di cranioplastiche in titanio realizzate con tecnica computerizzata tridimensionale<sup>45</sup>. Gli autori riportavano un totale di 26 pazienti, seguiti per un intervallo di tempo da 6 a 12 anni. In nessun caso venivano osservate deiscenze di ferite o franche infezioni degli impianti.

Nel 2012 fa la sua comparsa il primo lavoro che cita l'uso del titanio in due pazienti con infezione dell'opercolo craniectomico, con l'immediata sostituzione dello stesso<sup>46</sup>. In entrambi i casi i risultati erano soddisfacenti, senza ulteriori necessità di revisione chirurgica ad un follow-up di 3 anni. Elemento importante restava però la patologia di base di entrambi i pazienti, non traumatica o emorragica bensì tumorale, pertanto con un aspetto fisiopatologico dei possibili rischi infettivi ben diverso dai pazienti più comunemente affetti da tale complicanza.

Sempre del 2013 è la serie pubblicata da Wiggins e coll.. Su un totale di 113 pazienti, l'autore utilizzava il titanio in lembi infetti, contaminati al momento della rimozione e riassorbimento di opercolo, rispettivamente nel 54%, 14% e 10%, con un follow-up minimo di 6 mesi<sup>47</sup>. In questa serie

le complicanze erano comuni, in particolare l'infezione con rimozione dell'impianto (18 casi, 16%). I difetti di dimensioni maggiori erano associati ad un maggiore tasso di complicanze, in particolare di infezioni, viste nel 32% delle emicraniectomie e nel 19% delle cranioplastiche bifrontali rispetto al 9.2% (peraltro non trascurabile) delle piccole cranioplastiche.

Ancora nel 2013 Wind utilizzava il titanio in due casi di infezione di cranioplastica<sup>48</sup>. Nel primo, un uomo di 70 anni, veniva evidenziata in risonanza una raccolta epidurale al di sotto di una craniotomia frontale effettuata per un meningioma della convessità. Il nuovo impianto in titanio riposizionato al momento stesso della rimozione dell'opercolo infetto, non presentava ulteriori complicanze ad un follow-up di 3 anni. Il secondo paziente era stato sottoposto ad una craniotomia parietale destra per un glioma di basso grado, tornando a rivalutazione dopo appena un mese per una deiscenza di ferita ed ancora una volta una raccolta subgaleale ed epidurale. Anche in questo caso la rimozione dell'osso autologo e la plastica immediata in titanio ottenevano un buon risultato ad un follow-up di oltre 3 anni. Nonostante i successi descritti, va considerato come questi fossero difetti di piccole dimensioni, fattore che, come già detto, la letteratura considera favorente in termini di guarigione dei focolai infettivi.

L'infezione era l'unica causa di rimozione del 4% delle protesi nella serie di Williams (2015)<sup>49</sup>. L'autore analizzava i risultati in 151 pazienti ma ad un follow-up medio di appena 14 mesi.

Nel 2016 Park presentava una serie di 21 cranioplastiche in titanio preformato su difetti cranici di ampie dimensioni<sup>50</sup>. Sebbene la maggior parte dei pazienti avesse un risultato soddisfacente, in un caso si rendeva necessaria una revisione dell'impianto a causa della rottura della cute sovrastante, di natura infettiva. Ciò attesterebbe pertanto una percentuale di infezione del 4.7%, assolutamente in linea con gli altri materiali citati e non trascurabile. Va inoltre considerato come sebbene il follow-up andasse da 6 a 165 mesi, la media era di appena 33 mesi, un tempo insufficiente per valutare la possibile comparsa di ulteriori fenomeni infettivi.

Il tasso di infezione delle cranioplastiche in idrossiapatite è estremamente variabile in letteratura, andando da un ridotto 2% ad un 20%.

Le prime descrizioni delle infezioni di questi nuovi impianti ad alto biomimetismo risalgono ai primi anni 2000, con il tentativo di salvataggio di una protesi infetta riportato da Johnson, su una donna sottoposta ad una craniotomia retrosigmoidea per una sezione del nervo vestibolare, a distanza di un anno dal primo intervento<sup>51</sup>. Una procedura di detersione della ferita, seguita dall'uso di antibiotici mirati portava a guarigione completa. Nel 2004 Poetker riportava una serie di 76 cranioplastiche in idrossiapatite con due casi di infezione (2.6%), per le quali l'impianto veniva rimosso<sup>52</sup>.

Il tasso di infezione descritto da Lindner (2017) era pari al 7.7%, 2 casi su 26, ed entrambi gli impianti dovevano essere rimossi per giungere a guarigione<sup>53</sup>.

Anche Stefini (2018) riportava un tasso di infezione del 2.05% (33 casi su 1608 protesi), di cui 31 venivano rimosse<sup>54</sup>.

Nel 2018 Still descriveva un gruppo di 109 sottoposti al posizionamento di protesi in HA, 15 dei quali (13.8%) presentavano un quadro evidente di infezione<sup>55</sup>. L'autore giustificava questi valori al di fuori delle medie di letteratura sostenendo che oltre la metà dei pazienti (il 53.3%) era stata in precedenza operata per un'infezione del sito chirurgico. Sebbene l'autore tentasse un trattamento conservativo, era possibile salvare la protesi solo in un caso,

Nel lavoro di Di Rienzo (2022), il tasso di infezione riportato era estremamente elevato (20.9%)<sup>56</sup>. L'idrossiapatite veniva utilizzata come rimpiazzo di un opercolo non disponibile solo in un caso, sostituendo opercoli riassorbiti nei restanti 8. L'autore riteneva che le riaperture multiple potessero essere la principale ragione di tale tasso, associato alla prevalenza, nella serie, di pazienti operati per trauma cranico grave e con severi reliquati clinici.

Uno dei primi resoconti sull'utilizzo e l'infezione del PEEK risale al lavoro di Hanasono (2009)<sup>57</sup>. Sei pazienti in precedenza trattati per infezioni multiple di opercolo venivano sottoposti a sostituzione

con impianti in polieterechetone. In un caso l'impianto si esponeva (a detta degli autori per fistola liquorale), con la successiva necessità di ricorrere ad un lembo libero).

Nel 2014 Rosenthal presentava una delle serie più numerose con utilizzo di impianti PEEK, per un totale di 66 protesi su 65 pazienti, in uno studio coinvolgente 3 centri<sup>58</sup>. Cinque impianti risultavano infetti, uno esposto con tassi rispettivamente di infezione dello 7.6% e di rimozione del 9.1%, pertanto non significativamente dissimili dalle altre tipologie di cranioplastica.

Nello stesso anno o'Reilly presentava una serie di 19 pazienti nei quali venivano impiantate 22 cranioplastiche in PEEK<sup>59</sup>. L'impianto veniva rimosso in 3 casi (15.7%), in due dei quali per infezione chiaramente visibile, nel terzo per grave assottigliamento della cute del lembo e stillicidio sieroso.

Nel 2016 Jonkergouw presentava la sua serie di 40 cranioplastiche in PEEK in 38 pazienti<sup>60</sup>. Il tasso di infezione riportato era del 13%, ma con un associato 2.5% di deiscenze di ferita. In tutti questi casi, la protesi veniva rimossa.

Nel corso degli ultimi 10 anni numerose serie hanno preso in considerazione paragoni fra i differenti tipi di materiali. Nella maggior parte dei casi tali serie confrontavano, come già detto in precedenza, il risultato del riposizionamento dell'opercolo autologo e gli impianti in titanio o acrilico. L'introduzione dei nuovi materiali ha reso tali confronti più vari, riducendo peraltro in alcuni casi la significatività a causa del minor numero di casi per ogni tipologia di impianto esaminato.

Nel 2012 Al-Tamimi riportava l'analisi di un gruppo di 126 pazienti nei quali venivano utilizzati impianti in acrilico (61) e titanio (66)<sup>61</sup>. Ventiquattro casi venivano inclusi nel primo gruppo (39.3%) e 14 nel secondo (21.5%). Solo in 4 casi l'infezione si ripresentava in caso di utilizzo del PMMA (6.6%), contro i 7 (10.8%) del titanio, ma tale differenza non raggiungeva la significatività statistica.

Nel 2015 Thien riportava uno studio comparativo fra PEEK e titanio. Venivano esaminati 132 pazienti, seguiti per 6 anni<sup>62</sup>. Il tasso complessivo di complicanze per il PEEK era del 25% e per il

titanio del 27.8%. L'incidenza di infezioni superficiali era del 4.2% nel primo, 2,8% nel secondo caso, quella di infezioni profonde rispettivamente del 4.2% e dell'8%. Si osservava un trend verso un maggior numero di impianti in titanio esposti, ma tale valore non era statisticamente significativo. Il titanio mostrava una maggiore proporzione di infezioni precoci. Nel gruppo PEEK fallivano 3 cranioplastiche su 24 (12.5%), per il titanio 27 su 108 P (25%). I pazienti con una precedente infezione profonda tendevano ad avere più complicanze e alla necessità di rimuovere l'impianto.

Nel 2017 Lindner e coll. presentavano uno studio di comparazione su 52 pazienti sottoposti rispettivamente a cranioplastica in idrossiapatite e titanio, con un follow-up di appena 6 mesi<sup>22</sup>. Il tasso di infezione di ferita nel primo gruppo era del 7.7% (2 pazienti su 26) rispetto ad un ben più severo 20.8% (5 pazienti su 24) del secondo campione. Segni di infezione con impatto sistemico non venivano evidenziati entro 6 mesi in nessuno degli impiantati per idrossiapatite, rispetto al 37.5% (4 su 24) del titanio. In entrambi i gruppi era necessario un intervento di revisione dell'impianto nei primi 6 mesi (7 pazienti per gruppo, 26.9 % dell'idrossiapatite e 29.2% del titanio) con una minima differenza, statisticamente non significativa. Tre cranioplastiche venivano rimosse in ogni gruppo (11.5% idrossiapatite, 12.5% titanio). Si osservava infine un miglioramento globale a 6 mesi nel 43% dei casi di idrossiapatite e nel 26.3% del titanio. Questi dati portavano gli autori a sostenere che a paragone del titanio, l'idrossiapatite presentasse dei benefici rispetto al titanio, sia in termini di infezione che di risultato neurologico.

La più ampia revisione dei tre materiali artificiali di maggior uso comune effettuata nella letteratura recente risale a D'Oliver (2019)<sup>63</sup>. L'autore includeva nella sua ricerca meta-analitica titanio, PMMA, PEEK ed una pasta usata come sostituto osseo, il Norian. Venivano presi in considerazione 53 studi e 3591 pazienti, con un'età media di 40 anni. Nel gruppo del titanio erano inclusi 1429 pazienti con un follow-up medio di 26.8 mesi e un'età media di 41 anni, per il PMMA 1459 pazienti con un follow-up di 41 mesi e un'età media di 39.8 anni, per il PEEK 221 pazienti, seguiti per 40.3 mesi, con un'età media di 39 anni. Nel gruppo del Norian erano presi in considerazione 482 pazienti.

Da questa revisione il PMMA risultava essere il materiale a più alto tasso di infezione (7.95%) rispetto al titanio (6.02%), al PEEK (6.7%) ed al Norian (5.81%). Il tasso di complicanze locali era però dell'11.31% per il PMMA, salendo al 13.09% per il titanio ed al 17.19% per il PEEK, con un minimo di 12.45% per il Norian. Il più basso tasso di fallimento spettava comunque ancora al PMMA (4.73%), seguito dal titanio (6.02%), dal PEEK (8.6%) e dal Norian (6.43%). L'autore concludeva comunque che il principale limite di questa revisione stava nel fatto che la maggior parte degli studi includevano campioni numerici di pazienti molto limitati, con basso potere statistico e possibile sovrastima dell'effetto dimensione, fattori peggiorati dalla natura retrospettiva della valutazione e dalla estrema variabilità del follow-up, in grado di alterare significativamente i risultati.

Ad appena due anni di distanza compariva una seconda revisione sistematica con meta-analisi sull'uso dei differenti materiali da cranioplastica<sup>64</sup>. L'autore selezionava solo 20 di 2266 articoli, per un numero di 2913 pazienti. Questo lavoro includeva l'opercolo autologo fra i materiali stessi, mostrando che la probabilità di complicanze più elevata si osservava proprio in questa categoria. Nel paragone fra osso autologo e PMMA, venivano elencate complessivamente 118 complicanze su 457 cranioplastiche per il primo e 54 su 238 per il secondo. Nel paragone fra osso e idrossiapatite, venivano citati 3 studi, con un totale di 46 complicanze su 95 cranioplastiche (48.4%) per il primo materiale e 37 su 129 (28.9%) per il secondo. Quattro studi paragonavano osso e titanio (50 complicanze su 92 impianti, ovvero il 54.3%, Vs 25 su 69, il 36.2%). Il tasso totale di complicanze per l'osso era del 33.2% rispetto al 26.7% della somma degli altri sostituti.

Due studi paragonavano idrossiapatite e titanio, con 22 eventi avversi su 57 (38.5%) contro 14 su 33 (42.4%), 4 mettevano a confronto PEEK e titanio (22 su 128, il 17.1%, rispetto a 72 su 238, il 30.2%).

Il tasso di esposizione riportato per il PEEK era del 2.3% rispetto al 13.4% del titanio, quello di infezione 3.1% Vs l'8%.

Nel 2021 il gruppo di Asaad confrontava ancora una volta i risultati retrospettivi di un campione di pazienti sottoposti ad impianti in PEEK e titanio, eseguiti fra il 2010 ed il 2017<sup>65</sup>. Venivano presi in

considerazione un totale di 72 pazienti, di età media 55 anni, sottoposti a 77 cranioplastiche, 29 in PEEK e 48 in titanio. I tassi di complicanze fra i due campioni erano simili (24%), così come quelli di fallimento dell'impianto (7% per il PEEK e 13% per il titanio, in assenza di significatività statistica).

Nel 2022 il gruppo di Millward riportava l'esperienza con i materiali artificiali per cranioplastica in un arco temporale di 11 anni, dal 2010 al 2021<sup>66</sup>. In questa serie l'outcome primario era l'eventuale espianto, secondario a infezione, morbidità chirurgica o mortalità. Venivano inclusi un totale di 287 pazienti, con un'età media di 42.9 anni. I materiali esaminati includevano il titanio compatto (67 casi, il 23.3%), l'idrossiapatite (64 casi, il 22.3%), il titanio in forma di rete per difetti di minori dimensioni (55 pazienti, 23.3%), il PMMA modellato a mano (26 casi, il 9.1%) ed il PEEK (16 casi, il 5.6%). Il follow-up medio era di 85 mesi. L'espianto secondario ad infezione appariva in questa serie meno frequente sia con l'uso dell'idrossiapatite che con l'acrilico. L'uso delle reti in titanio sembrava inoltre favorire la mortalità.

Ancora nel 2022, il gruppo di Celik riportava i risultati di una serie comparativa includente osso autologo, PMMA, polietilene poroso e titanio<sup>67</sup>. Venivano arruolati 85 pazienti, trattati in un arco di tempo di 3 anni. Trentatré pazienti subivano il reimpianto di osso autologo, 32 di PMMA, 12 di polietilene, 8 di titanio. Il tasso di complicanze più elevato apparteneva al gruppo del metilmetacrilato (21.9% di complicanze, tasso di infezione 18.7%), seguito dall'osso autologo (18.2%, con infezione al 9.1%), dal polietilene (16.6% di complicanze, 8.3% di infezioni) ed infine dal titanio (nessuna complicanza né infezione).

In uno dei lavori più recenti, Yao (2022) paragonava i risultati di un campione di 211 pazienti sottoposti a cranioplastica con PEEK (106) o titanio (105)<sup>68</sup>. I casi di infezione di ferita fra i due gruppi erano paragonabili (3 pazienti, 2.6% per entrambi) allo stesso modo dell'infezioni profonde (7 ovvero il 6.6% per il PEEK e 4, cioè il 3.7% per il titanio).

Cosa si può realmente evincere dagli studi riportati? Esiste un materiale ottimale? Vi sono delle condizioni realmente favorevoli all'infezione?

Sfortunatamente nessuna di queste domande può al momento avere una risposta. Il fenomeno dell'infezione di cranioplastica è sicuramente di natura multifattoriale e sarebbe erroneo e riduttivo cercare di ricondurlo alla semplice natura molecolare dei materiali utilizzati per la ricostruzione cranica. Le serie comparative sono da questo punto di vista particolarmente interessanti. Partono infatti dal desiderio di comprendere se una tipologia di cranioplastica possa essere migliore (almeno sotto uno specifico punto di vista) rispetto ad un'altra. Storicamente, uno dei miti più resistenti nella storia recente della Neurochirurgia cranica ricostruttiva è stato rappresentato dalla sicurezza d'uso del titanio. Le serie pubblicate sono parse seguire questo trend fino all'ultimo decennio, quando complicanze come la perforazione della cute ad opera delle reti modellate a mano, i fenomeni irritativi sulla superficie interna dello scalpo e la tendenza alla formazione di effusioni sottogaleali hanno cominciato ad emergere. Allo stesso modo, sappiamo delle capacità biomimetiche dell'idrossiapatite, che una volta colonizzata diventa in tutto simile all'osso autologo. Sappiamo anche, d'altro canto, che le infezioni di questo materiale sono estremamente difficili da trattare a causa della capacità della matrice organica di interagire con i tessuti circostanti inglobandoli. A ciò va aggiunto che la rimozione di questo tipo di cranioplastica, una volta consolidata, richiede una vera e propria nuova craniotomia, con i rischi associati legati alla manipolazione di un parenchima sottostante già danneggiato in precedenza. Infine, piccoli residui granulari rimasti nel sito chirurgico possono mantenere l'infezione e portare alla formazione di fistole cutanee, che richiedono ulteriori procedure di toilette chirurgica. Le enormi differenze statistiche fra serie e serie rispetto al PMMA sono emblematiche: laddove per alcuni autori questa sostanza è sinonimo di infezione, per altri lo è di riuscita della protesi, in particolare nei casi in cui sia stata utilizzata la modellazione tridimensionale. L'unico materiale sul quale esiste una sostanziale omogeneità dei dati riguarda l'ultimo arrivato, il

PEEK. Sebbene questo risultato necessiti ampi numeri per essere verificato, la natura assolutamente inerte dello stesso potrebbe giocare da questo punto di vista un ruolo fondamentale.

## **Bibliografia**

- 1) Rosinski CL, Chaker AN, Zakrzewski J, Geever B, Patel S, Chiu RG, Rosenberg DM, Parola R, Shah K, Behbahani M, Mehta AI. Autologous Bone Cranioplasty: A Retrospective Comparative Analysis of Frozen and Subcutaneous Bone Flap Storage Methods. *World Neurosurg.* 2019 Nov;131:e312-e320. doi: 10.1016/j.wneu.2019.07.139. Epub 2019 Jul 25
- 2) Jeon JP, Heo Y, Kang SH, Yang JS, Choi HJ, Cho YJ. Retrospective Chronologic Computed Tomography Analysis of Bone Flap Fusion and Resorption After Craniotomy and Autologous Cryopreserved Cranioplasty. *World Neurosurg.* 2019 Sep;129:e900-e906. doi: 10.1016/j.wneu.2019.06.088. Epub 2019 Jun 21
- 3) Corliss B, Gooldy T, Vaziri S, Kubilis P, Murad G, Fargen K. Complications After In Vivo and Ex Vivo Autologous Bone Flap Storage for Cranioplasty: A Comparative Analysis of the Literature. *World Neurosurg.* 2016 Dec;96:510-515. doi: 10.1016/j.wneu.2016.09.025. Epub 2016 Sep 16
- 4) Cheng CH, Lee HC, Chen CC, Cho DY, Lin HL. Cryopreservation versus subcutaneous preservation of autologous bone flaps for cranioplasty: comparison of the surgical site infection and bone resorption rates. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014 Sep;124:85-9. doi: 10.1016/j.clineuro.2014.06.029. Epub 2014 Jul 1
- 5) Fan MC, Wang QL, Sun P, Zhan SH, Guo P, Deng WS, Dong Q. Cryopreservation of Autologous Cranial Bone Flaps for Cranioplasty: A Large Sample Retrospective Study. *World Neurosurg.* 2018 Jan;109:e853-e859. doi: 10.1016/j.wneu.2017.10.112. Epub 2017 Nov 20

- 6) Melin S, Haase I, Nilsson M, Claesson C, Östholm Balkhed Å, Tobieson L. Cryopreservation of autologous bone flaps following decompressive craniectomy: A new method reduced positive cultures without increase in post-cranioplasty infection rate. *Brain Spine*. 2022 Jul 22;2:100919. doi: 10.1016/j.bas.2022.100919. eCollection 2022
- 7) Shafiei M, Sourani A, Saboori M, Aminmansour B, Mahram S. Comparison of subcutaneous pocket with cryopreservation method for storing autologous bone flaps in developing surgical wound infection after Cranioplasty: A randomized clinical trial. *J Clin Neurosci*. 2021 Sep;91:136-143. doi: 10.1016/j.jocn.2021.06.042. Epub 2021 Jul 7
- 8) Takeuchi H, Higashino Y, Hosoda T, Yamada S, Arishima H, Kodera T, Kitai R, Kikuta K. Long-term follow-up of cryopreservation with glycerol of autologous bone flaps for cranioplasty after decompressive craniectomy. *Acta Neurochir (Wien)*. 2016 Mar;158(3):571-5. doi: 10.1007/s00701-015-2679-y. Epub 2016 Jan 6
- 9) Almendárez-Sánchez CA, Solorio-Pineda S, Ramírez-Sosa MA, Ramos-Martínez GA, Ortega-Espino J, Tafur-Grandett AA. Cranioplasty with cryopreserved autologous bone in craniectomized patients due to brain trauma, a current and safe option: Experience of 97 cases. *Cir Cir*. 2022;90(4):529-533. doi: 10.24875/CIRU.21000330
- 10) Barzaghi LR, Parisi V, Gigliotti CR, Giudice L, Snider S, Dell'Acqua A, Del Vecchio A, Mortini P. Bone resorption in autologous cryopreserved cranioplasty: quantitative evaluation, semiquantitative score and clinical significance. *Acta Neurochir (Wien)*. 2019 Mar;161(3):483-491. doi: 10.1007/s00701-018-03789-x. Epub 2019 Jan 7
- 11) Godil SS, Shamim MS, Enam SA, Qidwai U, Qadeer M, Sobani ZA. Cranial reconstruction after decompressive craniectomy: prediction of complications using fuzzy logic. *J Craniofac Surg*. 2011 Jul;22(4):1307-11. doi: 10.1097/SCS.0b013e31821c6d37

- 12) Pochon JP, Klöti J. Cranioplasty for acquired skull defects in children--a comparison between autologous material and methylmethacrylate 1974-1990. *Eur J Pediatr Surg.* 1991 Aug;1(4):199-201. doi: 10.1055/s-2008-1042487
- 13) Luparello D, Bruschi S, Verna G, Bogetti P, Datta G, Fracalvieri M, Luparello V. [Cranioplasty with polymethylmethacrylate. The clinico-statistical considerations]. *Minerva Chir.* 1998 Jun;53(6):575-9
- 14) TIAZHKUN NF. [Primary cranioplasty using polymethylmethacrylate]. *Vestn Khir Im I I Grek.* 1960 Jun;84:36-8
- 15) Tadros M, Costantino PD. Advances in cranioplasty: a simplified algorithm to guide cranial reconstruction of acquired defects. *Facial Plast Surg.* 2008 Jan;24(1):135-45. doi: 10.1055/s-2008-1037455
- 16) Beumer J 3rd, Firtell DN, Curtis TA. Current concepts in cranioplasty. *J Prosthet Dent.* 1979 Jul;42(1):67-77. doi: 10.1016/0022-3913(79)90332-9
- 17) Williams LR, Fan KF, Bentley RP. Custom-made titanium cranioplasty: early and late complications of 151 cranioplasties and review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015 May;44(5):599-608. doi: 10.1016/j.ijom.2014.09.006. Epub 2014 Dec 5
- 18) Hosameldin A, Osman A, Hussein M, Gomaa AF, Abdellatif M. Three dimensional custom-made PEEK cranioplasty. *Surg Neurol Int.* 2021 Nov 30;12:587. doi: 10.25259/SNI\_861\_2021. eCollection 2021
- 19) Lewitz M, Salma A, Welzel Saravia H, Sakellaropoulou I, Sarkis HM, Ewelt C, Fortmann T, Wilbers E, Schipmann S, Suero Molina E, Santacroce A, Zawy Alsofy S. Load-Bearing Capacity and Design Advantages of a Custom-Made, Thin Pure-Titanium Cranioplasty (CranioTop). *J Craniofac Surg.* 2021 Jun 1;32(4):1291-1296. doi: 10.1097/SCS.00000000000007430

- 20) Bruno Z, Angelo N, Riccardo S, Nicola Z, Stefano P, Camillo PP, Federico N, Carlotta M. Custom-made Hydroxyapatite Cranioplasty: Radiological and Histological Evidence of Bone-Biomaterial Osteointegration in Five Patients. *Asian J Neurosurg*. 2020 Feb 25;15(1):198-203. doi: 10.4103/ajns.AJNS\_208\_19. eCollection 2020 Jan-Mar
- 21) Cardona MJ, Turner C, Ross C, Baird E, Black RA. An improved process for the fabrication and surface treatment of custom-made titanium cranioplasty implants informed by surface analysis. *J Biomater Appl*. 2021 Jan;35(6):602-614. doi: 10.1177/0885328220957899. Epub 2020 Sep 11
- 22) Lindner D, Schlothofer-Schumann K, Kern BC, Marx O, Müns A, Meixensberger J. Cranioplasty using custom-made hydroxyapatite versus titanium: a randomized clinical trial. *J Neurosurg*. 2017 Jan;126(1):175-183. doi: 10.3171/2015.10.JNS151245. Epub 2016 Feb 26
- 23) Pöppe JP, Spendel M, Schwartz C, Winkler PA, Wittig J. The "springform" technique in cranioplasty: custom made 3D-printed templates for intraoperative modelling of polymethylmethacrylate cranial implants. *Acta Neurochir (Wien)*. 2022 Mar;164(3):679-688. doi: 10.1007/s00701-021-05077-7. Epub 2021 Dec 6
- 24) Martinez-Seijas P, Díaz-Galvis LA, Hernando J, Leizaola-Cardesa IO, Aguilar-Salvatierra A, Gómez-Moreno G. Polymethyl Methacrylate Custom-Made Prosthesis: A Novel Three-Dimension Printing-Aided Fabrication Technique for Cranial and/or Orbital Reconstruction. *J Craniofac Surg*. 2018 Jul;29(5):e438-e440. doi: 10.1097/SCS.0000000000004451
- 25) Rossini Z, Franzini A, Zaed I, Zingaretti N, Nicolosi F, Zanotti B. Custom-Made Porous Hydroxyapatite Cranioplasty in Patients with Tumor Versus Traumatic Brain Injury: A Single-Center Case Series. *World Neurosurg*. 2020 Jun;138:e922-e929. doi: 10.1016/j.wneu.2020.03.144. Epub 2020 Apr 6
- 26) Lethaus B, Safi Y, ter Laak-Poort M, Kloss-Brandstätter A, Banki F, Robbenmenke C, Steinseifer U, Kessler P. Cranioplasty with customized titanium and PEEK implants in a mechanical

stress model. *J Neurotrauma*. 2012 Apr 10;29(6):1077-83. doi: 10.1089/neu.2011.1794. Epub 2011 Dec 14

27) Barros A, Brauge D, QuÉhan R, Cavallier Z, Roux FE, Moysse E. One-Step Customized PEEK Cranioplasty After 3D Printed Resection Template Assisted Surgery for a Frontal Intraosseous Meningioma: A Case Report. *Turk Neurosurg*. 2021;31(1):142-147. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.30192-20.2

28) Wandell A, Papanastassiou A, Tarasiewicz I, Miller M. What is the Accuracy of PEEK Implants for Cranioplasty in Comparison to Their Patient Specific Surgical Plan? *J Oral Maxillofac Surg*. 2023 Jan;81(1):24-31. doi: 10.1016/j.joms.2022.09.004. Epub 2022 Sep 10

29) Moncayo-Matute FP, Peña-Tapia PG, Vázquez-Silva E, Torres-Jara PB, Moya-Loaiza DP, Abad-Farfán G, Andrade-Galarza AF. Surgical planning and finite element analysis for the neurocraneal protection in cranioplasty with PMMA: A case study. *Heliyon*. 2022 Sep 22;8(9):e10706. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10706. eCollection 2022 Sep

30) Kim BJ, Hong KS, Park KJ, Park DH, Chung YG, Kang SH. Customized cranioplasty implants using three-dimensional printers and polymethyl-methacrylate casting. *J Korean Neurosurg Soc*. 2012 Dec;52(6):541-6. doi: 10.3340/jkns.2012.52.6.541. Epub 2012 Dec 31

31) Nagayama K, Yoshikawa G, Somekawa K, Kohno M, Segawa H, Sano K, Shiokawa Y, Saito I. [Cranioplasty using the patient's autogenous bone preserved by freezing--an examination of post-operative infection rates]. *No Shinkei Geka*. 2002 Feb;30(2):165-9

32) Movassaghi K, Ver Halen J, Ganchi P, Amin-Hanjani S, Mesa J, Yaremchuk MJ. Cranioplasty with subcutaneously preserved autologous bone grafts. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jan;117(1):202-6. doi: 10.1097/01.prs.0000187152.48402.17

33) Arsim Morina I, Fatos Kelmendi, Qamile Morina, Shefki Dragusha, Feti Ahmeti, Dukagjin Morina, Kushtrim Gashi. Cranioplasty with subcutaneously preserved autologous bone grafts in

- abdominal wall-Experience with 75 cases in a post-war country Kosova. *Surg Neurol Int.* 2011;2:72. doi: 10.4103/2152-7806.81735. Epub 2011 May 28
- 34) Chiang HY, Steelman VM, Pottinger JM, Schlueter AJ, Diekema DJ, Greenlee JD, Howard MA 3rd, Herwaldt LA. Clinical significance of positive cranial bone flap cultures and associated risk of surgical site infection after craniotomies or craniectomies. *J Neurosurg.* 2011 Jun;114(6):1746-54. doi: 10.3171/2011.1.JNS10782. Epub 2011 Mar 4
- 35) Lee CH, Chung YS, Lee SH, Yang HJ, Son YJ. Analysis of the factors influencing bone graft infection after cranioplasty. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012 Jul;73(1):255-60. doi: 10.1097/TA.0b013e318256a150
- 36) Rosinski CL, Chaker AN, Zakrzewski J, Geever B, Patel S, Chiu RG, Rosenberg DM, Parola R, Shah K, Behbahani M, Mehta AI. Autologous Bone Cranioplasty: A Retrospective Comparative Analysis of Frozen and Subcutaneous Bone Flap Storage Methods. *World Neurosurg.* 2019 Nov;131:e312-e320. doi: 10.1016/j.wneu.2019.07.139. Epub 2019 Jul 25
- 37) Fan MC, Wang QL, Sun P, Zhan SH, Guo P, Deng WS, Dong Q. Cryopreservation of Autologous Cranial Bone Flaps for Cranioplasty: A Large Sample Retrospective Study. *World Neurosurg.* 2018 Jan;109:e853-e859. doi: 10.1016/j.wneu.2017.10.112. Epub 2017 Nov 20
- 38) Lee SC, Wu CT, Lee ST, Chen PJ. Cranioplasty using polymethyl methacrylate prostheses. *J Clin Neurosci.* 2009 Jan;16(1):56-63. doi: 10.1016/j.jocn.2008.04.001
- 39) Joby Jaber 1, Kenneth Gambrell, Paul Tiwana, Chris Madden, Rick Finn. Long-term clinical outcome analysis of poly-methyl-methacrylate cranioplasty for large skull defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Feb;71(2):e81-8. doi: 10.1016/j.joms.2012.09.023
- 40) Hsu VM, Tahiri Y, Wilson AJ, Grady MS, Taylor JA. A preliminary report on the use of antibiotic-impregnated methyl methacrylate in salvage cranioplasty. *J Craniofac Surg.* 2014 Mar;25(2):393-6. doi: 10.1097/SCS.0000000000000655

- 41) Worm PV, do Nascimento TL, do Couto Nicola F, Sanches EF, Dos Santos Moreira CF, Rogério LP, Dos Reis MM, Finger G, Collares MV. Polymethylmethacrylate imbedded with antibiotics cranioplasty: An infection solution for moderate and large defects reconstruction? *Surg Neurol Int.* 2016 Nov 9;7(Suppl 28):S746-S751. doi: 10.4103/2152-7806.193725. eCollection 2016
- 42) Jesús A Morales-Gómez, Everardo Garcia-Estrada, Jorge E Leos-Bortoni, Miriam Delgado-Brito, Luis E Flores-Huerta, Adriana A De La Cruz-Arriaga, Luis J Torres-Díaz, Ángel R Martínez-Ponce de León. Cranioplasty with a low-cost customized polymethylmethacrylate implant using a desktop 3D printer. *J. Neurosurg.* 2018 Jun 15;1-7. doi: 10.3171/2017.12.JNS172574. Online ahead of print
- 43) Joffe JM, Aghabeigi B, Davies EH, Harris M. A retrospective study of 66 titanium cranioplasties. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1993 Jun;31(3):144-8. doi: 10.1016/0266-4356(93)90112-a
- 44) Eufinger H, Wehmöller M. Microsurgical tissue transfer and individual computer-aided designed and manufactured prefabricated titanium implants for complex craniofacial reconstruction. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2002;36(6):326-31. doi: 10.1080/028443102321096311
- 45) Cabraja M, Klein M, Lehmann TN. Long-term results following titanium cranioplasty of large skull defects *Neurosurg Focus.* 2009 Jun;26(6):E10. doi: 10.3171/2009.3.FOCUS091.
- 46) Kshetry VR, Hardy S, Weil RJ, Angelov L, Barnett GH. Immediate titanium cranioplasty after debridement and craniectomy for postcraniotomy surgical site infection. *Neurosurgery.* 2012 Mar;70(1 Suppl Operative):8-14; discussion 14-5. doi: 10.1227/NEU.0b013e31822fef2c
- 47) Wiggins A, Austerberry R, Morrison D, Ho KM, Honeybul S. Cranioplasty with custom-made titanium plates--14 years experience. *Neurosurgery.* 2013 Feb;72(2):248-56; discussion 256. doi: 10.1227/NEU.0b013e31827b98f3

- 48) Joshua J Wind 1, Chima Ohaegbulam, Fabio M Iwamoto, Peter M Black, John K Park. Immediate titanium mesh cranioplasty for treatment of postcraniotomy infections. *World Neurosurg* 2013 Jan;79(1):207.e11-3. doi: 10.1016/j.wneu.2011.02.013. Epub 2011 Nov 7
- 49) Williams LR, Fan KF, Bentley RP. Custom-made titanium cranioplasty: early and late complications of 151 cranioplasties and review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 May;44(5):599-608. doi: 10.1016/j.ijom.2014.09.006. Epub 2014 Dec 5
- 50) Eun-Kyung Park 1, Jun-Young Lim, In-Sik Yun, Ju-Seong Kim, Su-Heon Woo, Dong-Seok Kim, Kyu-Won Shim. Cranioplasty Enhanced by Three-Dimensional Printing: Custom-Made Three-Dimensional-Printed Titanium Implants for Skull Defects. *J Craniofac Surg*. 2016 Jun;27(4):943-9. doi: 10.1097/SCS.0000000000002656
- 51) Johnson PJ, Robbins DL, Lydiatt WM, Moore GF. Salvage of an infected hydroxyapatite cement cranioplasty with preservation of the implant material. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000 Oct;123(4):515-7. doi: 10.1067/mhn.2000.105182
- 52) Poetker DM, Pytynia KB, Meyer GA, Wackym PA. Complication rate of transtemporal hydroxyapatite cement cranioplasties: a case series review of 76 cranioplasties. *Otol Neurotol*. 2004 Jul;25(4):604-9. doi: 10.1097/00129492-200407000-00031
- 53) Lindner D, Schlothofer-Schumann K, Kern BC, Marx O, Müns A, Meixensberger J. Cranioplasty using custom-made hydroxyapatite versus titanium: a randomized clinical trial. *J Neurosurg*. 2017 Jan;126(1):175-183. doi: 10.3171/2015.10.JNS151245. Epub 2016 Feb 26
- 54) Stefini R, Signorini L. Cranioplasty: "Brescia protocol" for zero postsurgical site infection. *J Neurosurg Sci*. 2018 Apr;62(2):224-225. doi: 10.23736/S0390-5616.16.03922-9
- 55) Still M, Kane A, Roux A, Zanello M, Dezamis E, Parraga E, Sauvageon X, Meder JF, Pallud J. Independent Factors Affecting Postoperative Complication Rates After Custom-Made Porous

- Hydroxyapatite Cranioplasty: A Single-Center Review of 109 Cases. *World Neurosurg.* 2018 Jun;114:e1232-e1244. doi: 10.1016/j.wneu.2018.03.181. Epub 2018 Apr 3
- 56) Di Rienzo A, Colasanti R, Dobran M, Formica F, Della Costanza M, Carrassi E, Aiudi D, Iacoangeli M. Management of infected hydroxyapatite cranioplasty: Is salvage feasible? *Brain Spine.* 2022 Jun 21;2:100907. doi: 10.1016/j.bas.2022.100907. eCollection 2022
- 57) Hanasono MM, Goel N, DeMonte F. Calvarial reconstruction with polyetheretherketone implants. *Ann Plast Surg.* 2009 Jun;62(6):653-5. doi: 10.1097/SAP.0b013e318184abc7
- 58) Rosenthal G, Ng I, Moscovici S, Lee KK, Lay T, Martin C, Manley GT. Polyetheretherketone implants for the repair of large cranial defects: a 3-center experience. *Neurosurgery.* 2014 Nov;75(5):523-9; discussion 528-9. doi: 10.1227/NEU.0000000000000477
- 59) O'Reilly EB, Barnett S, Madden C, Welch B, Mickey B, Rozen S. Computed-tomography modeled polyether ether ketone (PEEK) implants in revision cranioplasty. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2015 Mar;68(3):329-38. doi: 10.1016/j.bjps.2014.11.001. Epub 2014 Nov 21
- 60) Jonkergouw J, van de Vijfeijken SECM, Nout E, Theys T, Van de Castele E, Folkersma E, Depauw PRAM, Becking AJ. Outcome in patient-specific PEEK cranioplasty: A two-center cohort study of 40 implants. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016 Sep;44(9):1266-72. doi: 10.1016/j.jcms.2016.07.005. Epub 2016 Jul 9
- 61) Al-Tamimi YZ, Sinha P, Trivedi M, Robson C, Al-Musawi TA, Hossain N, Mumford C, Towns G. Comparison of acrylic and titanium cranioplasty. *Br J Neurosurg.* 2012 Aug;26(4):510-3. doi: 10.3109/02688697.2011.633640. Epub 2012 Jun 11.
- 62) Thien A, King NK, Ang BT, Wang E, Ng I. Comparison of polyetheretherketone and titanium cranioplasty after decompressive craniectomy. *World Neurosurg.* 2015 Feb;83(2):176-80. doi: 10.1016/j.wneu.2014.06.003. Epub 2014 Jun 5

- 63) D Oliver J, Banuelos J, Abu-Ghname A, Vyas KS, Sharaf B. Alloplastic Cranioplasty Reconstruction: A Systematic Review Comparing Outcomes With Titanium Mesh, Polymethyl Methacrylate, Polyether Ether Ketone, and Norian Implants in 3591 Adult Patients *Ann Plast Surg*. 2019 May;82(5S Suppl 4):S289-S294. doi: 10.1097/SAP.0000000000001801
- 64) Henry J, Amoo M, Taylor J, O'Brien DP. Complications of Cranioplasty in Relation to Material: Systematic Review, Network Meta-Analysis and Meta-Regression *Neurosurgery*. 2021 Aug 16;89(3):383-394. doi: 10.1093/neuros/nyab180
- 65) Asaad M, Taslakian EN, Banuelos J, Abu-Ghname A, Bite U, Mardini S, Van Gompel JJ, Sharaf B. Surgical and Patient-Reported Outcomes in Patients With PEEK Versus Titanium Cranioplasty Reconstruction. *J Craniofac Surg*. 2021 Jan-Feb 01;32(1):193-197. doi: 10.1097/SCS.00000000000007192
- 66) Millward CP, Doherty JA, Mustafa MA, Humphries TJ, Islim AI, Richardson GE, Clynh AL, Gillespie CS, Keshwara SM, Kolamunnage-Dona R, Brodbelt AR, Jenkinson MD, Duncan C, Sinha A, McMahon CJ. Cranioplasty with hydroxyapatite or acrylic is associated with a reduced risk of all-cause and infection-associated explantation. *Br J Neurosurg*. 2022 Jun;36(3):385-393. doi: 10.1080/02688697.2022.2077311. Epub 2022 May 24
- 67) Celik H, Kurtulus A, Yildirim ME, Tekiner A, Erdem Y, Kantarci K, Kul H, Bayar MA. The Comparison of Autologous Bone, Methyl-Methacrylate, Porous Polyethylene, and Titanium Mesh in Cranioplasty. *Turk Neurosurg*. 2022;32(5):841-844. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.37476-21.1
- 68) Yao S, Zhang Q, Mai Y, Yang H, Li Y, Zhang M, Zhang R. Outcome and risk factors of complications after cranioplasty with polyetheretherketone and titanium mesh: A single-center retrospective study. *Front Neurol*. 2022 Sep 21;13:926436. doi: 10.3389/fneur.2022.926436. eCollection 2022.

### **Capitolo III: Fenomenologia delle infezioni di cranioplastica**

Come si manifesta un'infezione di cranioplastica? Le descrizioni presenti in letteratura sono da questo punto di vista estremamente scarse e frammentarie, a causa del carattere proteiforme della patologia. Alla complessità della presentazione si aggiunge la scarsa predittività di alcuni degli esami che vengono tradizionalmente ritenuti indispensabili per la diagnosi nei casi di infezioni di altre regioni dell'organismo. I tre pilastri su cui si basa infatti l'identificazione di un focus infettivo sono infatti: 1) il quadro sierologico; 2) le evidenze radiologiche; 3) l'aspetto clinico (segni e sintomi).

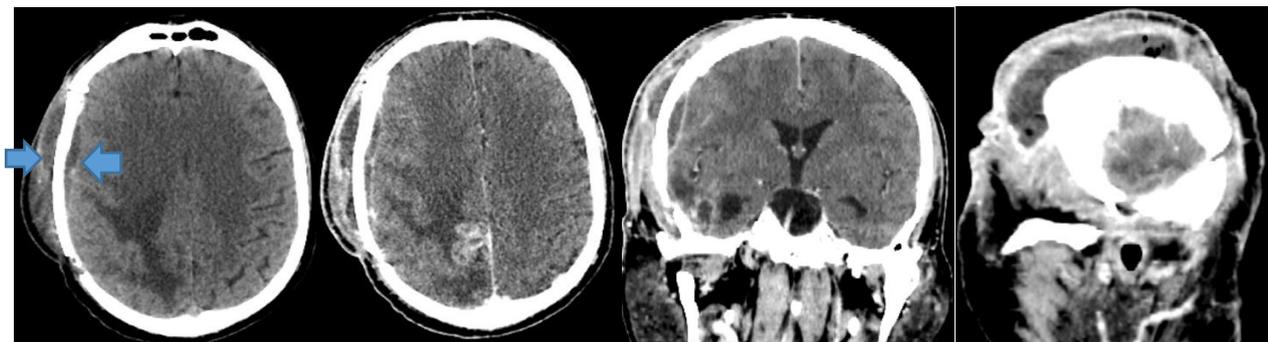
Sotto tutti e tre i punti di vista esistono però numerose difficoltà nel caso delle infezioni di cranioplastica<sup>1-3</sup>. In primo luogo queste difficoltà sono correlate al fatto che una eventuale positività di uno solo dei tre parametri considerati non depone necessariamente per una positività degli altri e soprattutto che laddove il quadro clinico è spesso illuminante e permette di discriminare, in quanto obbliga il chirurgo a prendere una decisione definitiva, l'opposto accade con l'interpretazione delle immagini e quella dei valori ematici<sup>4,5</sup>.

Analizzando le tre componenti, la prima a dover essere considerata è sicuramente la somma dei parametri di laboratorio da valutare per poter porre il sospetto della presenza di un'infezione di cranioplastica, sia che si tratti di osso autologo o, peggio, di un impianto artificiale. La leucocitosi è sicuramente il segno caratteristico della maggior parte degli eventi infettivi nell'organismo. Sfortunatamente perde gran parte del suo significato per il comparto cranico, con numerosi autori che riferiscono una sostanziale assenza della stessa in questi casi<sup>6</sup>. Allo stesso modo, i tre indici, velocità di eritrosedimentazione, proteina C-reattiva ed il più recente pro-calcitonina, vengono riportati come alterati in modi differenti, spesso nel range fisiologico anche in forme particolarmente aggressive, sebbene frequentemente in relazione all'inizio di trattamenti antibiotici empirici. Esiste comunque totale concordanza sulla positività dei valori in caso di sepsi recente o in atto. Un esempio è fornito dalla serie di Girgis, pubblicata nel 2015<sup>6</sup>. L'autore prendeva in considerazione una serie consecutiva di 239 cranioplastiche. 27 delle quali (pari all'11.3%) venivano sottoposte ad interventi ripetuti per

infezione. In questi casi dei pazienti che presentavano franca leucocitosi, nessuno presentava raccolte intra-assiali, solo 5 raccolte subdurali, solo uno una raccolta epidurale. Nell'85.2% dei pazienti la leucocitosi veniva considerata come un indice di falsa positività.

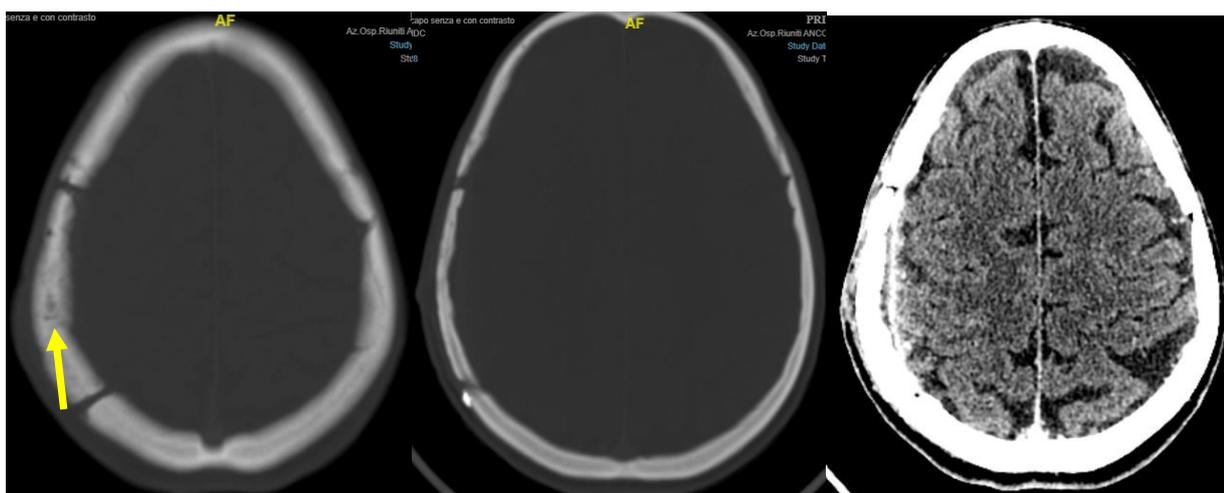
Una delle ragioni in grado di spiegare questo fenomeno potrebbe essere cercata nei farmaci che molto frequentemente vengono assunti dai pazienti neurochirurgici, come chemioterapici e corticosteroidi, l'uso dei quali provoca uno stato di immunosoppressione ed impedisce al corpo di montare una risposta di difesa adeguata. Un'altra ragione potrebbe essere trovata nel meccanismo patologico di sviluppo dell'infezione<sup>5</sup>. Lo smussarsi della risposta infiammatoria, che porta al reclutamento dei neutrofilii e di altre componenti plasmatiche verso il sito chirurgico può verificarsi a causa della localizzazione isolata dell'infezione, con raccolte purulente saccate. La tipica evidenza di questo fenomeno sta nella frequente negatività delle emocolture nei pazienti con infezione di cranioplastica. Nel lavoro di Coburn (2012) la ricerca di leucocitosi da sola non era in grado di predire la batteriemia.

L'aspetto radiologico potrebbe, in condizioni di incertezza, assumere maggior significato<sup>7-10</sup>. Nonostante ciò, esistono numerose differenze nella presentazione in neuroimaging fra i differenti tipi di infezione di cranioplastica. Le due grandi categorie sono rappresentate da un lato dagli opercoli autologhi, dall'altro dai materiali sintetici.



**Ascesso sottocutaneo ed epidurale (freccie) in opercolo autologo. Con il contrasto la raccolta presenta aspetto saccato. Piccole bolle aeree mostrano la sede di discontinuità cutanea.**

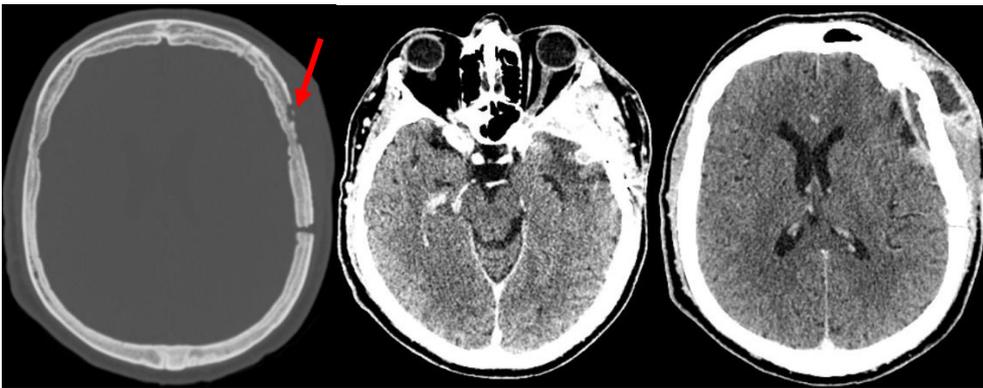
La manifestazione radiologica tende ad essere considerata come compartimentalizzata. Le recenti descrizioni in imaging sembrano aver iniziato a mutuare infatti il concetto di infezione superficiale e profonda del sito chirurgico. La presenza di un imbottimento con presa di contrasto del lembo cutaneo, di una raccolta epi-opercolare o nello spessore del muscolo temporale, in contemporanea con uno spessore dell'osso completamente conservato ed in assenza di una vera e propria deiscenza della cute, vengono considerate come elementi tipici di un'infezione superficiale del cavo chirurgico. Al contrario, effusioni sotto-opercolari, ispessimento delle meningi, raccolte ascessuali intracerebrali, fino a giungere a segni di ependimite, documentano un'infezione più diffusa e profonda<sup>11</sup>. Laddove la risonanza magnetica è estremamente utile in questa ultima condizione, la TC mantiene un'elevata significatività in merito alle modificazioni di struttura dell'opercolo<sup>8,12</sup>. Caratteristica è la comparsa di irregolarità del contorno, con aree a diversa densità, soprattutto laddove la corticale esterna dell'osso sia erosa e si osservi ormai un sostanziale assottigliamento dell'osso stesso. Aspetto altrettanto tipico è la presenza di una sorta di canale intraosseo, che coinvolge lo spazio trabecolare, la cui struttura risulta "tunnelizzata", legato ad una colonizzazione particolarmente aggressiva, il cui risultato finale sarà quello di una sorta di collasso l'uno sull'altro dei due tavolati.



**Area di cavitazione dell'osso in infezione batterica cronica (freccia gialla). Il resto della superficie opercolare sembra avere struttura conservata. Alla somministrazione di contrasto si conferma raccolta epidurale e dei piani superficiali.**

Nella maggior parte dei casi, solo una porzione dell'opercolo risulta alterata, creando il dubbio che si tratti di un comune riassorbimento osseo, soprattutto in caso di lunga distanza temporale fra il riposizionamento e l'osservazione radiologica.

Non è infrequente la comparsa di cavitazioni sulla superficie dell'opercolo, in forma singola o multipla, ma anche l'interpretazione di queste ultime è estremamente difficoltosa, potendo a volte trattarsi di comuni fenomeni di riassorbimento<sup>13</sup>.

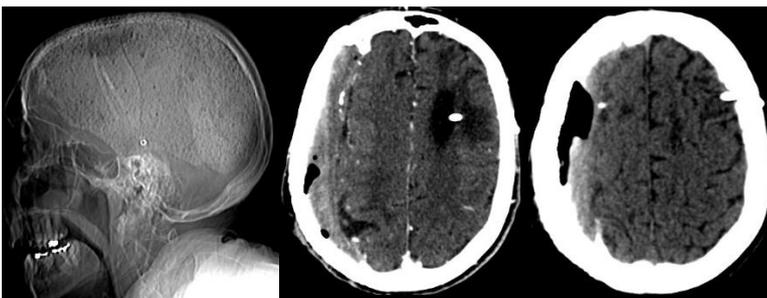
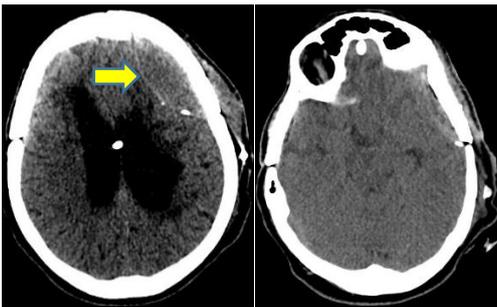
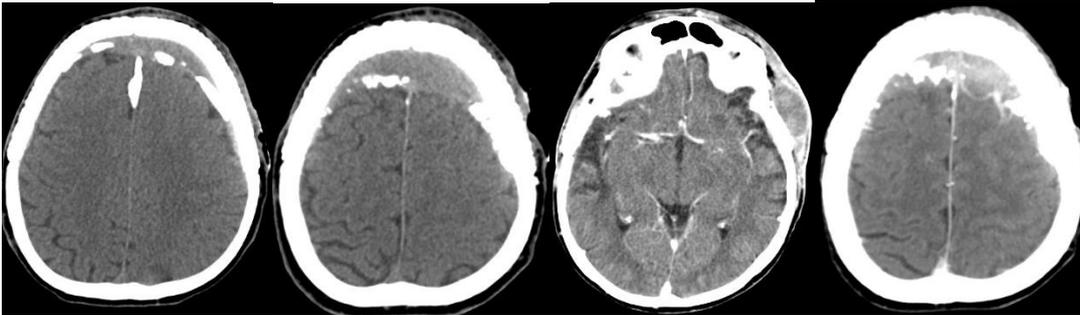


Tavolato osseo esterno eroso da processo infettivo (freccia rossa). Nelle immagini post-contrasto la raccolta è localizzata in prossimità dell'area di erosio, sia al di sotto del muscolo temporale, che perifericamente ad esso.

Eventuali raccolte subgaleali possono avere particolare rilevanza quando disposte in aree in cui i tessuti molli soprastanti appaiono ridotti di spessore. In taluni casi, a cute del tutto intatta, è possibile osservare la presenza di raccolte simil-saccate, che gonfiano il cuoio capelluto, sollevandolo verso l'alto, anche in assenza di soluzioni di continuo evidenti fra interno ed esterno del lembo chirurgico. Raccolte sopra e sotto-opercolari vengono pressochè sempre associate alla presenza di un focolaio infettivo acuto, così come la presenza di raccolte gassose.

Alcuni reperti sono al contrario caratteristici degli impianti di cranioplastica. Nel caso di infezione di una cranioplastica in idrossiapatite porosa ad esempio, la presenza di raccolte al di sotto dell'impianto indicherà pressochè sempre un quadro infettivo, non solo ma praticamente in ogni caso saranno associate a raccolte al di sopra della protesi, che apparirà francamente erosa<sup>14</sup>. Piuttosto interessante

è il fatto che nelle cranioplastiche bifrontali realizzate con due componenti uniti fra loro possa accadere di osservare una raccolta epidurale immediatamente sotto uno solo dei due impianti, elemento che potrebbe, almeno teoricamente, consentire la rimozione della sola emiporzione di cranioplastica infetta.

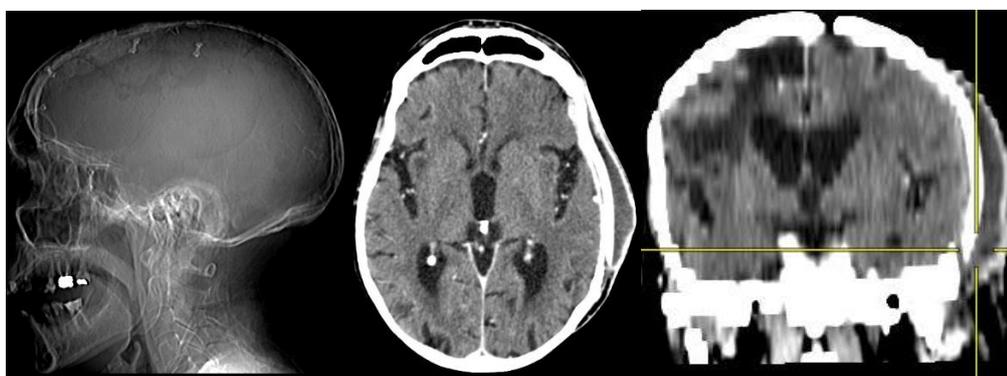
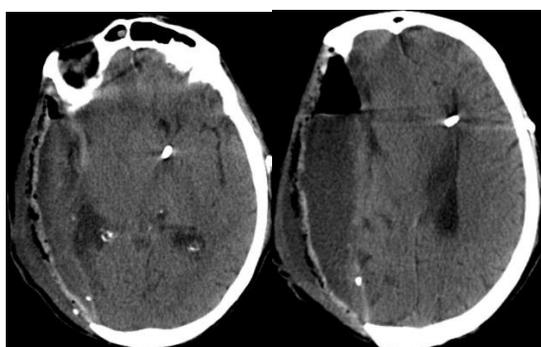


**Esempi di raccolte infette in cranioplastiche in idrossiapatite. In alto ascesso epidurale frontale in progressa craniotomia bifrontale. Al centro (freccia gialla), semiluna di tessuto purulento a distribuzione epidurale. In basso, raccolta epidurale associata ad aria.**

Per quanto riguardante invece l'acrilico, caratteristica è la tendenza alla formazione di raccolte gassoso-liquide, sia al di sopra dell'impianto che al di sotto dello stesso e la frequente evidenza di

tragitti fistolosi al di sotto del lembo cutaneo evidenti alla semplice TC senza mezzo di contrasto. In caso di utilizzo del titanio, è frequente osservare un significativo imbottimento dei tessuti molli in contemporanea con un netto assottigliamento focale, laddove si verificherà o si è già verificata una rottura cutanea<sup>15</sup>. Anche nel caso del PEEK, grossolane raccolte extradurali sono piuttosto tipiche, insieme con piccole quote al di sopra della cranioplastica, verosimilmente colate dai fori della stessa verso l'ambiente circostante.

In tutti i casi, infezioni molto aggressive altereranno la tenuta del sistema di fissaggio portando occasionalmente all'evidenza di una dislocazione parziale della cranioplastica.



**In alto, infezione di cranioplastica in PMMA. Evidenza di raccolta epicranica ed epidurale, liquida frammista ad aria.**

**In basso, ascesso sottocutaneo con minima componente epidurale su cranioplastica in PEEK.**

I sintomi clinici sono comunque il vero piatto forte delle infezioni di cranioplastica, soprattutto per la vastità di presentazioni possibili. In primo luogo la febbre, considerata in passato elemento utile ai

fini diagnostici, ha perso gran parte della sua rilevanza. Nel già citato studio di Girgis, solo il 7.4% dei pazienti infetti (2 su 27) aveva una temperatura al di sopra di 38°C<sup>6</sup>. Il tasso di falsa negatività per la febbre in questo studio era del 92.6%. Il dolore in corrispondenza del lembo è al contrario un importante elemento clinico, spesso del tutto trascurato. Pazienti con lembi significativamente assottigliati sono tipicamente affetti da dolore nella sede di posizionamento della miniplacche e sono proprio questi i soggetti a rischio più elevato. La ricrescita del capillizio tende frequentemente ad occultare le aree ove le placche sono maggiormente sopraelevate, il che rende necessaria una accurata ispezione del lembo in caso di dolore riferito ad un'area specifica.



Non esistono comunque al momento studi statistici che si siano soffermati su questo aspetto. L'arrossamento in corrispondenza di una qualunque regione dei lembi sovrastanti un impianto di cranioplastica, sia esso autologo od artificiale, rappresenta un altro degli elementi che richiede accurata valutazione. Si può infatti presentare in due forme molto diverse, la prima in associazione con una modificazione dello spessore del lembo cutaneo (assottigliamento, imbottimento, presenza contemporanea di entrambi), la seconda semplicemente come un fenomeno locale, a volte a carattere

transitorio. Come ovvio, è praticamente impossibile predire se questo tipo di cambiamento possa essere predittore di una rottura delle pelle, perciò anche in questi casi viene comunemente consigliata una stretta osservazione clinica, così da poter prevenire la comparsa di una deiscenza propriamente detta, con conseguente esposizione dell'impianto ricostruttivo.



A tale scopo, l'esecuzione di un esame TC encefalo con contrasto potrebbe servire come mezzo indicativo precoce di infezione e permettere pertanto l'inizio di un trattamento antibiotico prolungato e ad ampio spettro. Un fenomeno non infrequente è rappresentato dai casi di ascessualizzazione focale al di sotto del muscolo temporale. L'aspetto di questi pazienti è estremamente caratteristico, in quanto

in corrispondenza dello pterion si osserva una sorta di sfera sopraelevata, non solo spesso a margini regolari ma di consistenza estremamente variabile.



In questi pazienti l'evoluzione in assenza di antibiotico-terapia mirata è pressochè costantemente quella di un estremo assottigliamento della cute fronto-orbitaria, seguito dalla formazione di un granuloma superficiale ed infine dalla rottura propria della cute con esposizione della protesi, un evento ad altissimo impatto sul futuro della cranioplastica, a causa della successiva retrazione del lembo, alterato nella sua vascolarizzazione dalla presenza di multiple linee di taglio. Il principale agente causale è un danno vascolare o da retrazione a carico del muscolo<sup>16</sup>. Un'eventuale riparazione in questa situazione richiederà quasi sempre la presenza in combinata dei colleghi chirurghi plastici, a causa della necessità di creare appositi lembi di rotazione o avanzamento, allo scopo di coprire il difetto con cute sana, per poter meglio garantire la guarigione del difetto stesso, soprattutto in caso di riposizionamento di una nuova cranioplastica.<sup>17</sup>

La presentazione più tipica dell'infezione di cranioplastica è sicuramente rappresentata dalla deiscenza di ferita. Nonostante non tutti i pazienti che manifestino tale disturbo siano affetti da

un'infezione di impianto, la comparsa di una deiscenza rappresenta già di per se un significativo rischio di contaminazione. Esistono due tipi di deiscenza, quella del tutto aperta, con l'impianto sottostante esposto, e quella con aspetto granulomatoso o crostoso, laddove la protesi non è visibile ma esiste una chiara soluzione di continuo dei tessuti cutanei, che non offre alcuna protezione e, al contrario, facilita la penetrazione batterica.



Da questo punto di vista è essenziale determinare esattamente cosa si intenda per deiscenza di ferita. Tale termine dovrebbe riferirsi esclusivamente alle situazioni in cui si abbia a che fare con una interruzione della continuità della cute in corrispondenza di una preesistente linea di incisione. Per tale motivo, non potrebbero essere incluse in questa definizione le perdite di integrità della cute verificatesi all'interno del territorio delimitato da un lembo cutaneo o quelle che si presentino in prossimità ma non nella immediata vicinanza dei bordi di una incisione lineare. Quest'ultima situazione andrebbe semplicemente descritta come tramite fistoloso. A questa semplice distinzione va aggiunta la presenza o meno di secrezioni in corrispondenza della deiscenza. In alcuni casi la regione interessata appare completamente asciutta ed apparentemente pulita, al punto che un eventuale tampone eseguito localmente risulta per lo più negativo o evidenzia germi comuni come lo *Stafilococco Epidermidis* multisensibile, ponendo legittimi dubbi sulla effettiva presenza di un germe da curare. Allo stesso tempo è però molto probabile un focolaio infettivo attivo qualora si osservi un mezzo di sintesi esposto in corrispondenza della deiscenza stessa, come nel caso di miniplacche e viti, che andrebbero comunque rimosse. Una situazione del tutto diversa è quella delle deiscenze

associate a stillicidio di secrezioni, siano esse sierose o francamente purulente. In entrambi i casi la presenza di un'infezione è praticamente certa, sebbene anche qui spesso il tampone possa risultare nullo o contaminato da germi comuni, non permettendo l'identificazione del patogeno principale. Laddove però una deiscenza non secernente possa avvalersi con successo di una semplice revisione della ferita chirurgica, da consolidare con il trattamento antibiotico, nelle deiscenze secernenti il tentativo di chiusura è destinato al fallimento. Alcuni autori distinguono proprio per tale motivo la deiscenza di ferita dall'infezione di cranioplastica, imputando la prima ad un probabile problema di guarigione dei tessuti molli e la seconda ad un coinvolgimento di tutto il sito chirurgico.

La comparsa di un tramite fistoloso è anch'essa un segno eclatante di infezione della cranioplastica<sup>17,18</sup>. Come già detto in precedenza, si possono osservare siti di fistola sia all'interno del lembo craniotomico che lungo i margini esterni dello stesso.



Si può dire che il primo caso è sicuramente di maggior gravità del secondo, in quanto la correzione chirurgica del difetto richiede la creazione di lembi apposti, nel secondo può a volte guarire con il semplice controllo dell'infezione, in quanto non collegata alla esposizione di alcun materiale. Inoltre, quanto più lontana dal bordo di incisione e prossima al centro del lembo tanto più complessa sarà la correzione. In questi casi infatti la dimensione reale del difetto cutaneo è spesso sottostimata dal chirurgo, poiché per un'area di fistola di circa 1 cm la regione di cute malata (ovvero assottigliata al punto da aver perso quasi completamente il margine dermico e sottocutaneo) sarà pari ad almeno 4 volte tanto. Durante la riparazione intraoperatoria i margini tenderanno infine a sfrangiarsi

ulteriormente. La chiusura di una soluzione di continuo di queste dimensioni compromette la capacità di copertura anche dei lembi di maggiori dimensioni, portando alla riduzione di dimensioni e alla necessità di avanzare o ruotare altra cute. I tramiti fistolosi esterni al lembo sono sicuramente la condizione meno frequente fra quelle osservate più comunemente e nonostante ciò rappresentano un problema di difficile soluzione, perché dimostrazione chiara di un massiccio interessamento di tutta la pregressa area chirurgica. Più tipiche degli opercoli ossei autologhi, tendono a manifestarsi soprattutto come conseguenza di infezioni torpide da gemi multi-resistenti.

Esistono sedi tipiche di deiscenza? Sfortunatamente la letteratura non ci è di alcun aiuto in questi casi. L'esperienza aneddotica fa comunque riferimento per lo più a cinque sedi. Per quanto riguarda le deiscenze di ferita propriamente dette, la regione retroauricolare basi-temporale, quella del passaggio temporo-parietale ed il terzo medio della porzione frontale di un lembo decompressivo. Per i tramiti fistolosi è tipica la localizzazione fronto-temporale subito al di sopra della precedente area di inserzione del muscolo temporale sulla linea temporale superiore e la porzione centrale del lembo.



In particolare in questi ultimi casi, si tratta praticamente sempre di aree di confine dal punto di vista vascolare. La regione fronto-temporale infatti soffre frequentemente del sacrificio (risalente al primo intervento) dell'arteria temporale superficiale ed alla successiva riapertura per la cranioplastica, nonché della trazione esercitata sul lembo usando gli appositi ami per esporre le regioni da trattare. La porzione centrale del lembo, allo stesso modo, è quella più lontana dal peduncolo vascolare e insieme quella che potrà risentire meno dell'effetto di rivascolarizzazione da parte dei vasi circostanti. Proprio per questo motivo il suo spessore è spesso ridotto rispetto alle aree circostanti l'incisione, il che la rende la zona con la potenziale minore resistenza nei confronti della proliferazione di un germe.

Le manifestazioni cliniche delle infezioni di cranioplastiche hanno caratteristiche eterogenee, spesso legate da un lato al tempo intercorso fra l'inizio dell'infezione stessa ed il momento in cui il paziente cerca l'attenzione del medico, dall'altro alla sede da cui il processo flogistico ha origine.

Come già detto in precedenza, la febbre non è sicuramente uno dei principali elementi diagnostici. Al contrario, le crisi comiziali possono essere uno dei principali sintomi in grado di portare alla diagnosi. Sebbene molti pazienti post-operati, in particolare se per trauma cranico grave e con riparazioni ossee di grande ampiezza, possano sviluppare sin dal momento del primo intervento un quadro di epilessia, per il quale hanno già iniziato un trattamento, l'infezione di cranioplastica cambia in modo drammatico il delicato equilibrio che permette al soggetto di mantenere un quadro di epilessia scarsamente attiva o non manifesta. La presenza di raccolte extradurali o di aria (come nel caso delle colonizzazioni da gram negativi) sono le due situazioni più frequenti. La spiegazione della comparsa delle crisi va riscontrata non tanto nell'effetto massa che eventuali raccolte possono provocare, quanto nell'irritazione meningeo, in una situazione nella quale il parenchima sottostante ha spesso aderito fortemente all'involucro meningeo stesso, per cui è in grado di risentire rapidamente di qualunque modificazione, in particolare in condizioni di pachimeningite reattiva. Se paragonate a quelle semiliquide o purulente, le raccolte gassose sono associate ad un rischio nettamente più alto di crisi comiziali, presumibilmente perché laddove le quote liquide tendono a spostarsi verso l'esterno del

lembo provocando la formazione di deiscenze, quelle gassose possono formarsi a lembo chiuso, restando intrappolate al di sotto della cranioplastica naturale o artificiale, determinando una marcata spinta sul tessuto cerebrale sottostante insieme con la componente reattiva.

La seconda più frequente presentazione clinica è legata al deterioramento dello stato di coscienza<sup>1,4,6</sup>. Nonostante molti pazienti giungano all'osservazione del neurochirurgo a causa della fuoriuscita di materiale da un'area della pregressa ferita chirurgica, in alcuni casi, soprattutto nei pazienti con un preesistente quadro di disabilità neurologica severa, possono restare misconosciuti per un lungo tempo, in particolare quando il paziente non si trovi nel proprio domicilio bensì a risiedere in strutture di lunga ospedalizzazione. La gravità del deterioramento è in diretta correlazione con il tempo intercorso dall'inizio dell'infezione e spesso questi pazienti possono apparire estremamente confusi e disorientati e mostrare la ricomparsa, su base puramente irritativa, di deficit che sembravano aver completamente recuperato. Le crisi epilettiche possono ancora una volta essere una causa delle alterazioni dello stato di coscienza, nonostante ciò nella maggior parte dei casi si a che fare con pazienti che hanno sviluppato una meningo-encefalite, con quadri TC di empiema subdurale o di ascessualizzazione intracerebrale. La situazione di maggiore gravità è quella presentata dai casi in cui il paziente è portatore di una derivazione ventricolo-peritoneale o ventricolo-atriale, che ha subito una contaminazione dal processo infettivo locale. La presenza di rigidità nucale, deterioramento severo dello stato di coscienza, evidenza alla TC con mezzo di contrasto di ependimite e l'associata dilatazione ventricolare francamente idrocefalica rappresentano una sfida alla sopravvivenza stessa del paziente, che richiede una ottimizzazione delle strategie di trattamento sia medico che chirurgico. Una condizione sicuramente particolare è quella dei pazienti in stato vegetativo persistente. Come si può in questi casi comprendere quanto sia severo il grado di compromissione dovuto al coinvolgimento cerebrale? Alcuni studi supportano l'idea che in questi pazienti sia possibile evidenziare un incremento sia dei fenomeni epilettogeni che di quelli neurovegetativi, in particolare

di questi ultimi, in forma di improvvisi eritemi cutanei diffusi, sudorazione intensa, incremento della preesistente spasticità.

I deficit motori controlaterali all'area infetta rappresentano l'ultimo e il non meno importante elemento diagnostico di un'infezione di cranioplastica nelle sue fasi più avanzate. Ancora una volta la causa va ricercata, come detto sopra, nei fenomeni irritativi locali ma anche e soprattutto nella presenza di raccolte extra- o intra-assiali che possono avere effetto massa. In queste condizioni una procedura di toilette diventerà una scelta obbligata.

Una menzione finale spetta ai sintomi a partenza locale del lembo craniotomico infetto. Secondo la letteratura, la cefalea è piuttosto rara in questa categoria di pazienti ed anche quando venga trovata il suo carattere resta spesso aspecifico, soprattutto perché i pazienti in condizioni neurologiche migliori tendono frequentemente a descrivere cefalalgia a seguito del riposizionamento della copertura cranica<sup>19</sup>. Un discorso completamente diverso va invece fatto per il dolore. Quest'ultimo può essere un sintomo premonitore di estrema importanza, poiché nelle fasi iniziali del processo flogistico infettivo, al rigonfiarsi della cute nelle aree infette corrisponde un aumento di tensione dei tessuti, con comparsa di disturbi locali. Allo stesso modo un paziente che si presenti descrivendo la comparsa di un dolore locale in corrispondenza del lembo craniotomico, accentuato dalla posizione supina nel giacere proprio su quel lato, andrebbe per lo meno sottoposto ad una ispezione locale dell'area di interesse.

Infine, sebbene abbastanza raro, la comparsa di una tumefazione cutanea visibile, andrà allo stesso modo presa in considerazione immediatamente. Come già esposto in precedenza, la formazione di raccolte ascessuali saccate al di sotto del muscolo temporale si manifesta frequentemente con il comparire di veri e propri sollevamenti del cuoio capelluto, che il paziente non fa fatica a notare e riferire.

Da quanto detto, si può facilmente comprendere come identificare precocemente una infezione di cranioplastica sia tutt'altro che facile, poiché segni e sintomi presentati sono per lo più degli indizi,

che possono fra l'altro manifestarsi e poi sparire nuovamente prima della comparsa di un quadro di infezione franco. La maggioranza degli autori di letteratura ritiene pertanto che solo una accurata combinazione di elementi clinici e diagnostici sia in grado di puntare l'osservatore nella giusta direzione. Una valutazione clinica con ispezione del lembo e precisa anamnesi dei disturbi riferiti dal paziente andrà sempre accompagnata da un panel sierologico e, al minimo, da un esame TC senza e con mezzo di contrasto. Nella maggior parte dei casi l'insieme di questi fattori e, in caso di deiscenza, l'uso di eventuale striscio della ferita profonda, potranno puntare il neurochirurgo nella giusta direzione, aiutandolo a sviluppare una strategia adeguata, orientata sul paziente.

## Bibliografia

- 1) Bhaskar IP, Inglis TJ, Lee GY. Clinical, radiological, and microbiological profile of patients with autogenous cranioplasty infections. *World Neurosurg.* 2014 Sep-Oct;82(3-4):e531-4. doi: 10.1016/j.wneu.2013.01.013. Epub 2013 Jan 5.
- 2) American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Medicine.* 1992;20:864-74
- 3) Brun-Bruissson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 2000;26:S64-74
- 4) McIntyre LK, Warner KJ, Nester TA, Nathens AB. The incidence of post-discharge surgical site infection in the injured patient. *J Trauma.* 2009;66:407-10
- 5) Walcott BP, Redjal N, Coumans JVCE. Infection following operations on the central nervous system: deconstructing the myth of the sterile field. *Neurosurg.* 2012;33:8

- 6) Girgis F, Walcott BP, Kwon CS, Sheth SA, Asaad W, Nahed BV, Eskandar EN, Coumans JV. Can J Neurol Sci . 2015 Jul;42(4):255-9. doi: 10.1017/cjn.2015.46. Epub 2015 Jun 11. The absence of Fever or Leukocytosis Does Not Exclude Infection Following Cranioplasty
- 7) Kimchi G, Stylianou P, Wohl A, Hadani M, Cohen ZR, Zauberman J, Feldman Z, Spiegelmann R, Nissim O, Zivly Z, Penn M, Harnof S. Predicting and reducing cranioplasty infections by clinical, radiographic and operative parameters - A historical cohort study. J Clin Neurosci. 2016 Dec;34:182-186. doi: 10.1016/j.jocn.2016.06.007. Epub 2016 Jul 16.
- 8) Tamaki T, Eguchi T, Sakamoto M, Teramoto A. Use of diffusion weighted magnetic resonance imaging in empyema after cranioplasty. Br J Neurosurg. 2004;18:40-4
- 9) Xu XX, Li B, Yang HF, Du Y, Li Y, Wang WX. Can diffusion weighted imaging be used to differentiate brain abscess from other ring-enhancing brain lesions? A meta-analysis. Clin Radiol. 2014;69:909-15
- 10) Bruni C, Padovano F, Travascio L, Schillaci O, Simonetti G. Usefulness of hybrid SPECT/CT for the 99mTc-HMPAO-labeled leukocyte scintigraphy in a case of cranial osteomyelitis. Braz J Infect Dis. 2008;12:558-60
- 11) Raju D, Bhosle R, Krishnan P. Epidural Fluid Collections After Cranioplasty. Neurol India. 2022 Jul-Aug;70(4):1629-1634. doi: 10.4103/0028-3886.355177
- 12) Sinclair AG, Scoffings DJ. Imaging of the post-operative cranium. Radiographics. 2010 Mar;30(2):461-82. doi: 10.1148/rg.302095115
- 13) Febres Aldana AJ, Rios P. Acute Mastoiditis With Intracranial Complications in a Young Adult With History of Cranioplasty: The Rule in the Post-Antibiotic Era. Cureus. 2020 Jul 29;12(7):e9452. doi: 10.7759/cureus.9452

- 14) Zanotti B, Zingaretti N, Verlicchi A, Alfieri A, Parodi PC. Successful Strategies for Dealing With Infected, Custom-Made Hydroxyapatite Cranioplasty. *J Craniofac Surg*. 2018 Jul;29(5):1127-1131. doi: 10.1097/SCS.0000000000004415
- 15) Benzel EC, Thammavaram K, Kesterson L. The diagnosis of infections associated with acrylic cranioplasties. *Neuroradiology*. 1990;32(2):151-3. doi: 10.1007/BF00588566
- 16) Jin SW, Kim SD, Ha SK, Lim DJ, Lee H, You HJ. Analysis of the Factors Affecting Surgical Site Infection and Bone Flap Resorption after Cranioplasty with Autologous Cryopreserved Bone: The Importance of Temporalis Muscle Preservation. *Turk Neurosurg*. 2018;28(6):882-888. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.21333-17.2
- 17) Di Rienzo A, Pangrazi PP, Riccio M, Colasanti R, Ghetti I, Iacoangeli M. Skin flap complications after decompressive craniectomy and cranioplasty: Proposal of classification and treatment options. *Surg Neurol Int*. 2016 Nov 9;7(Suppl 28):S737-S745. doi: 10.4103/2152-7806.193724. eCollection 2016
- 18) Di Rienzo A, Colasanti R, Gladi M, Dobran M, Della Costanza M, Capece M, Veccia S, Iacoangeli M. Timing of cranial reconstruction after cranioplasty infections: are we ready for a re-thinking? A comparative analysis of delayed versus immediate cranioplasty after debridement in a series of 48 patients. *Neurosurg Rev*. 2021 Jun;44(3):1523-1532. doi: 10.1007/s10143-020-01341-z. Epub 2020 Jun 26
- 19) Azmi A, Latiff AZ, Johari A. Methyl methacrylate cranioplasty. *Med J Malaysia*. 2004 Aug;59(3):418-21.

#### **Capitolo IV: Il trattamento chirurgico, lo stato dell'arte**

Scegliere cosa fare in presenza di un'infezione di cranioplastica sembrerebbe a prima vista estremamente facile. Storicamente viene tramandata una sola possibile via d'uscita da questa situazione, consistente nella rimozione della cranioplastica, sia essa autologa o protesica<sup>1</sup>. Poco importa, secondo questi dettami, quale sia lo stato dell'infezione, se sia superficiale o profonda: una esposizione dell'impianto, di qualunque entità, anche minima, corrisponderebbe secondo questa logica ad un'acclarata infezione dello stesso, il cui andamento può essere solo progressivo e ingravescente. Ancora, dati questi presupposti, non sembrerebbe esistere nessun motivo per attendere prima della rimozione, in particolare non dovrebbe essere preso in considerazione lo stato clinico del paziente<sup>2</sup>. Vigile o rallentato, in coma o perfettamente lucido, febbrile o afebrile, portatore di una deiscenza purulenta e maleodorante o di una esposizione di placchetta senza alcuno stillicidio, neanche sieroso o ancora, più semplicemente di un rigonfiamento in corrispondenza del lembo, non esisterebbe ragione per dilazionare un trattamento, quello di rimozione dell'opercolo, sostanzialmente curativo<sup>3</sup>. Alcune osservazioni in merito a questa tesi sono però necessarie, considerato anche il lungo arco di tempo trascorso dall'epoca durante la quale queste soluzioni vennero concepite. Rimuovere una cranioplastica, magari per la seconda o addirittura la terza volta, in particolare quando non si abbia a che fare con una craniotomia elettiva bensì con gli esiti di una craniectomia e dunque con la necessità di tornare, per il paziente, ad un gap osseo di grandi dimensioni, non può mai essere considerata una soluzione semplice. In primo luogo, non tutti i pazienti sono in grado di tollerare tale rimozione. Da un lato in alcuni casi la riduzione della vascolarizzazione locale a seguito dell'effetto da compartimento aperto tipico dei pazienti craniectomizzati può portare ad un brusco ritorno indietro dal punto di vista neurologico, a volte con la ricomparsa di disturbi presenti prima della chiusura della calotta, altre con un brusco aggravamento degli stessi, a volte fino a giungere ad un punto di non ritorno senza più ulteriore recupero delle funzioni perdute<sup>4</sup>. Lungo questa strada, a seguito dello sbilanciamento dell'effetto della pressione atmosferica sul lembo e della severa atrofia parenchimale,

il paziente potrebbe sviluppare una sindrome da sinking flap<sup>5</sup>. Questo effetto rischia di essere molto più marcato nei casi in cui il paziente sia stato sottoposto, oltre che ad una craniectomia, al posizionamento di una valvola ventricolo perineale o ventricolo-atriale controlaterale. In questa situazione infatti gli effetti della simultanea apertura della calotta e della brusca riduzione della pressione intracranica per eliminazione della componente liquorale senza alcuna contro-resistenza a livello del lembo chirurgico possono essere estremamente gravi. A questo va aggiunto che ad ogni rimozione di impianto, sia esso osso autologo o protesi, si avrà un incremento sostanziale del processo cicatriziale in corrispondenza del lembo, con due conseguenze: 1) maggiore difficoltà nello scollare nuovamente i tessuti superficiali dal piano durale ricostruito e pertanto più elevata probabilità di danneggiare lo stesso, esponendo e potenzialmente contudendo il parenchima sottostante, oltrechè incrementando il rischio di fistola liquorale (che a sua volta incrementerebbe il rischio di infezione); 2) ulteriore retrazione della cute del lembo e contemporaneo assottigliamento della stessa, il che porterebbe ad un aumento dei rischi di nuove deiscenze. Infine, elemento da non trascurare, va considerato che i pazienti sottoposti a craniectomia attendono a volte lunghi periodi di tempo per la cranioplastica e l'inizio del loro lungo e complesso percorso riabilitativo<sup>6</sup>. Una rimozione per infezione implica un periodo di attesa congruo prima di poter procedere ad un nuovo tentativo di chiusura della calotta. La letteratura da questo punto di vista dà alcune indicazioni, supportando un periodo di "riposo" del lembo chirurgico non inferiore ai 6 mesi. Nonostante ciò, alcuni autori suggeriscono che 12 mesi sarebbe il tempo di attesa più corretto, in quanto permetterebbe di escludere con relativa certezza l'eventuale ricomparsa di fenomeni flogistici e dunque la risoluzione o meno del focolaio infettivo<sup>7,8</sup>. E' facile comprendere come entrambi i periodi di attesa siano estremamente lunghi e possano essere vissuti, in particolare nei pazienti con disabilità peggiorata proprio a seguito della rimozione della calotta, come una sorta di prolungamento indefinito della propria condizione patologica. Infine, sebbene questa rappresenti la situazione più rara, pazienti la cui ripresa neurologica sia stata particolarmente soddisfacente, anche in caso del permanere in buone condizioni cliniche al momento della nuova rimozione, potrebbero presentare difficoltà nel reintegro nel loro ambiente,

manifestando sentimenti di disagio fisico per la loro evidente deformità, il che può interferire con la capacità di ripresa di una normale vita lavorativa, familiare e di società. Un'ultima considerazione va fatta riguardo a due importanti cambiamenti intervenuti rispetto ai tempi in cui gettare via l'opercolo autologo o la cranioplastica era considerata l'unica alternativa valida. Il primo è rappresentato dall'evoluzione delle terapie antibiotiche. Oggigiorno disponiamo di uno spettro estremamente ampio di sostanze ad elevata efficacia e capaci di penetrare i tegumenti e l'involucro meningeo. Sebbene la flora batterica abbia presentato una consensuale evoluzione, con la comparsa dei germi cosiddetti multiresistenti, la maggior parte delle infezioni restano legate in primo luogo a patogeni gram positivi, come lo *Stafilococco epidermidis*, l'*Aureo* meticillina sensibile e meticillina resistente ed il *Propionibacterium Acnes*, per le quali disponiamo di numerose scelte possibili. Il secondo cambiamento riguarda la natura stessa delle protesi. Laddove in passato, rimosso un opercolo osseo, una cranioplastica in acrilico modellata a mano o una rete in titanio, la scelta rimaneva sugli ultimi due materiali in assenza di una ottimizzazione anatomica degli stessi e quindi con il rischio di un ulteriore fallimento, al giorno d'oggi disponiamo di numerose scelte. Nonostante la resina acrilica possa anch'essa ormai essere modellata in forma tridimensionale e dunque ridurre il rischio di difetti "di cornice" in grado di perforare la cute, sostanze come il PEEK, l'idrossiapatite e il polietilene poroso hanno rappresentato una significativa svolta, ottimizzando non solo i risultati anatomici ma anche quelli clinici. Allo stesso modo il titanio si è anch'esso evoluto verso la modellazione tridimensionale, in particolare con forme compatte a minor rischio di abrasione della cute da "ingrowth". Il vantaggio di molti di questi materiali sta nella possibilità di essere risterilizzati in caso di rimozione, il che, impossibile in passato, elimina virtualmente i costi della realizzazione di un ulteriore impianto<sup>9</sup>. In alternativa, come per l'idrossiapatite, le stesse ditte produttrici sono in grado di fornire due impianti, il principale ed il cosiddetto backup, il che consente di avere sempre pronto un nuovo sostituto del tutto vergine, da usare proprio in caso di infezione.

Esistono altre opzioni? Rimuovere una cranioplastica infetta è davvero sempre necessario? In realtà la risposta sta nella tipologia di presentazione di questa sospetta infezione, fattore che rimane fondamentale per le scelte terapeutiche. Decidere di lasciare in situ una cranioplastica che sia stata confermata infetta alle indagini sierologiche e TC in concomitanza con un deterioramento clinico non è sempre sensato, laddove sintomi locali e minimi potrebbero invece rappresentare un incentivo proprio ai tentativi di conservare l'impianto.

Vi sono stati già in passato alcuni tentativi di mantenere un impianto (sia autologo che artificiale) perlomeno circondato da infezione, nella sede chirurgica. Il più antico metodo di trattamento di un osso in cui fosse sospettata un'infezione consisteva nel passaggio dello stesso in autoclave<sup>10</sup>. Tale procedura, eseguita a temperature di circa 130°, ha una sicura efficacia in termini di sterilizzazione dell'osso ma al contempo ne determina la completa morte cellulare. Il risultato consiste pertanto nella perdita di qualunque capacità di osteointegrazione e, laddove l'infezione permanesse nei tessuti circostanti, il posizionamento in quella sede di un pabulum perfettamente adatto alla proliferazione batterica. Una seconda tecnica, di più recente suggerimento, consiste nell'effettuare una procedura di toilette locale e contemporaneamente di posizionare un sistema di lavaggio continuo con antibiotici, direttamente nel cavo chirurgico<sup>11</sup>. Uno dei principali dubbi a questo riguardo sta nei rischi del lavaggio stesso. In assenza di uno strettissimo monitoraggio clinico ed in caso il drenaggio di uscita dovesse ostruirsi, sussisterebbe infatti il rischio di un aumento improvviso della pressione intracranica (a causa della persistente comunicazione con lo spazio immediatamente sottostante garantita sia dai fori di trapano che dalle linee di taglio della craniotomia) con potenziale di morte per il paziente. A tutti gli effetti però nella maggior parte dei casi i tentativi di salvare un opercolo autologo infetto sono di breve durata, a causa di una elevata tendenza alla ripresa dell'infezione in un breve arco temporale. Per quanto concernente gli impianti artificiali, esistono alcuni resoconti su tentativi di salvataggio sia delle cranioplastiche in idrossiapatite che di protesi in titanio. Nel primo caso le protesi sono state sottoposte a revisione locale, irrigazione con antibiotici, correzione di difetti cutanei e prolungata

terapia antibiotica mirata o al confezionamento di lembi liberi cutanei associato alla toilette, così da permettere alla terapia antibiotica di massimizzare la sua efficacia giungendo attraverso cute di lembo integra e regolarmente vascolarizzata<sup>12-14</sup>. Ovviamente la seconda tipologia di procedura è estremamente rischiosa, in quanto coprire un'area infetta con un lembo libero significa esporre lo stesso a rischio di fallimento, creando un difetto in una zona dell'organismo precedentemente integra. Un'alternativa interessante riguarda l'utilizzo di una tecnica di preservazione parziale dell'idrossiapatite nel caso degli impianti bifrontali, realizzati con due componenti. In questa situazione, in caso di estensione di raccolte infette al di sotto di uno solo dei due sostituti, lo stesso potrà essere rimosso temporaneamente e sostituito al momento opportuno con lo stesso od altro materiale, compatibile. L'idrossiapatite resta però uno dei materiali di più difficile trattamento, data la sua tendenza ad integrarsi, maggiore di quella dell'opercolo criopreservato, con il risultato di poter giungere alla situazione di una protesi infetta, con una raccolta sottostante, difficile da rimuovere in quanto fortemente adesa a tutti i piani circostanti. Questo sembra il principale motivo per cui in tali situazioni gli autori tendono a preferire altri materiali in caso debbano procedere alla sostituzione dell'idrossiapatite.

Infine, per gli impianti in titanio ed in PEEK sono state proposte soluzioni come la rimozione, la toilette del focolaio ed il riposizionamento di una nuova protesi identica, con risultati positivi e per il PEEK casi di risterilizzazione intraoperatoria della stessa protesi e del suo riposizionamento<sup>15,16</sup>.

Ha senso rimuovere una protesi o un opercolo infetto e procedere ad una sostituzione immediata? Questa è una domanda cui risulta estremamente difficile rispondere. Di recente questa soluzione ha cominciato ad essere presa in considerazione, con risultati incoraggianti<sup>17,18</sup>. Il principale problema nel prendere questa decisione consiste nella difficoltà di definire in modo esatto l'estensione dell'infezione stessa. Non è infrequente ad esempio, nel caso degli opercoli autologhi, che una deiscenza cutanea con esposizione parziale della teca venga inizialmente trattata con una revisione locale ed una terapia antibiotica ad ampio spettro. All'ispezione intraoperatoria in questi pazienti è

comune trovare un'opercolo apparentemente indenne da qualunque tipo di anomalia, a volte l'unica alterazione è rappresentata da una minima frastagliatura del profilo esterno. Nonostante ciò, è altrettanto comune la ricomparsa della deiscenza nella stessa sede o in sedi immediatamente limitrofe, associata, al momento della rimozione della calotta, all'evidenza lampante di un massivo coinvolgimento della stessa in termini di erosione sia superficiale che profonda. Il problema del rischio di contaminazione della nuova protesi da parte di un ambiente ancora non adatto a ricevere la stessa è sicuramente correlato alla carica infettante locale ed al grado di isolamento nel quale il germe lavora. Come vedremo nel capitolo successivo, il problema principale del salvataggio delle protesi sta nella capacità del singolo batterio di produrre un biofilm completo e a crescita rapida, in grado di isolare il patogeno dalle difese dell'organismo, rendendolo praticamente immune a tutto. Sfortunatamente non esiste un modo per valutare la carica batterica stessa in situ, soprattutto perché è estremamente frequente la mancata identificazione del germe causante l'infezione, a volte a causa di terapie empiriche che hanno reso l'ambiente così ostile da consigliare al germe di nascondersi, a volte proprio a causa dell'estremo mimetismo garantito proprio dal biofilm. Infine, non tutti i germi sono in grado di produrre biofilm e anche qualora lo siano, la capacità di formarlo ha un fondamento genetico che ne rende alcuni più virulenti ed altri nettamente meno.

Su queste basi, ci si può aspettare una delle caratteristiche principali della chirurgia delle infezioni di cranioplastica, ovvero la variabilità di risposta alla terapia antibiotica. Possiamo supporre che infezioni da germi non multiresistenti, scarsamente o affatto produttori di biofilm, possano essere suscettibili di un trattamento conservativo o di una semplice revisione, possibilmente sostituendo la protesi infetta con una "pulita", con buoni risultati in termini di controllo dell'infezione e di guarigione permanente della stessa. Al contrario, ambienti ostili (ad esempio riceventi plurioperati e colonizzati da germi multiresistenti e ad elevata aggressività, grandi produttori di biofilm) non sarebbero adatti a ricevere un nuovo impianto, presupponendo un fallimento anche in presenza di un supporto antibiotico mirato.

Alcuni autori suggeriscono che un tentativo di ottimizzare la sterilizzazione del focolaio infetto prima di posizionare una nuova protesi in una sede in cui vi sia già una cranioplastica esposta potrebbe passare per l'utilizzo preliminare di una terapia antibiotica mirata sui tamponi di ferita o ad ampio spettro, protratta per un periodo di almeno due settimane. Non esistono purtroppo dati soddisfacenti in letteratura a questo riguardo, solo casi aneddotici<sup>19</sup>. Anche in queste situazioni comunque la tipologia di agente causale avrebbe un peso non indifferente. Un batterio con scarsa capacità di formare colonie e bassa capacità infettante sottoposto ad un efficace trattamento antibiotico potrebbe lasciare il campo o risultare comunque così indebolito da essere non solo debellato più facilmente al momento della revisione chirurgica, ma anche ridotto all'estremo nelle sue capacità di mantenersi quiescente nel sito e di risvegliarsi a distanza di tempo. Allo stesso modo, batteri con elevata capacità di formazione di biofilm, risulterebbero scarsamente sensibili, il che faciliterebbe la rapida ripresa dell'infezione, vanificando anche il posizionamento di una nuova protesi.

L'esperienza con l'uso della sonicazione dei dispositivi protesici, ormai molto comune in ortopedia, ha trovato scarsa applicazione nel campo neurochirurgico. Non vi sono vere e proprie serie di letteratura che ne descrivano l'applicazione in caso di infezioni di cranioplastica o di osso autologo. Inoltre, appare molto difficile valutare l'efficacia in un comparto come quello intracranico, dato lo scarso spessore dei tessuti che coprono la protesi ed i possibili effetti di questo trattamento sull'attività elettrica cerebrale.

Va infine considerata l'incertezza sulla durata della terapia antibiotica seguente ad una infezione di cranioplastica, quale che sia stato il metodo di trattamento selezionato. Nella letteratura neurochirurgica, il trattamento endovenoso d'obbligo corrisponde a 3 settimane, ma questo dovrebbe essere regolarmente seguito da una terapia per via orale (o, ove impossibile a causa delle resistenze antibiotiche, per via intramuscolare), della durata fra 4 e 8 settimane, per un totale di 3 mesi. In apparenza non esistono indicazioni per una interruzione anche breve del trattamento antibiotico, poiché il rischio di ripresa dell'infezione e soprattutto la possibilità che un germe divenuto residente

e produttore di biofilm possa replicarsi aggravando il danno cerebrale preesistente è troppo elevato. Nonostante ciò è sempre necessario considerare che una terapia antibiotica protratta per mesi può avere severi effetti collaterali nell'organismo, in primo luogo fisici, con debilitazione generale, riduzione dell'attività emopoietica del midollo osseo, depauperamento vitaminico, linfopenia reattiva, fino al rischio di anemia aplastica, motivi per i quali questi pazienti vanno seguiti con indagini ematologiche di routine su base regolare, onde evitare il rischio per la vita. A questo va aggiunto l'effetto psicologico, di un paziente che non riesca a riprendersi a sufficienza fra un stato di debilitazione generale e l'altro, costretto a oscillare fra una terapia che potrebbe non essere efficace nel farlo tornare rapidamente al lavoro e gli ovvi effetti collaterali della stessa.

Sono dunque molti gli interrogativi aperti, oggiogiorno più che in passato e paradossalmente l'incremento delle opzioni terapeutiche ha reso le scelte più difficili ed incerte. Quel che sappiamo è che la ricerca del risultato in questi pazienti può passare solo attraverso una precisa definizione delle caratteristiche dell'infezione, a partire dal suo agente causale per continuare con gli epifenomeni dell'infezione stessa, che forniranno informazioni strategiche per puntare al risultato.

## **Bibliografia**

- 1) Conen A, Raabe A, Schaller K, Fux CA, Vajkoczy P, Trampuz A. Management of neurosurgical implant-associated infections. *Swiss Med Wkly*. 2020 Apr 24;150:w20208. doi: 10.4414/smw.2020.20208. eCollection 2020 Apr 20
- 2) Baumeister S, Peek A, Friedman A, Levin LS, Marcus JR. Management of postneurosurgical bone flap loss caused by infection. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Dec;122(6):195e-208e. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181858eee

- 3) Ehni G. Primary cranioplasty after removal of infected bone flaps. *Neurosurgery*. 1979 Dec;5(6):771. doi: 10.1097/00006123-197912000-00020
- 4) Kwiecien GJ, Aliotta R, Bassiri Gharb B, Gastman B, Zins JE. The Timing of Alloplastic Cranioplasty in the Setting of Previous Osteomyelitis. *Plast Reconstr Surg*. 2019 Mar;143(3):853-861. doi: 10.1097/PRS.0000000000005363
- 5) Di Rienzo A, Colasanti R, Gladi M, Pompucci A, Della Costanza M, Paracino R, Esposito D, Iacoangeli M. Sinking flap syndrome revisited: the who, when and why. *Neurosurg Rev*. 2020 Feb;43(1):323-335. doi: 10.1007/s10143-019-01148-7. Epub 2019 Aug 1
- 6) Han Y, Chen Y, Han Y, Chen Z, Li L, Pu W, Cui L, Chai M, Li Y. The use of free myocutaneous flap and implant reinsertion for staged cranial reconstruction in patients with titanium mesh exposure and large skull defects with soft tissue infection after cranioplasty: Report of 19 cases. *Microsurgery*. 2021 Oct;41(7):637-644. doi: 10.1002/micr.30800. Epub 2021 Sep 2
- 7) Thavarajah D, De Lacy P, Hussien A, Sugar A. The minimum time for cranioplasty insertion from craniectomy is six months to reduce risk of infection--a case series of 82 patients. *Br J Neurosurg*. 2012 Feb;26(1):78-80. doi: 10.3109/02688697.2011.603850. Epub 2011 Oct 5
- 8) Lopez J, Zhong SS, Sankey EW, Swanson EW, Susarla H, Jusue-Torres I, Huang J, Brem H, Auwaerter PG, Gordon CR. Time Interval Reduction for Delayed Implant-Based Cranioplasty Reconstruction in the Setting of Previous Bone Flap Osteomyelitis. *Plast Reconstr Surg*. 2016 Feb;137(2):394e-404e. doi: 10.1097/01.prs.0000475770.14396.1e
- 9) Moneim J, Wenlock RD, Wells AJ, Price RD, Timofeev I, Helmy A, Hutchinson PJ. Single procedure revision cranioplasty with intra-operative autoclave following titanium plate exposure. *Br J Neurosurg*. 2020 Jun;34(3):329-332. doi: 10.1080/02688697.2019.1690129. Epub 2019 Nov 18
- 10) Bruce JN, Bruce SS. Preservation of bone flaps in patients with postcraniotomy infections. *J Neurosurg*. 2003 Jun;98(6):1203-7. doi: 10.3171/jns.2003.98.6.1203

- 11) Auguste KI, McDermott MW. Salvage of infected craniotomy bone flaps with the wash-in, wash-out indwelling antibiotic irrigation system. Technical note and case series of 12 patients. *J Neurosurg*. 2006 Oct;105(4):640-4. doi: 10.3171/jns.2006.105.4.640
- 12) Iaccarino C, Mattogno PP, Zanotti B, Bellocchi S, Verlicchi A, Viaroli E, Pastorello G, Sgulò F, Ghadirpour R, Servadei F. Septic complication following porous hydroxyapatite cranioplasty: prosthesis retention management. *J Neurosurg Sci*. 2018 Dec;62(6):765-772. doi: 10.23736/S0390-5616.16.03721-8. Epub 2016 May 13
- 13) Di Rienzo A, Colasanti R, Dobran M, Formica F, Della Costanza M, Carrassi E, Aiudi D, Iacoangeli M. Management of infected hydroxyapatite cranioplasty: Is salvage feasible? *Brain Spine*. 2022 Jun 21;2:100907. doi: 10.1016/j.bas.2022.100907. eCollection 2022
- 14) Zanotti B, Zingaretti N, Verlicchi A, Alfieri A, Parodi PC. Successful Strategies for Dealing With Infected, Custom-Made Hydroxyapatite Cranioplasty. *J Craniofac Surg*. 2018 Jul;29(5):1127-1131. doi: 10.1097/SCS.0000000000004415
- 15) Chen B, Li W, Chen D, Fu S, Gao Y, Li R, Meng F, Wang H, Zhang S. Partial titanium mesh explantation cured post-cranioplasty implant-associated scalp infection. *J Clin Neurosci*. 2017 Oct;44:196-202. doi: 10.1016/j.jocn.2017.06.060. Epub 2017 Jul 6
- 16) Hu Y, Li X, Zhao R, Zhang K. Conservative Treatment for Delayed Infection After Cranioplasty With Titanium Alloy. *J Craniofac Surg*. 2018 Jul;29(5):1258-1260. doi: 10.1097/SCS.0000000000004436
- 17) Han Y, Chen Y, Han Y, Chen Z, Li L, Pu W, Cui L, Chai M, Li Y. The use of free myocutaneous flap and implant reinsertion for staged cranial reconstruction in patients with titanium mesh exposure and large skull defects with soft tissue infection after cranioplasty: Report of 19 cases. *Microsurgery*. 2021 Oct;41(7):637-644. doi: 10.1002/micr.30800. Epub 2021 Sep 2.

18) Yoshioka N. Immediate Cranioplasty for Postcranioplasty Infection in Patients with Ventriculoperitoneal Shunt. *World Neurosurg.* 2018 Nov;119:311-314. doi: 10.1016/j.wneu.2018.08.076. Epub 2018 Aug 23

19) Di Rienzo A, Colasanti R, Gladi M, Dobran M, Della Costanza M, Capece M, Veccia S, Iacoangeli M. Timing of cranial reconstruction after cranioplasty infections: are we ready for a re-thinking? A comparative analysis of delayed versus immediate cranioplasty after debridement in a series of 48 patients. *Neurosurg Rev.* 2021 Jun;44(3):1523-1532. doi: 10.1007/s10143-020-01341-z. Epub 2020 Jun 26

## Capitolo V: La flora batterica negli impianti neurochirurgici

Le prime descrizioni dettagliate sulla distribuzione dei batteri in casi di cranioplastiche infette risalgono alla fine degli anni 2000. Uno dei principali aspetti approfonditi in relazione alla tipologia degli agenti potenzialmente infettanti gli opercoli rimossi risale alla questione se sia possibile identificare, al momento del reimpianto, germi di superficie e l'impatto della presenza degli stessi sul possibile rischio di re-infezione al reimpianto. Nel 2008 Cheng riportava i risultati di una serie di 75 cranioplastiche (52 autologhe, 23 in polimetilmetacrilato), effettuate fra il 2002 ed il 2006<sup>1</sup>. In questo campione venivano osservate 7 infezioni nel primo gruppo e 2 nel secondo. Strisci superficiali effettuati al momento della rimozione dell'opercolo mostravano elusivamente la presenza di *Propionibacterium Acnes*, laddove, al momento dell'infezione, venivano isolati: 1) *Stafilococco aureo oxacillino-resistente* in 4 casi; 2) *Pseudomonas Aeruginosa* (1 caso); 3) *Enterobacter Cloacae* (1 caso); 4) *Stafilococco coagulasi negativo* (1 caso). Nonostante i numeri estremamente ridotti, l'autore sosteneva che colture positive non potessero essere considerate indicazione per infezione dell'impianto, così come coltura negative non potessero escludere l'assenza della medesima.

Il lavoro più interessante dal punto di vista del rigore scientifico riguardante questo argomento risale però al 2013. Il gruppo di Bhaskar rimuoveva gli opercoli dal congelatore dedicato per poi lasciare che si asciugassero in aria a temperatura ambiente nella sala operatoria, durante le operazioni di routine di preparazione della stessa per l'intervento di riposizionamento e la vestizione dei chirurghi<sup>2</sup>. Una volta asciutti, venivano effettuati due strisci di superficie e rimosse alcune piccole chips di osso dall'opercolo all'interno dei flussi laminari, in condizioni di sterilità ed asepsi. Venivano prese particolari precauzioni inserendo nuovi teli sterili, divise ed equipaggiamento, rimuovendo tutti i ferri presenti, non solo quelli utilizzati per asportare le chips ossee. Il tampone sterile numero 1 veniva dapprima immerso in soluzione saline ed applicato su un'area pre-selezionata del lembo osso, venendo passato più volte di seguito nello stesso punto, ma senza esercitare alcuna pressione. Nel caso dello striscio numero 2 al contrario veniva esercitata una pressione notevole, allo scopo di

campionare una superficie più profonda del lembo. Le chips rimosse misuravano fra i 2 ed i 5 mm e venivano prelevate mediante delle pinze ossivore per lo sfenoide. Gli strisci venivano inoculati in piastre di agar cioccolato al 5% e agar sangue (equino), per poi essere incubati a 37°C per 18 ore. Inoltre, l'agar sangue veniva incubato in condizioni anaerobiche, l'agar cioccolato in aria ambiente. In caso di assenza di crescita iniziale le piastre venivano incubate per ulteriori 48 ore. Le piastre di agar venivano esaminate con metodi semiquantitativi ed eventuali isolamenti batterici venivano depositati in brodo di infusione glicerolo/cervello-cuore ad 80°C. Allo stesso modo venivano incubate le chips ossee, che venivano osservate per un massimo di 5 giorni. In totale l'autore esaminava 25 lembi ossei. Il 63% di questi era stato rimosso per trauma ed ischemia (17 casi), il 37% (8 casi) per rigonfiamento post-operatorio. Nessun paziente era affetto da sepsi accertata al momento della rimozione e nessuno aveva avuto una precedente infezione da contaminanti di superficie come *Stafilococco* o *Propionibacterium Acnes*.

In totale, prelevando 3 campioni da ogni lembo si ottenevano 75 campioni per 25 opercoli. In 6 di questi campioni veniva trovato un *Propionibacterium* (8%). Questi tessuti positivi venivano isolati da 5 pazienti nello striscio superficiale e nella corrispettiva chip ossea. Nessuno degli strisci di tipo 2 evidenziava crescita batterica dopo 3 giorni di incubazione. Il 20% dei campioni ossei erano positivi (5 su 25) ma solo il 2% degli strisci su 50. Inoltre non veniva osservata crescita di alcun altro tipo di germe o lieviti fungini compatibili con patogeni ospedalieri, incluso *Stafilococco*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*. Quattro campioni su 24 (16.7%) contenenti *Propionibacterium* provenivano da pazienti sottoposti a 2 o più interventi, mentre solo due di 51 (il 3.9%) erano stati rimossi da pazienti che avevano subito una sola procedura chirurgica. Nell'esaminare la durata del periodo di deposito in congelatore, l'autore notava una significatività statistica proprio nella durata dei tempi di conservazione. Discutendo queste conclusioni, Bhaskar finiva per sostenere che il *Propionibacterium Acnes* sembra essere un organismo particolarmente resistente, tale da poter essere isolato anche in condizioni di laboratorio anaerobiche e nonostante un prolungato periodo di conservazione dell'osso

in congelatore (a testimonianza di ciò citava inoltre un precedente lavoro che descriveva l'isolamento dello stesso germe in 6 casi di craniotomia e che aveva richiesto la rimozione dell'osso stesso). Il *Propionibacterium* può essere recuperato in altissime concentrazioni in aree dello scalpo ad elevata densità di follicoli piliferi ed è sicuramente comune il suo isolamento nei campi neurochirurgici anche dopo una accurata pulizia superficiale della cute del paziente seguita dalla disinfezione vera e propria. Pertanto questo tipo di infezioni non sono inusuali in neurochirurgia, sebbene questo microrganismo sia lento a crescere e possa richiedere fino a 9 giorni per mostrarsi, essendo inoltre in grado di occultarsi al di sotto di altri germi cutanei standard. L'autore concludeva sostenendo l'importanza del brodo di arricchimento per isolare organismi che possano essere stati danneggiati in modo insufficiente dalla criopreservazione e che le biopsie ossee sono essenziali per decidere eventuali strategie di protezione dell'opercolo riposizionato. Nonostante ciò, non veniva mai pubblicato alcuno studio di follow-up su questi pazienti, rendendo realmente decidere se vi fosse una effettiva correlazione fra quanto osservato ed il reale impatto del *Propionibacterium* nelle infezioni di opercolo.

Nel 2014 veniva pubblicata (Cheng e coll.) una interessante serie che paragonava la frequenza e la tipologia degli agenti causali delle infezioni di cranioplastica negli opercoli preservati in sede sottocutanea ed in criopreservazione<sup>3</sup>. Venivano reclutati 110 pazienti per il primo gruppo e 180 per il secondo, con 20 casi di infezione per ognuno dei due gruppi e un'incidenza percentuale rispettiva del 18.2% e dell'11.1%.

	Thigh infection (n = 8)	Cranioplasty infection (n = 12)		N (%) or mean ± SD
Sex (M:F)	8:0	11:1	Sex (M:F)	12:8
Age (yr)	48.00 ± 21.93	46.67 ± 15.35	Age (yr)	47.55 ± 20.25
Etiology			Etiology	
Traumatic brain injury	6 (75%)	9 (75.0%)	Traumatic brain injury	14 (70%)
Malignant infarction	2 (25%)	2 (16.7%)	Malignant infarction	4 (20%)
Subarachnoid hemorrhage	0 (0%)	1 (8.3%)	Spontaneous intracerebral hemorrhage	1 (5%)
Infection type			Subarachnoid hemorrhage	1 (5%)
Local abscess	3 (37.5%)	0 (0%)	Infection type	
Ruptured wound	5 (62.5%)	2 (16.7%)	EDA	15 (75%)
EDA	0 (0%)	10 (83.3%)	Ruptured wound	5 (25%)
Pathogen			Pathogen	
Negative culture	5 (62.5%)	0 (0%)	<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (10%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (25.0%)	5 (41.7%)	MRSA	8 (40%)
MRSA	0 (0%)	7 (58.3%)	<i>Serratia marcescens</i>	2 (10%)
<i>Escherichia coli</i>	1 (12.5%)	0 (0%)	<i>Escherichia coli</i>	1 (5%)
Mean (SD) interval (days)			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (5%)
DC to SSI	23.75 ± 14.93		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (5%)
DC to CPL		35.58 ± 19.74	<i>Propionibacterium acnes</i>	1 (5%)
CPL to SSI		59.83 ± 76.81	Not available	4 (20%)
			Interval (days)	
			DC to CPL	59.05 ± 54.35
			CPL to SSI	38.40 ± 34.08

CPL, cranioplasty; DC, decompressed craniectomy; EDA, epidural abscess; SSI, surgical site infection; SP, subcutaneous pocket; SD, standard deviation; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*.

CPL, cranioplasty; DC, decompressed craniectomy; EDA, epidural abscess; SSI, surgical site infection; CP, cryopreservation; SD, standard deviation; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*.

Come si può facilmente evincere ad una prima valutazione, nelle infezioni da tasca sottocutanea lo *Stafilococco meticillino sensibile* (41.7%) ed il *meticillino resistente* (58.3%) rappresentavano la totalità dei casi, rispettivamente con 5 e 7 pazienti affetti. La flora cambiava completamente nel caso degli opercoli criopreservati, ove si osservava la presenza di 2 casi (10%) da *Stafilococco meticillino sensibile*, 8 (40%) da *meticillino resistente*, 2 (10%) da *Serratia Marcescens*, ed 1 rispettivamente da *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa* e *Propionibacterium Acnes* (5% per ognuno), con una sostanziale equivalenza fra Gram negativi e positivi.

Ancora Bhaskar riportava l'anno seguente una seconda serie riguardante la tipologia di ceppi batterici in grado di infettare gli opercoli criopreservati<sup>4</sup>. In questo caso il principale fattore su cui si soffermava lo studio era il tipo di preservazione, uno degli elementi potenzialmente favorevoli all'infezione, insieme con la durata di permanenza in congelatore, la tipologia di sterilizzazione e le pratiche di controllo dell'infezione. Nonostante ciò, una delle maggiori lacune riguardo questi casi sta nella descrizione accurata del quadro clinico in relazione alla tipologia di germe. L'autore esaminava un totale di 179 pazienti sottoposti a craniectomia decompressiva e successivo riposizionamento del lembo rimosso, osservando la comparsa di infezione in 18 (10% del totale). In nessun caso il lembo era stato riposizionato dopo più di 6 mesi dall'iniziale invio in criopreservazione. I sintomi più comuni erano febbre (ma solo nel 58%) e segni locali di infiammazione (58.8%). La

febbre era però presente nel 71% delle infezioni da *Stafilococco* ed *Enterobacter*, assente nei casi di *Propionibacterium Acnes*. In 9 casi erano presenti secrezioni e/o deiscenza, in uno una vite cadeva fuori dal campo operatorio dopo una semplice detersione superficiale dello stesso. Sintomi rari erano rappresentati da dolore e cefalea, convulsioni e deficit neurologici focali.

<b>Organism</b>	<b>Number (%)</b>	<b>Days to Diagnosis/Bone Flap Removal</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (5.9)	9
<i>Enterobacter</i>	3 (17.6)	13
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3 (17.6)	19.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 (41.2)	48.3
<i>Propionibacterium acnes</i>	3 (17.6)	307.6

Osservando la tabella sovrastante ci si può facilmente rendere conto di come gli Stafilococchi Aureo ed Epidermidis rappresentassero quasi il 50% delle infezioni in questione, dato apparentemente in controtendenza con quanto precedentemente descritto.

Indipendentemente dall'uso pre- e perioperatorio degli antibiotici, tutte le colture eseguite sull'opercolo in questa serie risultavano positive e rappresentavano il punto di partenza per il trattamento antimicrobico successivo. L'autore concludeva che il profilo microbiologico delle infezioni associate all'opercolo riflette la flora dello scalpo, dove le infezioni da germi piogeni giungono per via della flora stessa, laddove al contrario le infezioni del parenchima sono collegate alla disseminazione per via ematogena o per contiguità, in relazione al quadro demografico della popolazione in studio. Sebbene le infezioni per via ematogena possano essere causate da qualunque organismo, la disseminazione per contiguità (otogenica o dai seni paranasali) è molto simile proprio alle infezioni di lembo ed in questa serie il 76.5% dei pazienti aveva infezioni attribuibili alla flora cutanea di Gram-positivi. Negli altri casi il coinvolgimento dell'opercolo era pressochè esclusivamente dovuto a microrganismi Gram-positivi e Gram-negativi di origine enterica, in grado di causare infezioni nosocomiali in pazienti in ventilazione meccanica. Da questo punto di vista, le Enterobacteriacee sono note per causare batteriemie ed infezioni conseguenti alla colonizzazione

delle vie aeree e dell'intestino in pazienti sottoposti proprio a ventilazione meccanica o portatori di tracheostomia, condizione estremamente frequente nei craniectomizzati. In questa serie, tutti e 4 i pazienti affetti da questo tipo di germe erano stati sottoposti a ventilazione prolungata e 3 erano portatori di tracheostoma al momento del riposizionamento dell'opercolo, mentre solo due degli altri 13 erano in tale situazione. Per questo motivo, concludeva l'autore, al presentarsi di un'infezione di lembo, dovrebbe essere sempre inserita una copertura antibiotica per i commensali della cute e, qualora il paziente fosse stato tracheostomizzato, aggiunta una terapia protettiva per germi Gram-negativi di provenienza enterica, in attesa del risultato delle emo- ed uricolture. Eccettuato per questi lavori, esistono poche serie che abbiano preso in considerazione la pur vasta microbiologia delle infezioni di cranioplastica.

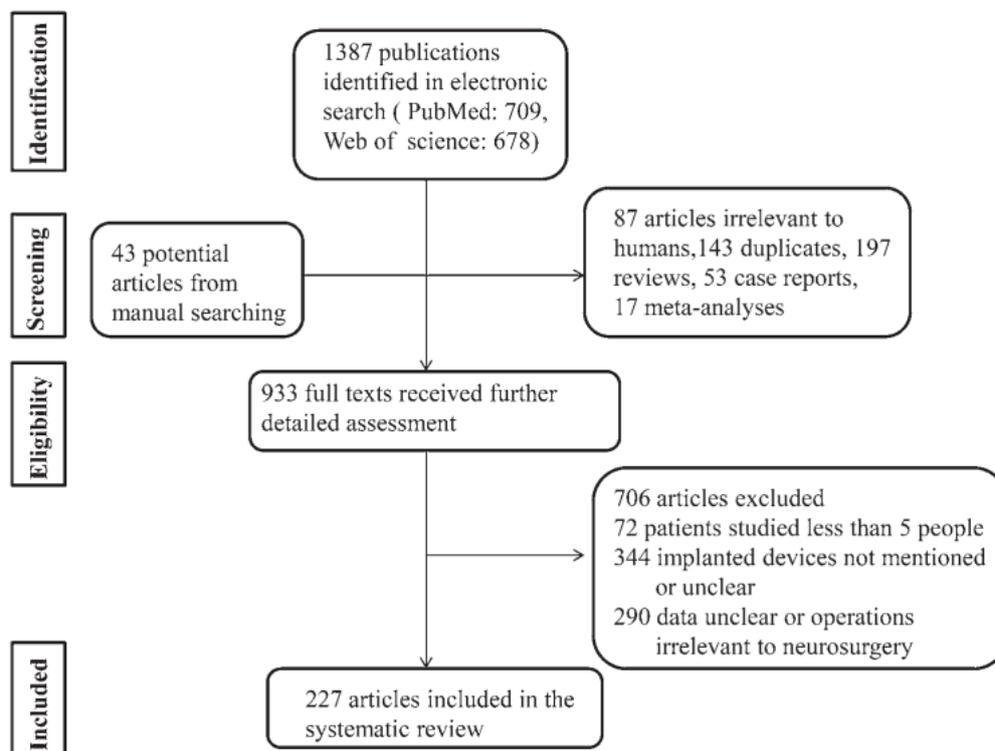
Nel 2016 il gruppo di Morton presentava la revisione delle complicanze infettive di una delle più grandi serie neurochirurgiche riportate, su un totale di 754 pazienti sottoposti a cranioplastica, con osso autologo e plastiche operati fra il marzo 2004 ed il novembre 2014<sup>5</sup>. Durante l'intero periodo di studio il protocollo standard era di ottenere strisci superficiali dall'osso autologo al momento della craniectomia, prima del suo posizionamento in congelatore, allo scopo di ottenere informazioni su una eventuale contaminazione. Venivano inoltre impiegati due protocolli per l'uso e l'interpretazione degli strisci: A) dal marzo 2004 al giugno 2013 qualunque osso con coltura positiva veniva gettato e una protesi inserita al suo posto; B) dal luglio 2013 al novembre 2014, qualunque opercolo che risultasse positivo per flora cutanea veniva regolarmente riposizionato, dopo irrigazione con bacitracina e 3 minuti di immersione in betadine. Seicentoquaranta pazienti venivano trattati con il protocollo A, 114 con il B. Centoquattordici opercoli non erano salvabili al momento della rimozione per via di ferite destruenti da arma da fuoco, fratture depresse estese, infezione prima della craniectomia, craniectomia in altra sede. Centoventisei colture da osso erano positive, di queste 89 nel protocollo A (per cui l'opercolo veniva gettato) e trentasette nel protocollo B. Di questi ultimi opercoli 22 casi risultavano positivi per *Propionibacterium Acnes*, 9 per *Stafilococco coagulasi-*

*negativo*, 2 casi per entrambi, *Micrococco* (1 caso), *Difteroide spp.* (1 caso), *Candida parapsilosis* (1 caso), e *Bacillus spp.* (1 casp). Nel gruppo in protocollo B si osservavano 3 infezioni, ma in tutti i casi il germe era diverso da quello osservato allo striscio al momento della rimozione dell'osso, il che suggerisce un elevato rischio di contaminazione al momento del prelievo. L'autore concludeva che non vi era una differenza significativa in termini infettivi, per cui riteneva che gli opercoli dovessero essere comunque riposizionati. In considerazione dei risultati ottenuti gli autori traevano un'importante conclusione. Durante il primo periodo (protocollo A), l'impianto di una plastica sintetica portava ad un aumento dei costi di circa 80000 dollari annui, pur rimanendo il 6% il tasso di infezione nelle protesi riposizionate. Sommando a questo la già citata assenza di conferma delle infezioni superficiale nel protocollo B, decidevano di non effettuare più lo striscio superficiale dell'opercolo rimosso.

Ulteriori informazioni possono essere parzialmente recuperate dal lavoro di Cheng (2019)<sup>6</sup>. L'autore effettuava una revisione sistematica dell'intera letteratura, fra il 1968 ed il 2018. Le infezioni di impianti neurochirurgici venivano divise in 5 sottogruppi, includendo operazioni e patologie, tipo di materiale impiantato, tipo di germe, distribuzione per paese ed intervalli temporali. Il tasso globale di infezione dopo cranioplastica era del 5.5% (50 casi), con un tempo medio di presentazione a distanza dall'intervento di 31 giorni (fra 8 e 2035). Le infezioni da Gram positivi erano le più comuni (58%), quelle da Gram negativi il 18%, quelle polimicrobiche il 16%. In concordanza con questa distribuzione e con le fonti di letteratura note, lo Stafilocco era presente nel 62% dei casi.

Organism	No.
Isolated single Gram-positive infection (n = 29)	
MRSA	12
MSSA	11
<i>Propionibacterium</i>	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
Group A strep	1
Isolated single Gram-negative infection (n = 9)	
<i>Morganella morganii</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	2
<i>Enterobacter</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	3
<i>Pseudomonas</i>	1
Polymicrobial infection (n = 8)	
MSSA, <i>Fusobacterium nucleatus</i>	1
CoNS, <i>Streptococcus milleri</i> , <i>Candida albicans</i>	1
MRSA, MSSA, <i>Propionibacterium</i>	1
MRSA, <i>Proteus mirabilis</i>	1
CoNS, MSSA	1
MSSA, <i>Candida</i>	1
<i>Propionibacterium</i> , <i>Fingoldia magna</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i>	1
<i>Propionibacterium</i> , MSSA	1
No culture growth	2
Cranioplasty removal at outside hospital	2

CoNS = coagulase-negative *Staphylococcus aureus*; MRSA = methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA = methicillin-sensitive *S. aureus*.



Venivano evidenziati un totale di 43 articoli mediante la ricerca manuale, bibliografica e dei revisori. Dopo aver escluso gli studi duplicati e gli articoli non direttamente correlati, rimanevano un totale di 933 lavori. Infine venivano analizzati 227 articoli, per un totale di 22.971 pazienti, con 1118 casi di infezione riportati ed un tasso di infezione del 4.87%. Lo studio includeva 9 tipi di patologie ed interventi neurochirurgici, con alcuni interventi poi non contati se il numero di pazienti era al di sotto dei 100. Pertanto erano inclusi 17.632 pazienti. Le procedure più comuni includevano: craniotomia (6.58%), cranioplastica (5.89%) e disordini del movimento (5.43%). I tassi di infezione più bassi corrispondevano a duroplastica, idrocefalo e craniostenosi, rispettivamente del 3.17%, 2.59% e 0.77%. Veniva effettuata un'analisi dei 13 materiali impiantati, compreso titanio, polipropilene-poliestere, polimetilmetacrilato, PEEK, polietilene poroso, idrossiapatite, osso autologo, dura madre, elettrodi, pompe da infusioni, impianti biodegradabili e riassorbibili. Venivano selezionati 12.351 pazienti, 608 casi di infezione, per un tasso del 4.92%. Dei 13 materiali impiantati, i tassi di infezione erano minori per il polietilene (0.98%), i mezzi biodegradabili e riassorbibili (0.90%) e la dura madre

(0.58%). I tassi più alti includevano polipropilene/poliestere (8.11%), titanio (8.15%) e PEEK (7.31%).

Material	Total	No. of Infections	IR (%)
Implanted pump	1466	138	9.41
Titanium implants	810	66	8.15
Polypropylene-polyester	296	24	8.11
PEEK	520	38	7.31
Deep brain stimulation electrodes	1755	115	6.55
Autologous bone	973	64	6.58
Gliadel wafers	454	26	5.73
PMMA	1223	70	5.72
Pulse generator	273	11	4.03
HA	694	21	3.03
Medpor porous polyethylene	818	8	0.98
Biodegradable or resorbable devices	2897	26	0.90
Dura mater	172	1	0.58
Total	12,351	608	4.92

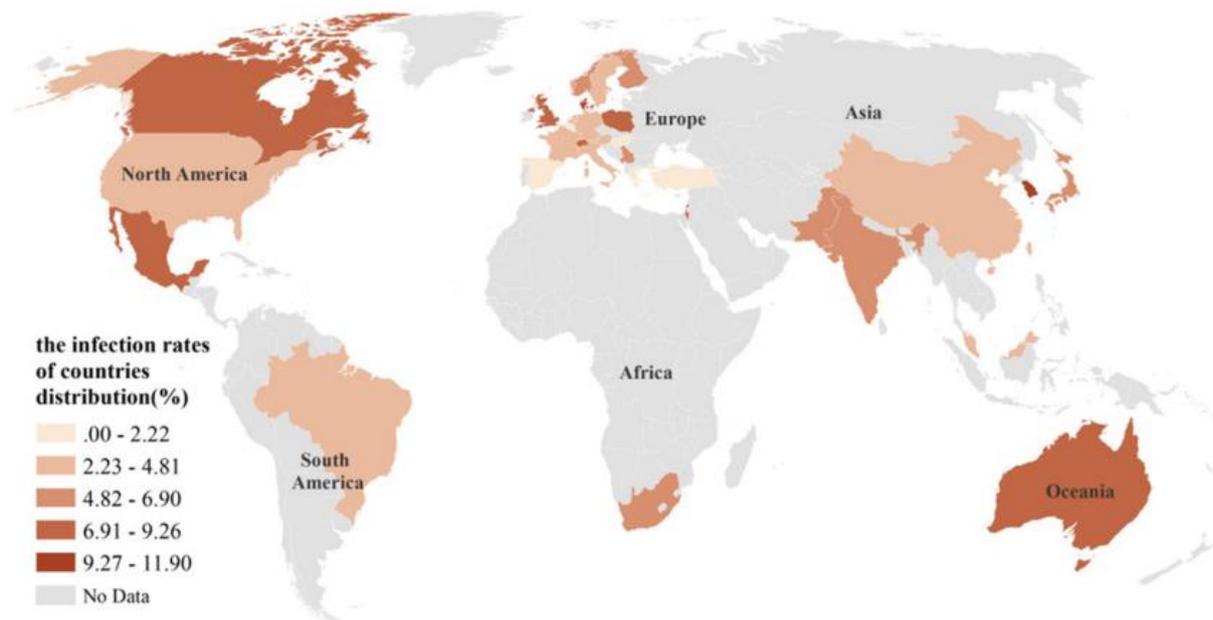
Venivano inoltre identificate 14 specie batteriche, inclusi gli anaerobi. Trentaquattro studi coprivano 370 infezioni batteriche. Gli studi citati avevano però un'elevata eterogeneità statistica. L'organismo predominante era lo *Stafilococco Aureo* (53.51%), in accordo con altri resoconti, seguito dallo *Stafilococco coagulasi negativo* (20%) e dal *Propionibacterium Acnes* (5.41%).

Su 227 studi, solo 3 articoli riportavano i casi in relazione alla distribuzione geografica, motivo per cui 857 pazienti non venivano inclusi. Venivano calcolati 22.114 pazienti da un totale di 32 paesi e 224 studi, 1050 casi di infezione e un tasso totale di infezione del 4.75%. I tassi di infezione in Danimarca, Corea del Sud e Messico, erano i più elevati. In Cina, venivano selezionati 540 pazienti da 16 articoli, 26 infezioni e tasso globale del 4.81%, leggermente al di sopra di quello medio rilevato. In aggiunta, venivano presi in considerazione 10869 casi da 82 articoli statunitensi, con 446 infezioni e tasso globale del 4.10%, modicamente inferiore alla media.

Bacteria	Total	%
<i>Staphylococcus</i> spp.	282	76.22
<i>S. aureus</i>	198	53.51
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>	74	20.00
Unidentified	10	2.70
<i>Streptococcus</i> spp.	7	1.89
$\alpha$ -hemolytic streptococci	1	0.27
$\beta$ -hemolytic streptococci	4	1.08
Nonhemolytic group D streptococci	1	0.27
Unidentified	1	0.27
<i>Propionibacterium</i> spp.	27	7.30
<i>P. acnes</i>	20	5.41
Unidentified	7	1.89
<i>Klebsiella</i> spp.	7	1.89
<i>K. pneumoniae</i>	3	0.81
<i>K. oxytoca</i>	3	0.81
Unidentified	1	0.27
<i>Escherichia coli</i>	8	2.16
<i>Enterobacter</i> spp.	14	3.78
<i>E. aerogenes</i>	1	0.27
<i>E. cloacae</i>	4	1.08
<i>E. aeruginosa</i>	6	1.62
Unidentified	3	0.81
<i>Serratia marcescens</i>	3	0.81
<i>Proteus mirabilis</i>	3	0.81
<i>Providentia stuartii</i>	1	0.27
<i>Morganella morganii</i>	1	0.27
<i>Pseudomonas</i> spp.	7	1.89
<i>P. aeruginosa</i>	5	1.35
Unidentified	2	0.54
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0.27
<i>Anaerobic</i> spp.	3	0.81
<i>Candida</i> spp.	6	1.62
<i>C. albicans</i>	1	0.27
<i>C. famata</i>	1	0.27
<i>C. parapsilosis</i>	1	0.27
Unidentified	3	0.81
Total	370	100

Questo potrebbe essere correlato al fatto che gli Stati Uniti sono un paese dotato di un sistema sanitario estremamente moderno e tecnologia neurochirurgica più matura rispetto al resto del mondo. L'autore postulava inoltre che la Cina potesse avere tassi non decifrabili a causa di una minore diffusione e disponibilità delle terapie antibiotiche su tutto il territorio e una maggiore resistenza antibiotica. Gli studi che riportavano questi dati erano infatti stati effettuati soprattutto a Taiwan, Guandong e Pechino, perciò si riferivano ad una distribuzione territoriale molto limitata ed il tasso di infezione potrebbe in effetti essere molto più elevato. Gli slot temporali venivano divisi in 5 periodi

equivalenti, 1968-1977, 1978-1987, 1988-1997, 1998-2007, 2008-2018. I tassi di infezione subivano un incremento progressivo annuale dal 2008 al 2018. Nelle decadi precedenti, eccettuato per una serie di tassi più bassi dal 1998 al 2007, gli impianti presentavano un progressivo incremento della tendenza all'infezione.



L'infezione restava, come confermato dall'autore di questa revisione sulla base delle fonti incluse, una delle cause predominanti di fallimento degli impianti, in particolare delle plastiche craniche. Venivano elencati numerosi fattori causali in grado di alterare il rischio infettivo di un paziente, come un'infezione pre-esistente, il periodo di latenza fra la rimozione di una protesi, l'inserimento del suo rimpiazzo e il tempo chirurgico. Gli impianti includevano inoltre vari mezzi per il fissaggio della craniotomia, le cranioplastiche sintetiche ma anche materiali polimerici, metallo, ceramica, protesi liquorali, neurostimolatori. Nel paragonare i differenti tipi di impianto veniva considerato essenziale riconoscere differenze come quelle fra le proprietà dei singoli materiali, la biocompatibilità, la bioattività, partendo dal presupposto che l'osso autologo non è soggetto al rigetto su base immune ed è efficace come substrato per la colonizzazione ossea e la rivascolarizzazione. Secondo i criteri di inclusione, tutte le colture microbiologiche dovevano essere effettuate utilizzando procedure di

laboratorio standard. Data la frequenza elevata delle infezioni da *Stafilococco Aureo* e la loro gravità, l'autore supportava, come già dimostrato in precedenza, l'idea che il tipo di trattamento selezionato andrebbe in primo luogo indirizzato verso questi microrganismi. Inoltre, la tecnica chirurgica sembrerebbe giocare ovviamente un ruolo nel prevenire le infezioni post-operatorie, così come la tempistica (intervallo demolizione-ricostruzione durata intervento ricostruzione).

E' interessante notare come nelle serie pediatriche riguardanti le complicanze infettive sia di opercolo che di cranioplastiche artificiali non venga praticamente mai elencata la flora batterica. A ciò va aggiunto che negli ultimi anni l'iniziale interesse per i germi causanti infezioni in queste condizioni sembra essere del tutto scemato. Nonostante ovviamente l'infezione continui ad essere citata come una delle più frequenti complicanze degli impianti cranici, la tendenza generale è quella di concentrarsi maggiormente sulla gestione delle stesse. E' possibile ritenere che nella realtà clinica di tutti i giorni "scovare" il batterio causa di una infezione di cranioplastica sia estremamente difficile, presumibilmente in conseguenza del fatto che in molti casi i pazienti giungono all'osservazione del neurochirurgo quando una terapia antibiotica perlomeno empirica è stata già iniziata, il che rende gli strisci eseguiti sulle deiscenze di ferita e i tamponi effettuati intraoperatoriamente pressochè inutili. E' inoltre possibile che nel caso delle presentazioni con deiscenza di ferita apparentemente asciutte, si sia avuta una fase replicativa batterica intensa con fuoriuscita di materiale purulento, seguita da una riduzione della carica locale nel momento di creazione di un equilibrio fra germe e sito ospite.

## **Bibliografia**

1) Yu-Kai Cheng, Hsu-Huei Weng, Jen-Tsung Yang, Ming-Hsueh Lee, Ting-Chung Wang, Chen-Nen Chang. Factors affecting graft infection after cranioplasty. *Journal of Clinical Neuroscience*. 15, 2008; 1115-1119. DOI: 10.1016/j.jocn.2007.09.022

- 2) Bhaskar IP, Inglis TJ, Bowman J, Lee GY. Microbial contamination assessment of cryostored autogenous cranial bone flaps: should bone biopsies or swabs be performed? *Acta Neurochir (Wien)*. 2013 Feb;155(2):367-71. doi: 10.1007/s00701-012-1517-8. Epub 2012 Oct 9
- 3) Cheng CH, Lee HC, Chen CC, Cho DY, Lin HL. Cryopreservation versus subcutaneous preservation of autologous bone flaps for cranioplasty: comparison of the surgical site infection and bone resorption rates. *Clin Neurol Neurosurg*. 2014 Sep;124:85-9. doi: 10.1016/j.clineuro.2014.06.029. Epub 2014 Jul 1
- 4) Bhaskar IP, Inglis TJ, Lee GY. Clinical, radiological, and microbiological profile of patients with autogenous cranioplasty infections. *World Neurosurg*. 2014 Sep-Oct;82(3-4):e531-4. doi: 10.1016/j.wneu.2013.01.013. Epub 2013 Jan 5
- 5) Morton RP, Abecassis IJ, Hanson JF, Barber J, Nerva JD, Emerson SN, Ene CI, Chowdhary MM, Levitt MR, Ko AL, Dellit TH, Chesnut RM. Predictors of infection after 754 cranioplasty operations and the value of intraoperative cultures for cryopreserved bone flaps. *J Neurosurg*. 2016 Sep;125(3):766-70. doi: 10.3171/2015.8.JNS151390. Epub 2016 Jan 15.
- 6) Chen Y, Zhang L, Qin T, Wang Z, Li Y, Gu B. Evaluation of neurosurgical implant infection rates and associated pathogens: evidence from 1118 postoperative infections. *Neurosurg Focus*. 2019 Aug 1;47(2):E6. doi: 10.3171/2019.5.FOCUS18582.

## Capitolo VI: Biofilm, il nemico semiconosciuto

Perché è così difficile trattare le infezioni di cranioplastica? Perché nella maggior parte dei casi è impossibile salvare un opercolo osseo infetto? Perché anche quando si sia identificato il germe causante l'infezione spesso è impossibile mantenere in situ l'impianto o anche semplicemente osservare una tendenza alla chiusura delle aree fistolose o di deiscenza dei lembi chirurgici di copertura nonostante la somministrazione del corretto trattamento antibiotico sia stata assicurata alla dose massima tollerabile? Molti di questi eventi sembrano sfuggire completamente alla logica, perlomeno in relazione all'evoluzione della scienza medica negli ultimi 30 anni. Alla comparsa di nuove resistenze batteriche è stata opposta la creazione o a volte la scoperta di nuove molecole antibiotiche, in grado di superare l'ostacolo. Ma verso la fine degli anni '80 i microbiologi hanno cominciato a notare un pattern che sfuggiva alla solidità delle conoscenze fino a quel punto accumulate. E questo tipo di eventi interessava frequentemente pazienti portatori di impianti protesici, la cui storia clinica diveniva progressivamente più complessa, con ripetute rimozioni e riposizionamenti degli stessi, di cui spesso non avrebbero potuto fare a meno, fino al punto, in alcuni casi, di giungere alla drastica decisione di rimuovere definitivamente l'impianto per poi non intervenire più. Sebbene in quest'ultima condizione il focolaio infettivo apparisse sopito, si osservavano in modo incidentale alcune recidive, che rispondevano ancora una volta alla terapia, lasciando il campo pulito per un intervallo di tempo ben superiore a quanto visto in precedenza. Le prime osservazioni su questi fenomeni risalgono alla malattia periodontale ed allo storico lavoro di Socransky<sup>1</sup>. L'autore identificava 4 categorie di infezioni batteriche. Il primo tipo è quello causato da agenti infettanti esogeni che possono essere debellati anche solo dall'organismo entro pochi giorni. Il secondo tipo include le infezioni batteriche croniche, come la tubercolosi e la lebbra, a lento inizio dopo la colonizzazione dell'ospite. Questi microrganismi sono considerati esogeni ma hanno le tipicità delle colonizzazioni endogene, ad esempio proprio il micobatterio tubercolare può rimanere anni nell'organismo prima di divenire attivo. La caratteristica principale di questi germi è che possono

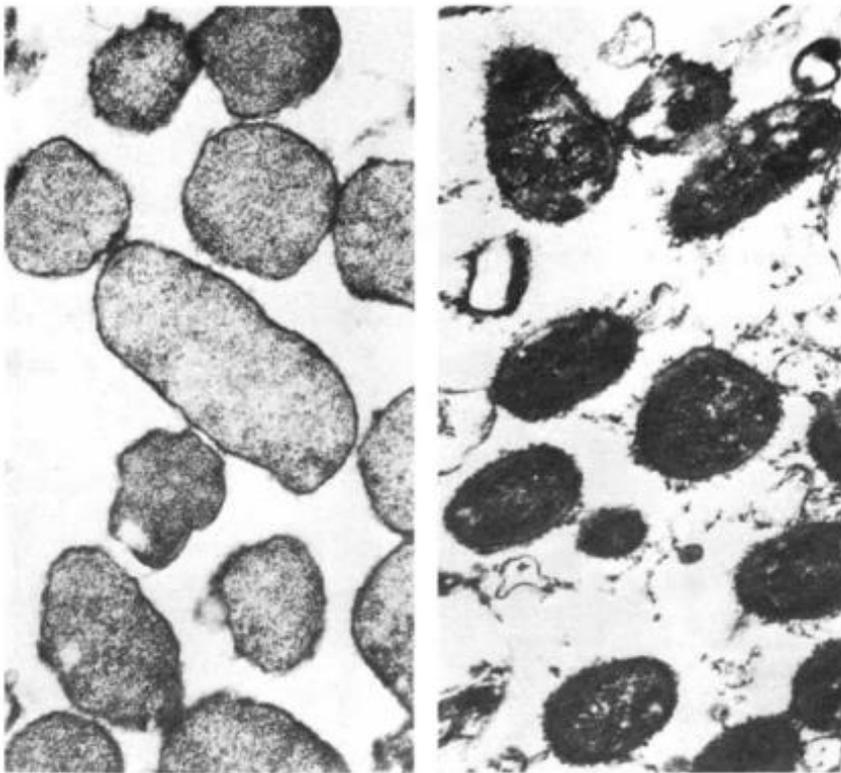
mantenere l'infezione per lungo tempo, l'ospite non è mai in grado di guarire da solo e richiede terapia antibiotica e di supporto. La terza classe di infezioni batteriche provoca sintomi particolarmente complessi, da mesi ad anni dopo l'infezione iniziale. Ne sono esempi la febbre reumatica, la sifilide, la malattia di Lyme. Il danno indotto può durare permanentemente. La fonte di alcune di queste infezioni è ignota, l'inizio inatteso, con segni minimi. Il trattamento è solo antibiotico ma è efficace esclusivamente se somministrato nelle fasi iniziali della malattia, nelle fasi avanzate è spesso poco utile. La quarta categoria, infine, include le infezioni correlate a germi con andamento vitale altalenante, in grado di causare infezioni che si accendono e si spengono, rispondendo agli antibiotici a volte in modo considerevole, inducendo i sanitari a pensare di aver guarito il paziente, un errore che si evidenzia alle improvvise riaccensioni di malattia. Questi sono gli agenti del cosiddetto Biofilm, oggi ritenuto il vero motivo causale del fallimento delle cure delle infezioni degli impianti protesici<sup>2-4</sup>. Anche in questo caso l'inizio della malattia può essere ritardato, perfino di anni, ed il decorso altrettanto lungo. Nella maggior parte dei pazienti si ha a che fare con germi appartenenti al microbiota indigeno, motivo per cui l'infezione può essere considerata endogena. Il trattamento è complesso poiché è richiesto un approccio chirurgico ed antimicrobico. Le malattie biofilm-associate sono uniche ed il problema maggiore sta nel fatto che il 65% delle infezioni umane sono causate da germi capaci di formare biofilm.

Cos'è, dunque il Biofilm? Dal punto di vista storico la ricerca sui microrganismi si è prevalentemente concentrata sulle cosiddette cellule batteriche fluttanti o cellule "planctoniche". Questo tipo di interesse deriva dallo sviluppo di metodi standardizzati per l'isolamento e la coltura dei batteri sviluppati nel tardo XIX° secolo e sebbene le tecniche stesse siano nettamente migliorate e con esse la conoscenza della vita microbica, è stato allo stesso tempo riconosciuto che i mezzi di crescita artificiale e le metodiche di coltivazione pura ci permettono di gettare solo un'occhiata fugace ai microbi nel loro ambiente naturale. La prima descrizione del biofilm risale in realtà al XVII° secolo. Nel 1684, il microbiologo olandese Antonie van Leeuwenhoek osservò la presenza di microrganismi

adesi alla superficie di un suo dente<sup>5</sup>. Nonostante ciò ci vollero molti anni prima che studi dettagliati permettessero di comprendere meglio il fenomeno dell'adesione microbica. Nel 1923 il Dipartimento della Marina statunitense documentò la presenza di batteri, lieviti e muffe sulla melma adesa alla chiglia delle sue navi<sup>6</sup>. Una decade più tardi, Henrici dimostrò che per la maggior parte i batteri in acqua sono organismi fluttuanti, capaci di crescere sulle superfici sommerse<sup>7</sup>. Questo autore mostrò inoltre che la formazione di un biofilm microbico su piastre di vetro lasciate in ambiente acquatico derivava dall'aggancio iniziale delle cellule microbiche alle piastre stesse, seguito dalla formazione di microcolonie. Queste osservazioni vennero confermate da Zobell, che descrisse come il numero di microrganismi viventi planctonici nell'acqua di mare fresca si riduceva gradualmente se tenuta all'interno di una bottiglia di vetro, tendendo invece ad aumentare sulla superficie esterna della bottiglia (il cosiddetto "effetto bottiglia")<sup>8</sup>. L'ipotesi che i nutrienti si accumulassero sulla superficie (e che pertanto le cellule adese avessero maggiore facilità ad accedervi) veniva usata per spiegare l'apparente preferenza dei microbi per una vita adesa alle superfici stesse. Zobell suggerì che l'adesione di questi microrganismi fosse un processo attivo e descrisse per la prima volta la produzione del cosiddetto "cemento micillaginoso", in grado di promuovere l'adesione delle cellule sessili. Nonostante l'incrementarsi dell'interesse dei microbiologi per questo fenomeno, una teoria generale sulla predominanza dei biofilm venne proposta solo nel 1978, quando Bill Costerton pubblicò il saggio dal titolo "How bacteria stick" su *Scientific American*<sup>9</sup>. La ricerca successiva rivelò che in quasi tutti gli ambienti naturali e creati dall'uomo il biofilm è il modo di crescita preferito dai microrganismi.

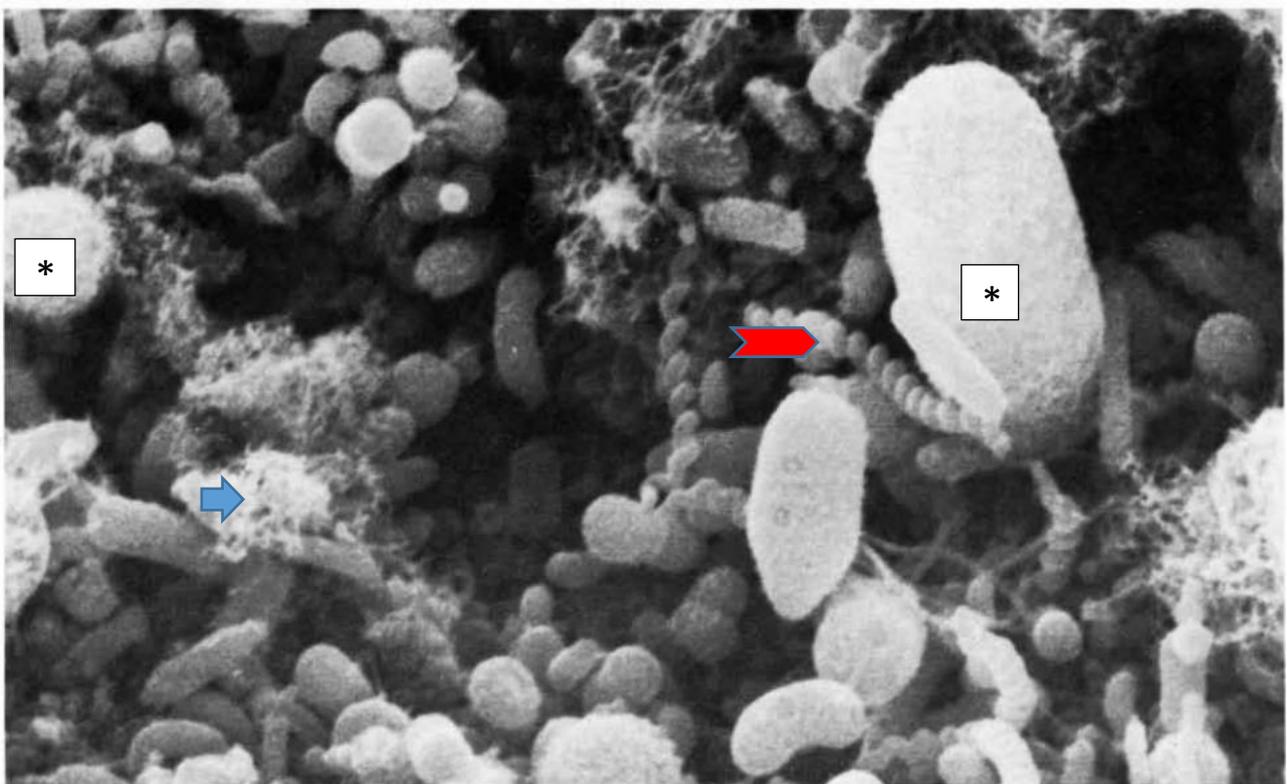
I batteri aderiscono tenacemente e spesso con squisita specificità alle superfici, dal dente umano al polmone, all'intestino della mucca ad una roccia sommersa in un torrente. Si comportano così grazie ad una massa di agglomerati polisaccaridici che si ramificano, in modo tale da estendersi dalla superficie batterica e formare quello che somiglia ad un glicocalice che circonda le singole cellule o intere colonie delle stesse. L'adesione mediata dal glicocalice determina le localizzazioni specifiche

dei batteri nella maggior parte degli ambienti naturali. In sostanza questo è esattamente il mezzo attraverso cui la progressione dell'infezione batterica inizia, in processi molto diversi fra loro, dalla carie alla polmonite. Per generare e mantenere il glicocalice un batterio deve spendere energia e, nell'ambiente protetto di una coltura pura, il glicocalice è un lusso metabolicamente costoso, che non conferisce alcun vantaggio selettivo<sup>10</sup>. Le cellule che fabbricano questo rivestimento vengono di solito eliminate dalle colture pure, favorendo i mutanti nudi, che devolvono il loro intero budget energetico alla proliferazione<sup>11,12</sup>. I microbiologi hanno ampiamente studiato questi mutanti nudi. Nonostante ciò, l'ambiente naturale è popolato da numerosi tipo di batteri e la selezione tende a favorire le cellule che sono protette e capaci di aderire a superfici "desiderabili" tramite il glicocalice.



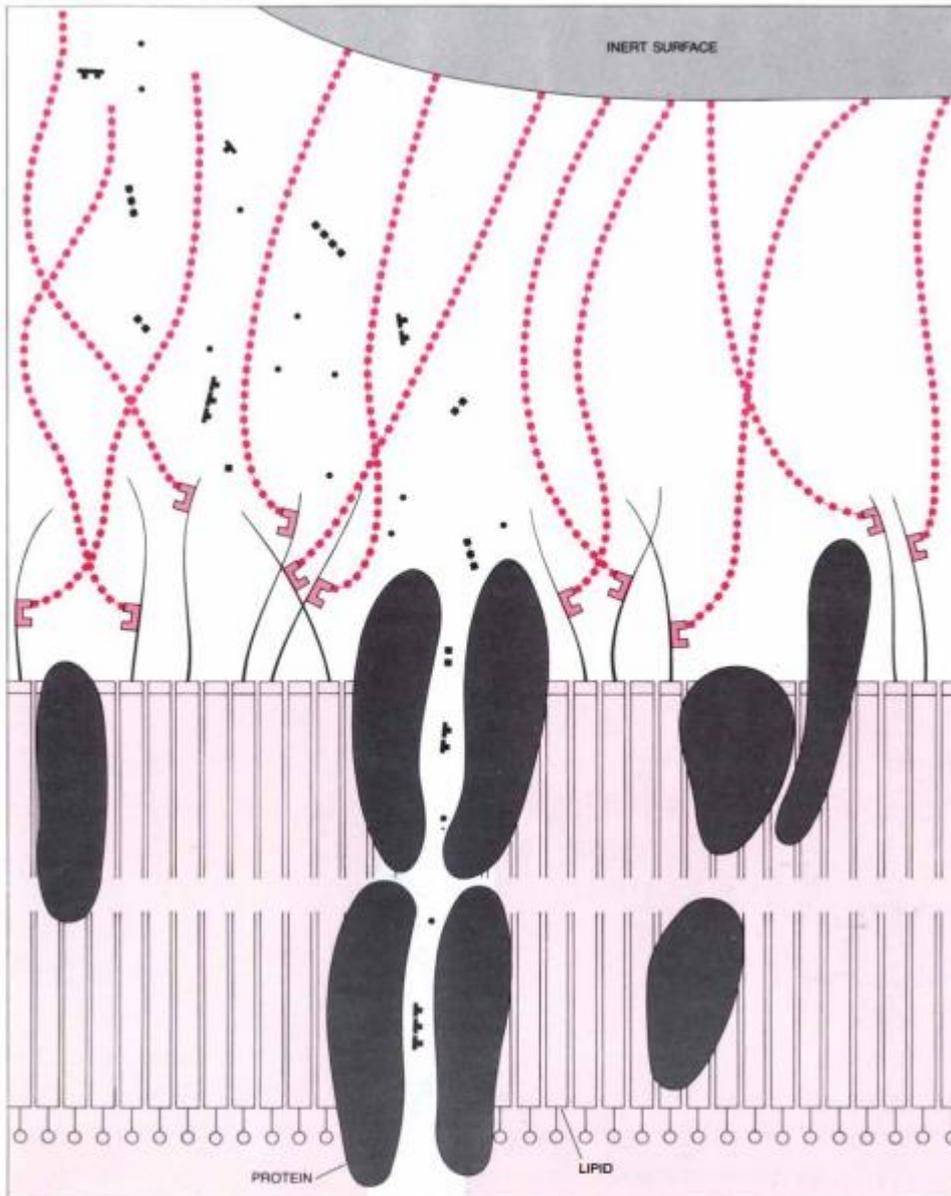
**Il batterio semplice (nudo) a sinistra, deriva da una coltura di laboratorio di E.Coli. Il batterio a destra (Pseudomonas) da una vescica umana infetta. In entrambi i preparati le cellule venivano colorate con rosso rutenio, che viene assorbito dalle fibre del glicocalice polisaccarico. Si può notare la massiccia differenza di assunzione del colorante. I batteri di laboratorio non possono formare glicocalice, a causa dell'elevata richiesta metabolica.**

Nel 1969 Ivan Roth dimostrò le fibre dei carboidrati che circondavano i batteri in un sistema acquatico e Ian Sutherland caratterizzò i polisaccaridi di superficie dei batteri presi dal loro ambiente, portando l'attenzione proprio sul glicocalice<sup>13</sup>. Gli studi successivi hanno confermato come questa struttura sia essenziale per il successo biologico della maggioranza dei batteri nella gran parte degli ambienti naturali in cui vengono osservati. La superficie rivestita da polisaccaride non è una peculiarità delle sole cellule batteriche. La cellula a parete polisaccaridica rigida delle piante è stata la prima struttura microscopica descritta da Robert Hooke nel 1665<sup>14</sup>. L'analogia superficie delle cellule animali, un glicocalice simile a quello dei batteri, venne descritta solo nel 1971, da Vincent Marchesi, che riuscì ad isolare ed identificare le glicoproteine presenti nella membrana di cellule animali morte, dimostrando che le fibre di polisaccaride si estendevano al di fuori della membrana stessa, per formare non semplici estroflessioni ma un vero e proprio glicocalice, di per se stesso una superficie continua, divenuto a quel punto la vera superficie funzionale della cellula<sup>15</sup>.



**Microfotografia elettronica: Singole cellule batteriche (asterisco) e alcuni lieviti (freccia azzurra) distribuiti sulla mucosa enterica di una mucca. Le fibre di polisaccaride appaiono in forma di agglomerati tubulari ritorti (freccia rossa).**

La precisa natura chimica del glicocalice varia a seconda della composizione glucidica delle fibre, tale da differire da cellula a cellula nel corpo animale e probabilmente in stadi differenti della vita della singola cellula. La conclusione logica di queste osservazioni è che la reale superficie funzionale di tutte le cellule, batteriche, animali e delle piante, non sia altro che un tappeto aggrovigliato di fibre polisaccaridiche prefabbricate e orientate dalla cellula stessa. Una cellula batterica aderirà pertanto ad una animale o vegetale semplicemente giustappoendo il proprio glicocalice alla superficie su cui si adagia. In molti casi questo legame sarà fornito dalle “lectine”, proteine di legame dei polisaccaridi ad alta specificità e con ben definita struttura molecolare<sup>16-18</sup>.



Il glicocalice si estende dalla membrana esterna del batterio. La membrana è composta da uno strato bilaterale di molecole lipidiche (le strutture a forchetta in basso), nelle quali sono incluse le molecole proteiche (in grigio). Le molecole di lipopolisaccaride (a forma di capelli, in nero), si estendono al di fuori della membrana. Il glicocalice è costituito dalla massa di lunghe catene (colorate in rosso) di natura polisaccaridica. Queste fibre non sono altre che catene di molecole di zucchero generate dall'enzima batterico polimerasi (a forma di C in rosso), adeso al lipopolisaccaride. Le fibre del glicocalice aderiscono alle strutture vicine, in questo caso ad una superficie inerte (in alto a destra). Oltre a mediare l'adesione batterica le fibre consentono il passaggio verso il batterio di numerosi nutrienti, inclusi zuccheri (raffigurati come rettangoli), aminoacidi (a forma di T) e ioni inorganici (puntini), che entrano nella cellula attraverso canali di membrana formati da agglomerati proteici.

Lo studio pionieristico sulla formazione del glicocalice nei batteri è stato quello sullo *Streptococco Mutans*, un organismo che colonizza il dente umano, ad opera di Ronald Gibbons, del Forsyth Dental Center di Boston<sup>19</sup>.

Fra il 1960 ed il 1967 veniva riportato che 3 enzimi posti alla superficie batterica interagivano con uno zucchero in particolare, il saccarosio, composto da glucosio e fruttosio. L'enzima invertasi divideva il saccarosio in due componenti, entrambe rilasciate per divenire fonti energetiche della cellula. Un secondo enzima, la glicosiltransferasi, divideva il saccarosio per rilasciare fruttosio come nutriente ma polimerizzava il glucosio in un lungo polisaccaride chiamato glucano, insolubile in acqua. Un terzo enzima, la fruttosiltransferasi, trasformava il fruttosio in un polisaccaride simile, stavolta idrosolubile, liberando glucosio. Il riscontro importante era che il glucano è in qualche modo capace di aderire alla superficie inerte dello smalto dentale e perciò di far aderire le cellule batteriche al dente. Poiché la glicosiltransferasi è presente in tutto il network dei glucani del glicocalice, i glucani stessi che continuano ad essere prodotti ispessiscono il glicocalice, intrappolando altre cellule batteriche della stessa o anche di altre specie, costruendo la struttura giallastra nota come placca. Un altro batterio umano, lo *Streptococco Salivario*, colonizza non il dente ma la gengiva, liberando glucani che migrano verso la superficie dentaria adiacente e grazie alla glicosiltransferasi di accompagnamento intrappola una popolazione batterica mista che forma la placca. E' all'interno della placca che gli enzimi batterici responsabili delle carie sono concentrati, contro lo smalto. Il resoconto di Gibbons diresse l'attenzione degli osservatori verso altri ambienti batterici naturali. Roth e collaboratori studiarono numerose superfici batteriche, scoprendo che anche in questo caso erano coperte da un film di polisaccaridi. Negli studi successivi di microscopia elettronica venne scoperto che un batterio può ancorarsi alla plastica inerte creando uno strato di fibre di polisaccaride in grado di resistere ad enormi forze di stiramento. La colonizzazione iniziale può essere ottenuta da un solo batterio per poi giungere nel tempo ad una popolazione mista e complessa, E' ancora ignoto quale sia la colla che lega le fibre del glicocalice a strutture inerti come la plastica. A differenza delle superfici

inerti, le cellule di piante ed animali presentano al batterio una parete o un glicocalice chimicamente definito dalla composizione di un proprio polisaccaride. Le fibre del polisaccaride batterico sono per lo più cariche negativamente e possono formare un legame polare con i polisaccaridi di cellule più complesse attraverso ioni positivi divalenti presenti nel mezzo di crescita. Le lectine dotate di una specifica attrazione per le fibre del glicocalice e per i polisaccaridi delle cellule complesse possono fungere da ponte. I batteri le cui fibre non si legano né direttamente a quelle delle cellule superiori né presentano lectine adatte, semplicemente non si legano. Come risultato della specificità dell'adesione, una superficie cellulare complessa può essere colonizzata da batteri di una singola specie, che possono proliferare per formare microcolonie chuse ed ancorate dalle fibre stesse. A questo punto altri batteri, aspecifici, possono anch'essi aderire ai colonizzatori iniziali, creando una popolazione mista. Il grado di aderenza di un batterio ad un tessuto può essere valutato posizionando i batteri in un terreno sperimentale adatto, con il tessuto studiato che verrà identificato come "il pavimento". Dopo un adeguato periodo di tempo il tessuto verrà esaminato per vedere quanti batteri hanno aderito al glicocalice ospite. Andrew Onderdonk (Veterans Administration Hospital Boston) dimostrò come in questa situazione le cellule di *Bacteroides Fragilis* con un glicocalice ben sviluppato aderiscano facilmente al peritoneo di ratto e che, al contrario, cellule mutanti incapaci di produrre glicocalice non riescano ad aderire<sup>20</sup>. Esperimenti simili suggeriscono che la natura del glicocalice delle cellule di ordine superiore si modifica con l'invecchiamento cellulare, il che spiega come mai alcune cellule dell'intestino dei bovini possono essere fortemente colonizzate ed altre no. Il successivo riscontro che il glicocalice è alterato nelle cellule infettate dai virus spiega inoltre l'incrementata suscettibilità alle infezioni batteriche dopo infezioni virali. Le fibre del glicocalice possono non solo aiutare i batteri a posizionarsi ma anche a conservare e concentrare gli enzimi digestivi per dirigerli contro le cellule dell'ospite. Le microfotografie elettroniche mostrano che gli enzimi di un batterio adeso ad una fonte di nutrimento possono scavare una vera e propria cavità, nella quale il batterio crea lentamente la sua strada. Questo suggerisce che la pericolosa persistenza dello *Stafilococco Aureo* sulla cute degli

operatori sanitari possa essere per esempio dovuta al fatto che questi batteri sono difficili da eliminare per gli spazi che scavano fra le cellule cutanee delle mani, spazi dai quali derivano i loro nutrienti.

Il glicocalice può inoltre funzionare da riserva di nutrimento per i batteri. Le fibre polisaccaridiche sono per lo più cariche negativamente. Così come accade per alcune resine a scambio ionico, queste fibre possono legare ioni nutrienti e molecole che vagano nell'ambiente vicino o sono prodotte da enzimi digestivi batterici, rendendole così disponibili per la cellula. In natura i batteri sono soggetti a molte fonti stressogene, contro le quali il glicocalice offre protezione. L'adesione alla superficie protegge per esempio i batteri da alcuni protozoi. Il glicocalice funziona infatti da barriera fisica contro altri barriera predatori e contro i virus dei batteri e la sua capacità di legame intrappola anche piccoli ioni e molecole ambientali dannose. La capacità protettiva del glicocalice è di particolare interesse nei batteri patogeni. E' stato per esempio scoperto che cellule singole di *Pseudomonas aeruginosa* prive di rivestimento, introdotte nel polmone di ratto vengono rapidamente fagocitate dai leucociti del ratto stesso, laddove le cellule di difesa non possono gestire microcolonie dello stesso batterio racchiuse dal glicocalice<sup>21</sup>. Altri esperimenti indicano che il glicocalice impedisce agli anticorpi dell'ospite di reagire con la superficie delle *Pseudomonas* nel tratto urinario. In alcune condizioni di malattia la formazione del glicocalice batterico e pertanto la virulenza stessa del germe sembra aumentata dall'aumento sproporzionato delle concentrazioni di alcuni nutrienti, come accade ad esempio nella fibrosi cistica, malattia nella quale vi è un eccesso di sodio e magnesio nei polmoni. Oltre a mantenere i batteri in una situazione di vantaggio e proteggerli, il glicocalice potrebbe a volte raggruppare i batteri in qualcosa che assomiglia ad una comunità organizzata<sup>22,23</sup>. Nei sedimenti osservati nelle acque lacustri ed in altri ecosistemi, due o più specie batteriche possono agire insieme come in un consorzio, per svolgere processi fisiologici. E' stata per esempio dimostrata un'associazione consortile di questo genere in cui una specie rilascia idrogeno dai composti organici e lo passa ad un'altra specie che lo usa per trasformarlo in metano. Un trasferimento di questo tipo richiede che i membri del consorzio siano tenuti vicini e che vi sia un'affinità chimica fra i glicocalici

delle diverse specie cooperanti. Alcune microfotografie elettroniche hanno documentato batteri che digeriscono la cellulosa di una parete vegetale mentre batteri di un'altra specie giacciono distribuiti lungo il lato libero da attività digestiva. Una simile struttura comunitaria potrebbe rispondere rapidamente e con elevata plasticità a modificazioni delle condizioni dei nutrienti o a bruschi cambiamenti ambientali, laddove i batteri nella nicchia sbagliata si limiterebbero a morire. L'intera popolazione mista avrebbe perciò alcune delle caratteristiche ma nessuna delle vulnerabilità di un organismo multicellulare. Se l'adesione ha un ruolo centrale per il successo dei batteri patogeni, la prevenzione di tale adesione sarebbe pertanto l'unico modo di prevenire o combattere le infezioni batteriche.

Queste prime osservazioni hanno trovato un successivo enorme riscontro nella letteratura microbiologica e negli ultimi anni anche in quella medica. E' ormai riconosciuto che la formazione del biofilm è un aspetto fondamentale se non per tutte almeno per la maggioranza delle infezioni batteriche, includendo l'endocardite valvolare, l'osteomielite, la carie dentale, le infezioni dell'orecchio medio, le infezioni collegate alle protesi impiantate, le infezioni oculari e le infezioni polmonari croniche. I biofilm cosiddetti "maturi", possono tollerare concentrazioni di antibiotico enormemente superiori a quelle necessarie per uccidere batteri planctonici geneticamente equivalenti e sono straordinariamente resistenti alla fagocitosi, rendendo il biofilm estremamente difficile da eradicare dagli ospiti viventi<sup>24-26</sup>. Di conseguenza, le infezioni biofilm-correlate che sembrano rispondere agli antibiotici possono poi recidivare settimane o mesi più tardi, rendendo la rimozione chirurgica o la sostituzione del tessuto e dell'impianto infetto una necessità frequente. L'impatto grave e pervasivo del biofilm batterico ha condotto a studiare i meccanismi regolatori che si trovano dietro alla sua formazione e dissoluzione, lo scopo ultimo degli agenti antibatterici. Da qui ha avuto origine tutta una serie di studi di proteomica e genomica che hanno condotto all'identificazione di una moltitudine di geni associati allo sviluppo del biofilm, sebbene comprendere appieno il ruolo di tutti questi geni sia comunque un compito eccessivamente complesso. Purtroppo, i processi regolatori

dell'elaborazione del biofilm sono ciclici e dinamici. In altre parole, condizioni esterne scatenano le alterazioni di espressione del sottotipo di geni richiesti per la formazione del biofilm e quest'ultimo, a sua volta, altera il microambiente dei suoi stessi abitanti, il che conduce ad ulteriori alterazioni dell'espressione genica ed alla ulteriore maturazione del biofilm<sup>27-30</sup>.

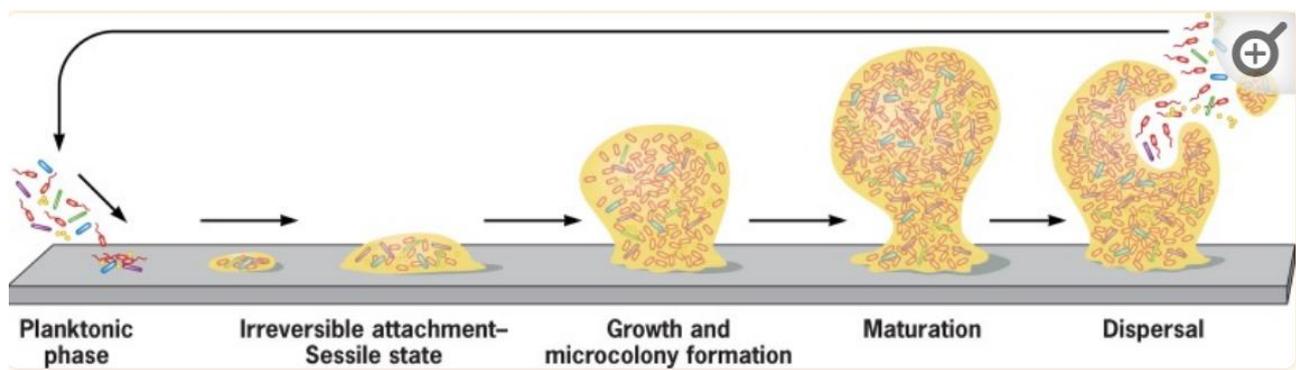
Gene	Protein/function	Species	References
<b>Adhesion</b>			
<i>abpA</i>	Amylase binding	<i>S. gordonii</i>	[7]
<i>sspA/B</i>	Human salivary protein and collagen binding	<i>S. gordonii</i>	[7]
<i>gbpA</i>	Polysaccharide formation	<i>S. mutans</i>	[7]
<i>tarC</i>	Regulator of glucosyltransferase S and glucan binding protein	<i>S. mutans</i>	[50]
<i>icaADBC</i>	Intercellular adhesin synthesis	<i>S. aureus, S. epidermidis</i>	[8]
<i>hla</i>	Hemolytic toxin	<i>S. aureus</i>	[51]
<i>clfA</i>	Clumping factor A, fibrinogen binding protein	<i>S. aureus</i>	[52]
<i>dltA</i>	D-alanine esterification of teichoic acids	<i>S. aureus</i>	[53]
<i>atlE</i>	Autolysin/adhesin	<i>S. epidermidis</i>	[8]
<i>aap</i>	Accumulation associated protein	<i>S. epidermidis</i>	[54]
<i>bopABCD</i>	Biofilm on plastic surfaces operon	<i>Enterococcus faecalis</i>	[55]
<i>esp</i>	Enterococcal surface protein	<i>E. faecalis</i>	[56]
<i>agn43</i>	Antigen protein involved aggregation	<i>E. coli</i>	[57]
<b>Quorum sensing</b>			
<i>comX</i>	Competence	<i>S. gordonii</i>	[58]
<i>comABCDE</i>	Competence	<i>S. mutans</i>	[12]
<i>luxS?</i>	Quorum sensing	<i>S. mutans</i>	[33]
<i>lasI</i>	Synthesis of 3OC12-HSL quorum-sensing signal	<i>P. aeruginosa</i>	[35]
<b>Cell wall</b>			
<i>PBP2B</i>	Peptidoglycan synthesis	<i>S. gordonii</i>	[7]
<i>PBP5</i>	Peptidoglycan synthesis	<i>S. gordonii</i>	[7]
<i>glmM</i>	Peptidoglycan synthesis	<i>S. gordonii</i>	[7]
<i>bacA</i>	Peptidoglycan synthesis	<i>S. gordonii</i>	[7]
<i>brpA</i>	Possible regulator of autolysis	<i>S. mutans</i>	[34]
<b>Metabolism</b>			
<i>ccpA</i>	Carbon catabolite control protein	<i>S. mutans</i>	[34]
<i>crc</i>	Global carbon metabolism regulator	<i>P. aeruginosa</i>	[59]
<b>Stress response</b>			
<i>dgk</i>	Stress response regulator, lantibiotic regulator	<i>S. mutans</i>	[12]
$\sigma^B?$	Alternate sigma factor-stress response	<i>S. aureus, S. epidermidis</i>	[13,14]
<i>purR</i>	Regulator of purine synthesis, metabolism	<i>S. epidermidis</i>	[60]
<i>rpoS?</i>	Regulator involved in slow growth	<i>E. coli</i>	[15,18]
<i>mutT</i>	DNA mismatch repair	<i>S. gordonii</i>	[7]
<b>Plasmids</b>			
<i>tra</i>	Conjugative pilus of F plasmid	<i>E. coli</i>	[41]

#### Alcuni dei geni ritenuti responsabili della formazione del biofilm in differenti specie batteriche

A complicare lo studio dell'espressione genica si aggiunge il fatto che gli abitanti del biofilm sono eterogenei. Le infezioni biofilm-correlate possono essere multi-specie o addirittura, anche se più raramente, multi-regno (come accade nella carie). Perfino batteri con biofilm a singola specie sono spesso eterogenei rispetto all'espressione genica. Questo è dovuto alle limitazioni di diffusione

imposte dal biofilm, che determinano variazioni locali nel pH, nella disponibilità di nutrienti ed ossigeno e nella concentrazione di metaboliti batterici. Oltre a tutte queste complicazioni, gli studi sui biofilm sono confusi a causa delle intrinseche limitazioni dei modelli in vitro e delle tecniche disponibili per studiare i ruoli di questi geni.

Qual è il motivo finale per cui i batteri formano il biofilm? Secondo la teoria evuzionistica Darwiniana la sola vera forza traente del corso di azione di ogni organismo vivente è l'adattatività dal punto di vista riproduttivo. Qualunque meccanismo che incrementi la proliferazione perdurerà all'interno della specie. Perciò, quando si parla della forza traente del biofilm, ci si chiede semplicemente come fa il modo di crescita del biofilm a propagare la cellula<sup>31</sup>. Sembra quasi controintuitivo che la modalità di crescita del biofilm possa dare un vantaggio riproduttivo, se si pensa che i batteri all'interno del biofilm stesso hanno un tasso di crescita relativamente ridotto rispetto alle specie coltivate in laboratorio in forma planctonica. Al di fuori dei laboratori però i batteri si trovano raramente (praticamente mai) in un ambiente così ricco di materiali da assorbire e in condizioni tutt'altro che ideali, per cui esistono numerosi vantaggi dati dal modo di crescita del biofilm.

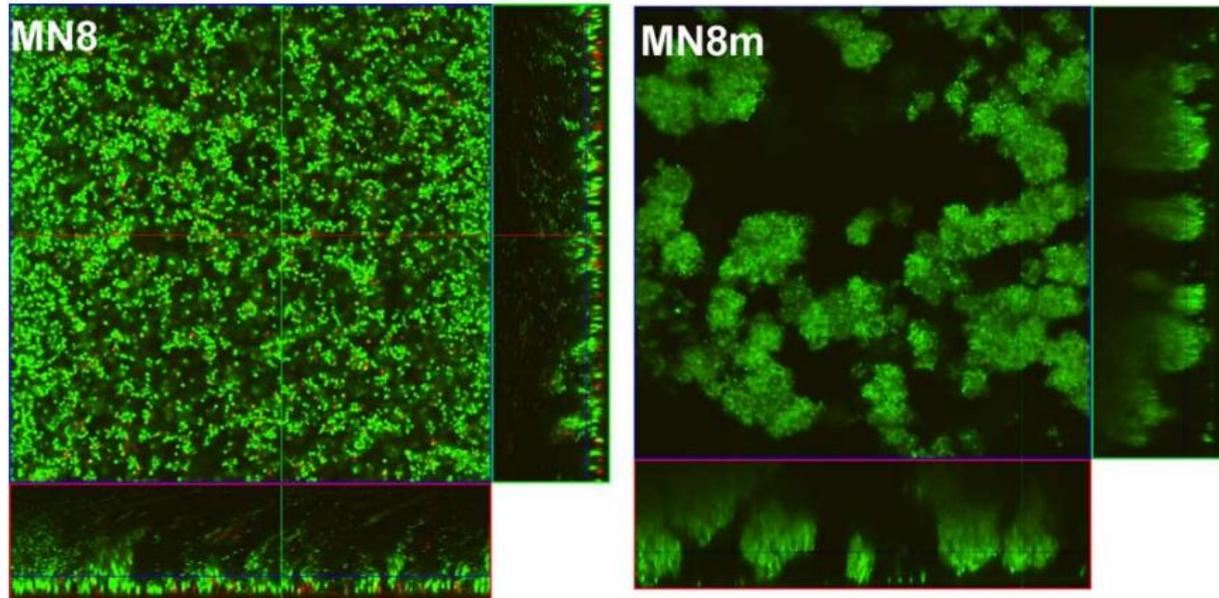


**Modalità di creazione del biofilm, L'adesione è uno step essenziale per il successivo sviluppo delle microcolonie**

Come già accennato inizialmente, i biofilm sono resistenti alle forze di stiramento prodotte dal flusso ematico e dell'azione di lavaggio di alcuni liquidi biologici come ad esempio la saliva. Organismi che si trovino nel biofilm possono sopportare la deprivazione di nutrienti, le modificazioni del pH,

l'azione di ossigeno, radicali liberi, disinfettanti e antibiotici meglio dei loro fratelli planctonici. I biofilm mostrano inoltre una elevata resistenza alla fagocitosi e i fagociti che tentino di assalire un biofilm possono in realtà danneggiare più che altro i tessuti circostanti. La natura cronica di alcune infezioni è indubabilmente legata allo sviluppo di un biofilm resiliente, la cui invulnerabilità è scarsamente compresa, sebbene sia sicuramente dipendente da un certo numero di caratteristiche specifiche, che includono fra le altre un rallentamento di crescita programmato ed una eterogeneità fisiologica degli organismi abitanti. Ulteriore tratto fortificante della resistenza del biofilm è la matrice adesiva contenente eDNA ed altri polimeri, ma anche e soprattutto esopolisaccaride (EPS)<sup>32-34</sup>. Il ruolo di quest'ultimo nella formazione del biofilm è esemplificato dagli stadi precoci e tardivi dello stesso. Nell'*Escherichia Coli*, il gene *csgA*, che codifica per una proteina coinvolta nella sintesi dell'acido colanico, determina l'aggregazione, mentre il gene *algC* (richiesto per la sintesi dell'alginato, di cui EPS è ricchissimo) gioca un ruolo nei biofilm di *Pseudomonas Aeruginosa*. La sintesi di EPS è importante allo stesso modo nei biofilm dei Gram positivi<sup>35-36</sup>. La proteina legante i glucani nota come GbpA, è una glicosiltransferasi che è stata implicata nella sintesi di polisaccaride dipendente dal saccarosio e della formazione del biofilm nello *Streptococcus Mutans*<sup>37-40</sup>. Infine, il locus genetico di adesione intercellulare (*icaADBC*) nello *Stafilococco aureo* e nell'*epidermidis* codifica i geni responsabili della sintesi del polimero b-1-6 poli-Nacetilglucosamina, detto anche PNAG o PIA (polisaccaride intercellular adhesin)<sup>41-42</sup>.

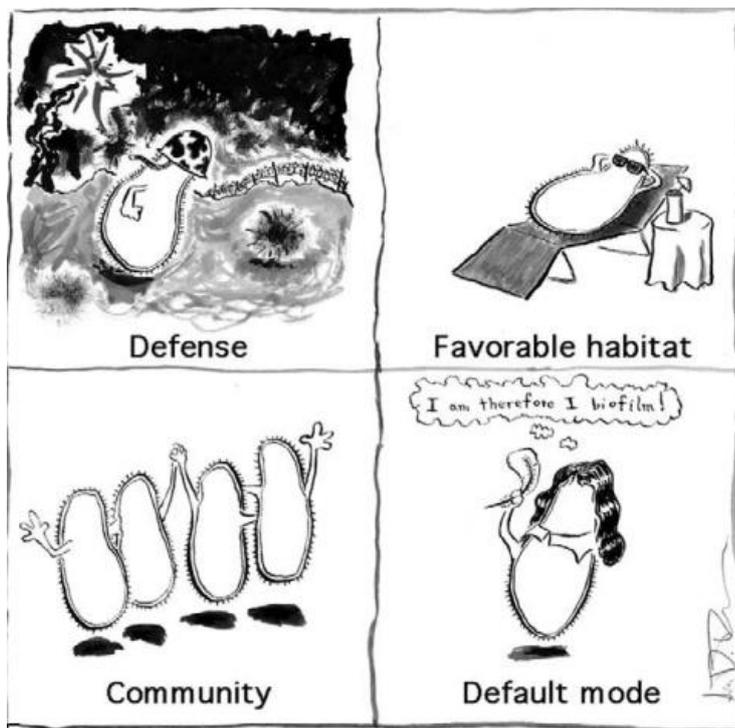
In aggiunta ai suoi ruoli nell'aggregazione e nella strutturazione del biofilm, l'EPS gioca anche un ruolo nella difesa, permettendo al biofilm di resistere alle forze di stiramento ed alla fagocitosi da parte delle cellule dell'infiammazione. Esistono alcune evidenze che suggeriscono che l'EPS possa essere coinvolto nella tolleranza del biofilm agli antibiotici sebbene questa sia ancora materia di dibattito. In ogni caso, se la sola forza che guida la produzione di EPS e la formazione di biofilm fosse effettivamente la necessità di introdurre una resistenza ai pericoli incontrati nel corpo dell'ospite, quali sarebbero allora gli indizi ambientali di cui i batteri necessitano per alzare le loro difese?



In microscopia confocale viene dimostrata l'influenza dell'esopolisaccaride sulla struttura di *Stafilococco Aureo*. Il ceppo MN8 di Aureo e la variante MN8m in grado di sovrapprodurre PNAG fatti crescere su piastre di vetro rivestite da collagene per 48 in condizioni di flusso. Biofilm colorato con BacLight Live/Death, che colora i batteri vivi in verde ed in rosso i morti. Le immagini mostrano che il livello di PNAG ha un ruolo critico nella struttura del biofilm. MN8 forma un biofilm non strutturato, MN8m (sulla destra), un biofilm altamente strutturato, con colonie dense di aspetto fungiforme separate da ampi canali.

Sappiamo che in effetti alcune specie batteriche potrebbero essersi evolute per modificare ed attivare i geni codificanti per EPS in risposta a stimoli incontrati nell'ospite subito dopo l'ingresso nello stesso, prima ancora che il sistema immune passi all'attacco. Alcuni stimoli che mimano la fisiologia del corpo umano ad esempio, come la carenza di ferro e lo stress osmotico, premono l'acceleratore sui geni codificanti le proteine che sintetizzano l'EPS negli *Stafilococchi*, *Streptococchi* ed *Enterococchi*. Il coinvolgimento delle risposte regolatorie dello stress nella formazione del biofilm supporterebbe l'ipotesi che la motivazione dietro al biofilm sia la difesa, ma il contributo di questi regolatori resta oscuro, basato sul complesso background genetico della singola cellula batterica, suggerendo ancora una volta che ciò che chiamiamo biofilm sia in realtà una collezione di differenti stati di crescita<sup>43-45</sup>.

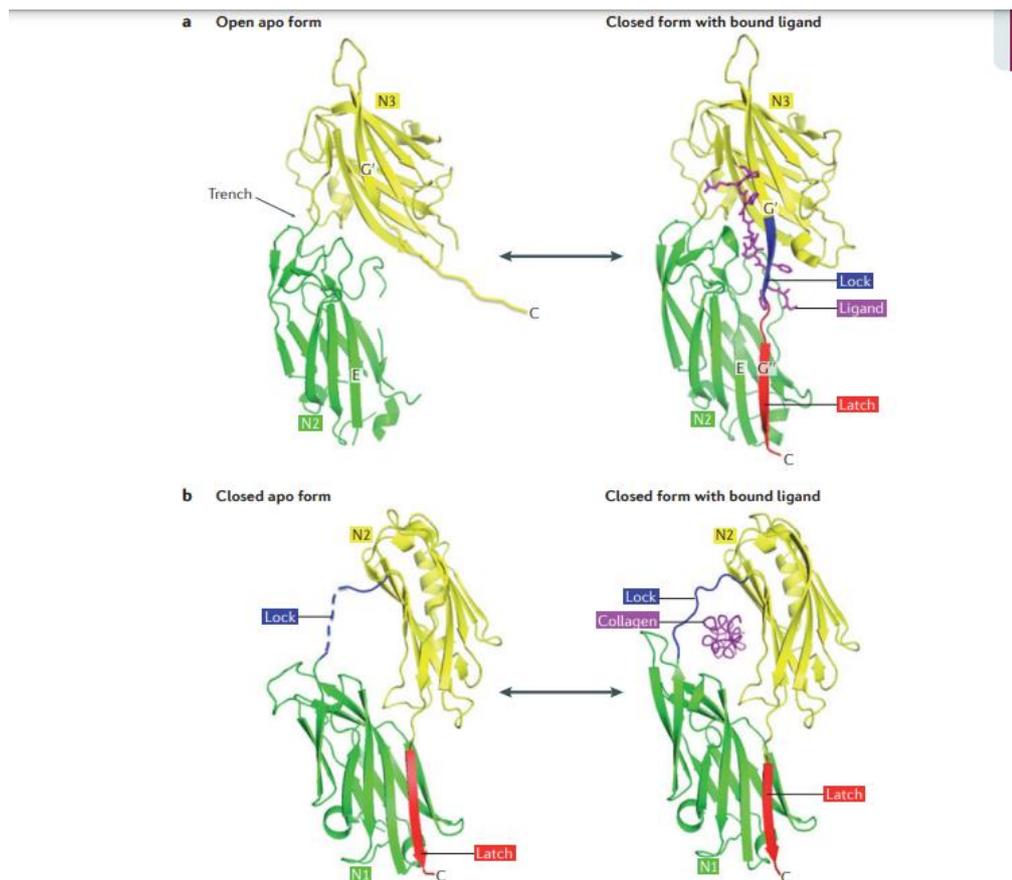
I biofilm sono sicuramente resilienti, ma se la difesa è forza che li guida nella crescita nel corpo umano, allora perché formare una comunità sessile in un posto così inospitale? In sostanza, è evidente che lo stress non è il solo stimolo ad innescare a questa modalità di crescita.



**Dalla semplice difesa di sé stessi alla partecipazione in comunità per rendere l'habitat il più vivibile possibile.**

E' possibile che il biofilm serva come meccanismo per rimanere ospite in un ambiente-nicchia favorevole? Gli esseri umani ed altre specie animali hanno sviluppato un sistema immune intricato per una ragione di importanza critica: i microrganismi tentano continuamente di abitare i loro corpi. Il corpo stesso o almeno parti di esso è ricco di nutrienti e relativamente stabile come ambiente rispetto ai contenuti di acqua, ossigeno e temperatura. Per tali motivi esiste una corsa l'uno contro l'altro dello sviluppo del sistema immune e della progressione delle strategie batteriche per sfuggirgli. In molti casi la natura ha trovato un compromesso e come conseguenza il corpo umano (ad esempio) è abitato da un gran numero di commensali, che potrebbero anch'essi esistere come biofilm. Poiché

il corpo è ovviamente un luogo accattivante dove vivere per un batterio, è possibile che la motivazione primaria per passare alla crescita in modalità biofilm sia stata in realtà proprio la possibilità di rimanere in forma residenziale. I batteri hanno infatti un gran numero di strategie per assicurarsi di rimanere nel corpo umano. Le proteine di superficie che si legano alle proteine di matrice extracellulare dell'ospite come la fibronectina, il fibrinogeno, la vitronectina e l'elastina sono identificate con l'acronimo MSCRAMM (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) e spesso giocano un ruolo chiave per l'adesione iniziale dei batteri a superfici solide all'interno dell'ospite<sup>46,47</sup>. Lo *Stafilococcus aureo* è particolarmente ricco di MSCRAMM, inclusi i fattori di agglomerazione A e B (ClfA/B clumping factors), i fattori leganti la fibronectina A e B (FnBA/B) ed una proteina legante il collagene (Cna).



**La proteina codificata da MSCRAMM di *Stafilococcus Aureo*, essenziale nella capacità legante e di costruzione della matrice del biofilm.**

Lo *Stafilococco epidermidis* a sua volta produce almeno due adesine—autolisine che si legano alla fibronectina e alla proteina legante il fibrinogeno (Fbe). Lo *Streptococco Piogenes* contiene geni per la fibronectina (prtF) e le proteine leganti il fibrinogeno (emm)<sup>48</sup>. Gli streptococchi della bocca si sono evoluti per condizionare il film sulle superfici dentarie composte dalle glicoproteine salivari e dai lipidi. Le proteine leganti le agglutinine salivari (SspA e SspB dello *Streptococco gordonii* e dell'SpaP nello *Streptococco Mutans*) e le proteine leganti l'amilasi di vari streptococchi orali aiutano il legame alla superficie dei denti. Flagelli, pili e fimbrie sono stati anche implicati nelle capacità adesive del *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* e *Salmonella enterica* ed è dimostrato che una volta che il biofilm si è stabilizzato, l'espressione di un certo numero di adesine e fattori della motilità viene soppressa. Questo suggerisce che il ruolo principale di pili, fimbrie e flagelli sia proprio l'adesione iniziale e che una volta che il biofilm ha superato questo stadio tali proteine non sono più necessarie e la loro espressione viene inibita.

Complessivamente, i batteri producono un numero impressionante di adesine, che sembrano essersi evolute proprio allo scopo di abitare il corpo umano. A supporto dell'ipotesi che il biofilm non sia altro che un meccanismo per abitare al meglio questo ambiente favorevole è il riscontro che la regolazione genetica dei cataboliti del carbonio gioca un ruolo critico nella formazione del biofilm. L'espressione dell'esopolisaccaride e l'elaborazione del biofilm sono fortemente accresciuti in alcuni batteri, che includono *Pseudomonas*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, stafilo- e streptococchi ogniqualvolta il glucosio o una differente fonte di carbonio sia ampiamente disponibile. Quando le fonti di nutriente sono ridotte o minime i batteri si staccano e tendono a diventare planctonici, suggerendo che questa situazione funziona da elemento scatenante per muoversi in cerca di un habitat migliore. La produzione di esopolisaccaride indotta dal glucosio potrebbe essere multifunzionale. E' possibile che il glucosio faccia solo da substrato nella sintesi di EPS, ma studi di laboratorio sullo *Stafilococco aureo* suggeriscono che almeno per questo organismo non sia così. In effetti sembra che la disponibilità di glucosio aumenti l'elaborazione dell'EPS a livello della regolazione della

trascrizione genetica, piuttosto che a livello della sintesi dell'EPS stesso. Una seconda possibilità, che supporta la formazione del biofilm come modalità di difesa, è che lo *Stafilococco* possa essersi evoluto in modo da riuscire ad interpretare gli elevati livelli sierici di glucosio come un indizio proveniente dal flusso ematico e che per formare biofilm gli sia necessario rimuovere se stesso dalla circolazione per proteggersi dal sistema immunitario. In alternativa, la produzione del polisaccaride potrebbe funzionare come meccanismo di accumulo del glucosio durante i periodi di abbondanza e/o come meccanismo per aumentarne l'accumulo, in modo tale che quando l'organismo si trova in un ambiente ricco di nutrienti possa andare ad occupare una nicchia ben specifica. E' chiaro che con tutti i complessi meccanismi che i germi patogeni e quelli commensali hanno evoluto per sopravvivere nel corpo umano, i benefici che ottengono devono di necessità superare gli ostacoli imposti dal nostro sistema immunitario.

Dopo l'accoglienza entusiastica della comunità scientifica all'idea che i batteri esistano spesso in forma di biofilm piuttosto che come cellule libere e fluttuanti sono nate altre ipotesi sulla natura del comportamento batterico. Una delle principali di queste teorie è che il biofilm debba essere considerato a tutti gli effetti come un organismo multicellulare e che i batteri al suo interno esistano solo in forma cooperativa ed "altruistica"<sup>49-53</sup>. Per dimostrare queste teorie sono stati fatti alcuni esperimenti chiave sul biofilm, soprattutto per testare se i cosiddetti comportamenti altruistici potessero essere compatibili con l'evoluzione del più adatto (survival of the fittest), di darwiniana memoria. In effetti esistono molte somiglianze fra i batteri nel biofilm e gli organismi multicellulari. In particolare, i batteri (inclusi quelli planctonici), possono percepire ciò che li circonda, il che li rende capaci di adeguare i loro processi metabolici per massimizzare l'uso dei substrati disponibili e proteggersi da condizioni ostili. Quando i batteri crescono all'interno del biofilm, queste modificazioni nell'espressione genetica risultano in una eterogeneità fenotipica, che può essere interpretata come una sorta di specializzazione o divisione del lavoro, simile a quella degli organismi multicellulari. Inoltre, i batteri secernono sostanze indicate come segnali autoinducenti, che

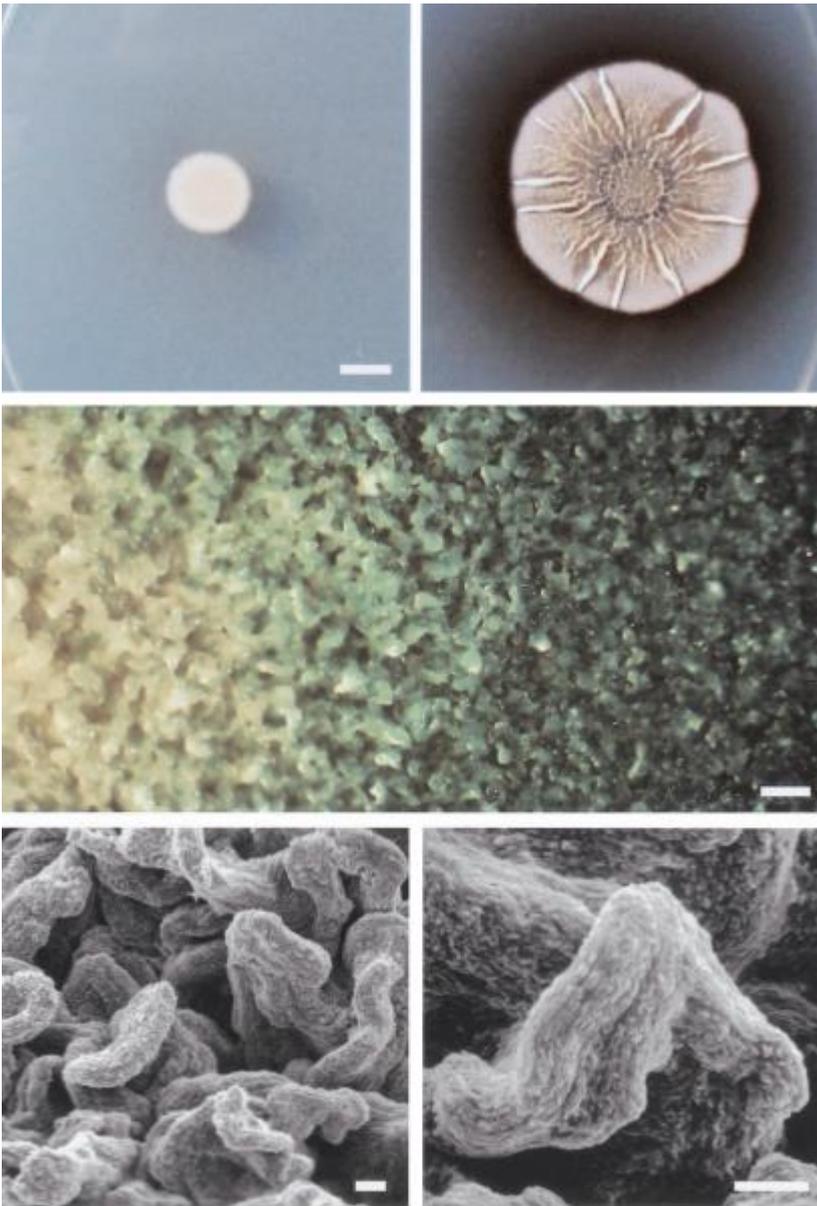
influenzano l'espressione genica stessa e possono essere un mezzo attraverso il quale le cellule comunicano fra loro. C'è inoltre una crescente evidenza che i batteri mostrino comportamenti altruistici e possano andare incontro ad un processo simile alla morte cellulare programmata, anch'esso suggestivo delle multicellularità. Nonostante ciò, esistono alcune distinzioni fondamentali fra i batteri e gli organismi multicellulari. Per esempio, nonostante le cellule batteriche possano reagire ed adattarsi all'ambiente circostante, comunque non si differenziano in modo permanente. Per esempio, si possono isolare cellule epiteliali del colon umano cresciute in un brodo di cultura e anche se le cellule vengono sottoposte a cambiamenti ambientali radicali esse tenderanno comunque a formare un monostrato polarizzato simile a quello del colon. Gli scienziati hanno provato ad ottenere metodi per dedifferenziare le cellule, ma il processo di differenziazione, anche negli organismi multicellulari più semplici, non è facilmente reversibile con mezzi naturali, poiché il pattern di regolazione genica è stato alterato in modo permanente. Al contrario, se si rimuovono delle cellule batteriche da un biofilm e se ne cambiano radicalmente le condizioni circostanti, le cellule si adatteranno rapidamente, mostrando modificazioni fenotipiche. A seconda delle condizioni in cui vengono cresciute, potrebbero addirittura riconvertirsi allo stato planctonico. Le cellule batteriche non si differenziano, al contrario rispondono agli stimoli ambientali adattando la loro espressione genetica per seguire la propria sopravvivenza. Per questa ragione è forse più accurato riferirsi al biofilm come a una comunità interattiva piuttosto che paragonarlo ad un vero organismo multicellulare. Nonostante questo la vita di comunità è probabilmente un'importante motivazione per la formazione del biofilm e fornisce ai suoi membri un certo numero di privilegi. Oltre al vantaggio in termini di resistenza alle modifiche ambientali, il biofilm garantisce la divisione del carico metabolico, il trasferimento genetico ed il comportamento non egoistico. Le limitazioni della diffusione impartite dalla struttura del biofilm risultano in variazioni locali nella disponibilità di nutrienti, nel pH e nella tensione di ossigeno. Perciò i batteri all'interno del biofilm sono inevitabilmente eterogenei rispetto all'espressione genica. Molti biofilm sono costituiti da una varietà di specie ed alcuni contengono batteri misti a funghi. I membri di queste comunità "miste" hanno esigenze differenti e svolgono

differenti funzioni metaboliche, che rendono il commensalismo un fenomeno molto diffuso nei biofilm. Per esempio, mentre i colonizzatori iniziali dell'ambiente orale sono aerobici o anaerobici facoltativi, la limitata diffusione di ossigeno nel biofilm fornisce una nicchia ambientale che permette la colonizzazione tardiva da parte degli anaerobi obbligati. Uno studio ha mostrato che l'eterogeneità genica esiste anche nelle comunità monospecie, il che si traduce presumibilmente in funzioni specializzate all'interno del biofilm stesso.

La formazione dei corpi fruttiferi dei *Myxobatteri* viene frequentemente citata come esempio di specializzazione dei batteri ed è un'idea attraente che questo fenomeno si verifichi in altri batteri. Sebbene non definitivamente provata, l'eterogeneità nei biofilm può a tutti gli effetti essere considerata come una suddivisione di compiti e di certo aumenta l'efficienza metabolica dell'intera popolazione. Un'idea popolare è che tale divisione di compiti sia regolata nei biofilm attraverso la comunicazione intercellulare, da segnali autoinducenti come i lattoni dell'omoserina nei Gram negativi ed i peptidi nei Gram positivi, che, una volta rilasciati dai batteri, indurrano l'espressione genica necessaria<sup>53,54</sup>.

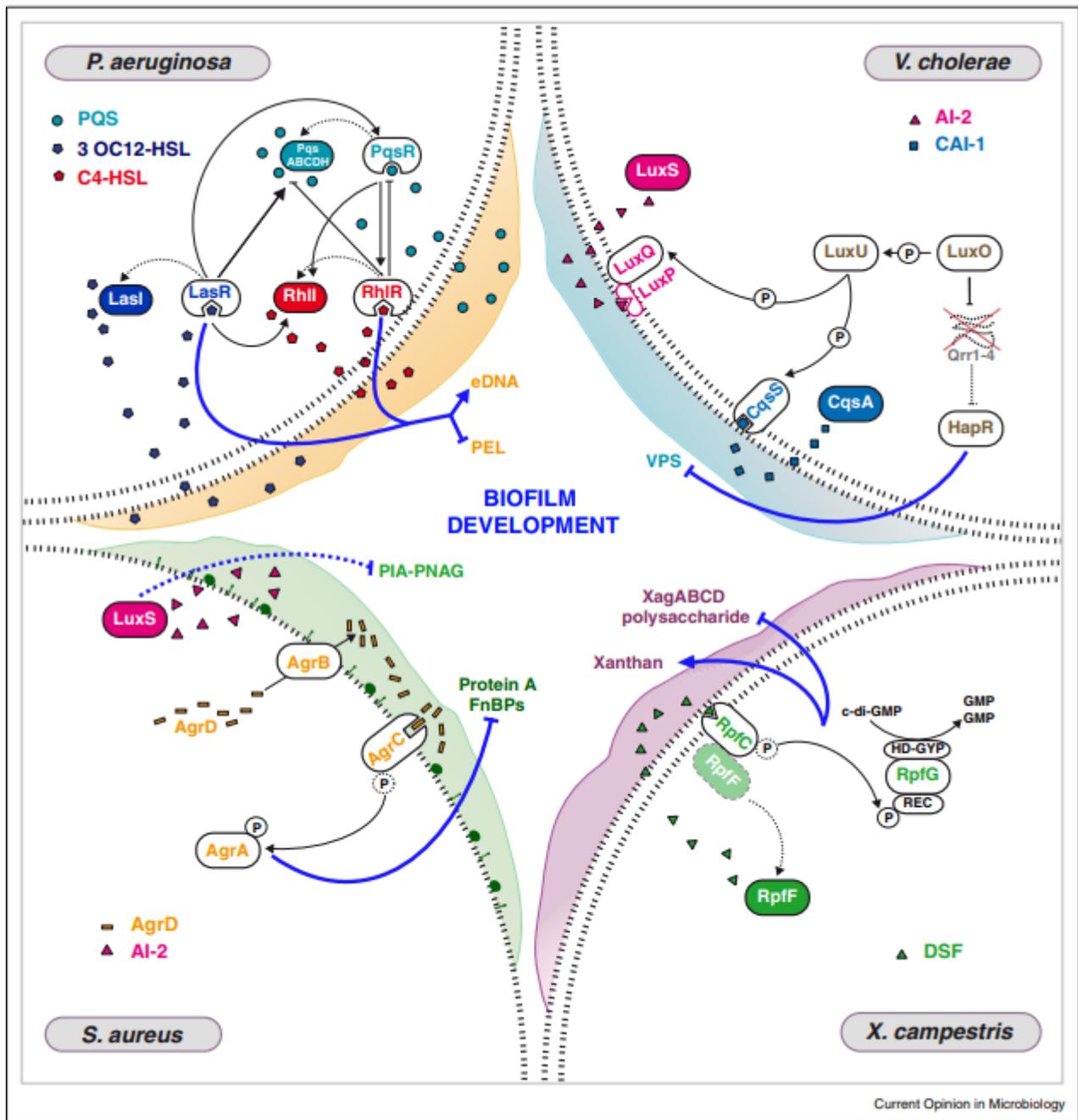
I segnali autoinducenti sono frequentemente indicati come segnali a rilevamento del quorum, perché quando una popolazione raggiunge una densità sufficientemente elevata, le concentrazioni locali raggiungono livelli di soglia ed alterano l'espressione genica.

Esistono comunque esempi di segnali autoinducenti che non si adattano del tutto a questo modello. Il modello senziente suggerisce che il batterio risponda a stimoli lanciati da sé stesso ma sono stati ben documentate anche risposte a stimoli dovuti a specie eterologhe.



La formazione di spore nel *Bacillus subtilis* è stata a lungo studiata come modello di differenziazione cellulare batterica. Quando analizzata nel contesto dei biofilm, è stata mostrata una sua insospettata organizzazione spaziale. Inizialmente, le cellule mobili si differenziano in catene allineate di cellule adesive, che finiscono per produrre strutture aeree i cosiddetti corpi fruttiferi (fruiting bodies), necessari come siti preferenziali di sporulazione. La formazione di questi corpi dipende da geni regolatori che intervengono precocemente nella sporulazione e da geni necessari per la produzione di esopolisaccaride. La formazione delle strutture aeree è abbondante negli isolati naturali ma non nei ceppi di laboratorio, a dimostrare che la multicellularità tende ad essere persa in condizioni di addomesticamento. In alto le piastre di crescita, al centro le colonie dopo un'incubazione di 24 ore ad ingrandimento 18x, in basso la microfotografia che mostra l'estroflessione delle colonie al microscopio elettronico, ingrandimento 600x.

E' probabile che sia il meccanismo diffusione-sensibile che quello quorum-sensibile siano aspetti dell'autoinduzione, ma una risposta precisa che incorpori i ruoli di entrambi non esiste.



Il meccanismo del quorum sensing nelle 4 specie indicate. La funzione principale del quorum sensing è quella di sovraregolare la produzione di DNA extracellulare limitando allo stesso tempo quella di esopolisaccaride. Nel *V. cholerae*, ad esempio, i geni *LuxS* e *CqsA* sintetizzano le proteine AI-2 e CAI-1. Queste molecole di segnale vengono identificate dai loro recettori, componenti delle istidin-chinasi LuxPQ e CqsS. Il legame promuove l'attività fosfatase, con la conseguente iperfosforilazione di LuxO, lo stop alla trascrizione di *Qrr1-4* e l'induzione di HapR, il regolatore principale della trascrizione, che blocca la trascrizione dell'esopolisaccaride nell'operone corrispondente.

In alcune parti del corpo umano poi, specialmente in luoghi come le valvole cardiache e i denti, i biofilm sono soggetti a enormi forze di stiramento, che possono alterare in modo riduttivo la capacità di segnalare mediante autoinduzione. Alcuni lavori recenti hanno documentato come nel polmone umano il segnale basato su acyl-omoserina lattone di *Pseudomonas aeruginosa* venga inattivato da fattori cellulari dell'ospite. Questo indica forse che esiste una sorta di dispensabilità del sistema quorum-sensibile e dunque che *Pseudomonas* può ancora formare biofilm nel polmone umano nonostante l'inibizione di tale meccanismo. Se il sistema immunitario umano scelga proprio questo sistema per colpire il batterio (a suggerire l'importanza del meccanismo nella formazione del biofilm) resta da chiarire.

L'acido nucleico è la base dell'evoluzione e di conseguenza il suo solo vero scopo è quello di replicarsi e perpetuare il proprio specifico codice. Un vantaggio di adattabilità riproduttiva perpetuerà il materiale genetico di un individuo. La stessa regola si applica ad agenti infettanti obbligati come virus e plasmidi. Poiché entrambi non possono replicare il proprio materiale genetico, cesserebbero di esistere senza un modo per diffondersi da un organismo all'altro. Per questo motivo batteriofagi e plasmidi hanno evoluto meccanismi per promuovere il loro mantenimento all'interno di un batterio e da qui diffondersi agli altri<sup>55,56</sup>. Ad esempio, i batteriofagi rallentano la loro macchina replicativa e si integrano nei cromosomi batterici così che il loro genoma possa essere replicato quando la cellula si divide. Tale operazione per il batterio è estremamente costosa ed i plasmidi vengono rapidamente persi a meno che non siano necessari e di beneficio. A tal fine i plasmidi hanno evoluto un complesso metodo per sopravvivere. Portano infatti su di sé delle coppie di geni tossina-antitossina, che rendono il loro mantenimento in vita essenziale per la cellula batterica. La tossina codificata dal plasmide è una proteina stabile, l'antitossina una proteina labile. Quando la cellula batterica si divide, la cellula figlia eredita sia la tossina che l'antitossina. Se la cellula non riesce a replicare il plasmide nel momento della scissione o se il plasmide non viene ereditato, il rifornimento di antossina labile cessa rapidamente mentre la tossina continua a rimanere in situ e distrugge la

cellula priva del plasmide. Questi meccanismi consentono il trasferimento verticale di fagi e plasmidi, ma per funzionare, gli stessi devono potere essere trasferiti anche in modo orizzontale. Il biofilm da questo punto di vista è l'ambiente ideale per lo scambio di materiale genetico. La stretta vicinanza delle cellule fra loro permette una rapida diffusione dei fagi e la coniugazione e l'assorbimento dei plasmidi a Dna da parte dei batteri competenti. Plasmidi e fagi hanno sviluppato successivamente metodi che servono ad indurre la transizione alla modalità biofilm nei loro ospiti, così da potersi diffondere a batteri non infatti e talvolta attraversare la barriera interspecie. E' stato documentato che i pili codificati in un certo numero di plasmidi aderiscono in modo aspecifico alle superfici solide e ad altri batteri, conducendo ad un drammatico incremento della formazione di biofilm sia in *Escherichia coli* che in altri Gram negativi. Allo stesso modo alcuni geni dei fagi, inclusi quelli che codificano le proteine del rivestimento, sono attivati nei biofilm di *Pseudomonas aeruginosa*, il che supporta l'idea che questo sia un meccanismo estremamente efficace. In effetti, va considerato che la formazione del biofilm beneficia non solo della adattatività del batterio ma anche del potenziale proliferativo del batteriofago e dei plasmidi. Il trasferimento orizzontale di materiale genetico all'interno del biofilm può anche beneficiare direttamente i batteri grazie allo scambio delle resistenze antibiotiche. Nello *Streptococcus gordonii*, ad esempio, l'espressione di fattori di competenza è stata implicata come elemento di causa ed effetto sulla formazione del biofilm, a supporto proprio dello scambio di materiale genetico. Resta ancora controverso se la funzione primaria dei fattori di competenza sia di assimilare DNA esogeno per incrementare il patrimonio genetico o semplicemente per usarlo come nutriente, ma il risultato finale è che il biofilm è un ambiente ideale per lo scambio genetico. Pertanto, la motivazione dei batteri stessi (non solo di plasmidi e fagi) basata su questo elemento, potrebbe giocare un ruolo importante nel processo di sviluppo del biofilm.

Complessivamente dunque i batteri ottengono numerosi benefici dalla loro vita di comunità, ma sono davvero capaci di mostrare comportamenti altruistici? In effetti, l'evidenza sperimentale e alcuni modelli matematici supportano l'idea che sia effettivamente così e sebbene questo possa, ad una

prima occhiata, contraddire le leggi della sopravvivenza del più adatto, i modelli predetti indicano che la soppressione dei comportamenti egoistici nel biofilm può incrementare il tasso di crescita globale della specie. In conclusione, i batteri altruistici, nonostante un sacrificio nel tasso di crescita, e a certe condizioni, sono in realtà i più adatti a sopravvivere, I risultati di questi modelli evidenziano però anche un'altra importante condizione. Il comportamento altruistico è più efficiente quando i batteri esistono in forma di piccoli gruppi monoclonali, il che spiegherebbe le microcolonie caratteristiche dei biofilm. L'adattatività non comporta aggressione, le relazioni simbiotiche possono aumentare le difese e le teorie Darwiniane sull'evoluzione basate sulle capacità individuali e la competizione non sembrano, alla fine, essere in contrasto con il comportamento altruistico.

Come già accennato, esiste una crescente evidenza che nei batteri si possa verificare un processo simile all'apoptosi, essendo stati identificati numerosi geni pro-apoptotici come quelli delle caspasi<sup>57-59</sup>. Inoltre, sono stati identificati numerosi esempi di schemi simili a quello tossina-antitossina dei plasmidi, all'interno dei cromosomi di batteri sia Gram positivi che negativi ed è stato suggerito che la morte cellulare programmata possa essere una delle caratteristiche intrinseche del biofilm. Uno dei motivi di questa scelta starebbe proprio nel comportamento altruistico, poiché una riduzione numerica della colonia, su base strategica, permetterebbe un maggior carico metabolico incrementando la disponibilità di nutrienti per i sopravvissuti. Un'ipotesi alternativa è che sistemi come quello tossina-antitossina indurrebbero in una frazione della popolazione batterica, non la morte ma piuttosto uno stato quiescente, che permetterebbe alle cellule di sopravvivere in un ambiente divenuto improvvisamente sfavorevole.

Come detto inizialmente, in laboratorio i batteri tendono a crescere planctonicamente, ma il microcosmo utopico creato nelle piastre di coltura è designato esclusivamente per massimizzare il tasso di crescita della specie, non per replicare la modalità di crescita naturale. In effetti, alcune specie batteriche in natura sembrano utilizzare il biofilm costitutivamente. Gli streptococchi della bocca, per esempio, sono molto adattati alla crescita sessile sulla superficie del dente. La maggior parte dei

batteri orali manca di una nicchia ambientale e viene trovata solo nella bocca. Per questi batteri, la crescita planctonica li renderebbe immediatamente suscettibili alla rimozione da parte della saliva, per essere ingoiati e distrutti dall'acido gastrico, perciò passano la gran parte della loro vita in forma di biofilm. Eppure, in laboratorio, vengono cresciuti proprio nella forma plactonica. E'dunque possibile che basti la presenza di un minimo substrato perché riescano ad aderire e formare un biofilm, difatti è ormai noto che subito dopo l'adesione iniziale nei batteri inizia una vera e propria modificazione della regolazione genica. Questo suggerisce che i batteri percepiscano la superficie solida cui sono adesi e che tale percezione scateni la cascata segnalatoria che condurrà infine all'espressione genica necessaria. E' il caso di quanto visto nella *Pseudomonas Aeruginosa*, dove l'espressione di algC, richiesta per la sintesi di alginato, aumenta pochi minuti dopo l'adesione e quando lo *Stafilococco epidermidis* prende contatto con la superficie solida, le sue cellule normalmente sferiche tendano a formare appendici simili a gambe. Questi riscontri suggeriscono che così come le cellule eucariotiche, le cellule batteriche possano avere sistemi percettivi esterni che inducono segnali intracellulari abbastanza potenti da provocare modificazioni trascrizionali e morfologiche. Questi meccanismi di sensibilità non sono ancora ben compresi. Modificazioni dell'osmolarità percepita causata da cariche sulla superficie solida possono essere un indizio fondamentale per i batteri per riconoscere le superfici.

Il Sistema a due component EnvZ-OmpR (histidin chinasi transmembranaria-regolatore dei geni delle porine di membrana), coinvolto nella sensibilità all'osmolarità ambientale, è noto per essere coinvolto nell'espressione dell'acido colanico e di alcune proteine a base di fibre di amiloide. La superficie fibrillare di quest'ultima gioca un ruolo nell'adesione, mentre l'acido colanico è uno esopolisaccaride coinvolto nell'aggregazione<sup>61,62</sup>. Il ruolo dell'osmolarità nella regolazione del biofilm finora è stato confermato negli Stafilococchi e nella *Pseudomonas fluorescens*. Complessivamente, la crescita come biofilm potrebbe essere il modo di default di almeno alcune specie batteriche, suggerendo che

ci si potrebbe invece chiedere, al contrario del punto di partenza, che cosa scateni la modalità planctonica, piuttosto che quella in biofilm, nello sviluppo di una specie batterica.

## Bibliografia

- 1) Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002;28:12-55. doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x
- 2) de Morais SD, Kak G, Menousek JP, Kielian T. Immunopathogenesis of Craniotomy Infection and Niche-Specific Immune Responses to Biofilm. *Front Immunol*. 2021 Feb 23;12:625467. doi: 10.3389/fimmu.2021.625467. eCollection 2021.
- 3) Saeed K, McLaren AC, Schwarz EM, Antoci V, Arnold WV, Chen AF, Clauss M, Esteban J, Gant V, Hendershot E, Hickok N, Higuera CA, Coraça-Huber DC, Choe H, Jennings JA, Joshi M, Li WT, Noble PC, Phillips KS, Pottinger PS, Restrepo C, Rohde H, Schaer TP, Shen H, Smeltzer M, Stoodley P, Webb JCJ, Witsø E. 2018 international consensus meeting on musculoskeletal infection: Summary from the biofilm workgroup and consensus on biofilm related musculoskeletal infections. *J Orthop Res*. 2019 May;37(5):1007-1017. doi: 10.1002/jor.24229. Epub 2019 Feb 12.
- 4) Glage S, Paret S, Winkel A, Stiesch M, Bleich A, Krauss JK, Schwabe K. A new model for biofilm formation and inflammatory tissue reaction: intraoperative infection of a cranial implant with *Staphylococcus aureus* in rats. *Acta Neurochir (Wien)*. 2017 Sep;159(9):1747-1756. doi: 10.1007/s00701-017-3244-7. Epub 2017 Jun 2
- 5) Fuchs A. Fifty years Antonie van Leeuwenhoek. Its history and its impact. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1984;50(5-6):425-32. doi: 10.1007/BF02386218
- 6) Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS*. 2017 Apr;125(4):272-275. doi: 10.1111/apm.12686

- 7) George A. O'Toole. Classic Spotlight: Before They Were Biofilms. *J Bacteriol.* 2016 Jan 1; 198(1): 5. Published online 2015 Dec 14. doi: 10.1128/JB.00593-15
- 8) de Carvalho CCCR. Marine Biofilms: A Successful Microbial Strategy With Economic Implications. *Front. Mar. Sci.*, 11 April 2018. Volume 5 - 2018 | <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00126>
- 9) J W Costerton, G G Geesey, K J Cheng. How bacteria stick. *Sci Am* 1978 Jan;238(1):86-95. doi: 10.1038/scientificamerican0178-86. PMID: 635520 DOI: 10.1038/scientificamerican0178-86
- 10) Gristina AG, Shibata Y, Giridhar G, Kreger A, Myrvik QN. The glycocalyx, biofilm, microbes, and resistant infection. *Semin Arthroplasty.* 1994 Oct;5(4):160-70
- 11) Saïdi F, Jolivet NY, Lemon DJ, Nakamura A, Belgrave AM, Garza AG, Veyrier FJ, Islam ST. Bacterial glycocalyx integrity drives multicellular swarm biofilm dynamism. *Mol Microbiol.* 2021 Oct;116(4):1151-1172. doi: 10.1111/mmi.14803. Epub 2021 Sep 23.
- 12) Kobayashi H, Watanabe H, Ohgaki N, Takeda H. [Bacterial adhesion and biofilm]. *Nihon Rinsho.* 1994 Feb;52(2):332-8
- 13) Palmer RJ Jr., Stoodley P. Biofilms 2007: Broadened Horizons and New Emphases *J Bacteriol.* 2007 Nov; 189(22): 7948–7960. Published online 2007 Aug 31. doi: 10.1128/JB.00787-07
- 14) Gest H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes Rec R Soc Lond.* 2004 May;58(2):187-201. doi: 10.1098/rsnr.2004.0055
- 15) Marchesi VT. The relevance of research on red cell membranes to the understanding of complex human disease: a personal perspective. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:1-9. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154321

- 16) Neu TR, Kuhlicke U. Matrix glycoconjugate characterization in multispecies biofilms and bioaggregates from the environment by means of fluorescently-labeled lectins. *Front Microbiol.* 2022 Aug 8;13:940280. doi: 10.3389/fmicb.2022.940280. eCollection 2022
- 17) Meiers J, Zahorska E, Röhrig T, Hauck D, Wagner S, Titz A. Directing Drugs to Bugs: Antibiotic-Carbohydrate Conjugates Targeting Biofilm-Associated Lectins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Chem.* 2020 Oct 22;63(20):11707-11724. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00856. Epub 2020 Oct 2
- 18) Singh S, Almuhan Y, Alshahrani MY, Lowman DW, Rice PJ, Gell C, Ma Z, Graves B, Jackson D, Lee K, Juarez R, Koranteng J, Muntaka S, Daniel A Mitchell, da Silva AC, Hussain F, Yilmaz G, Mastrotto F, Irie Y, Williams P, Williams DL, Cámara M, Martínez-Pomares L. Carbohydrates from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms interact with immune C-type lectins and interfere with their receptor function. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2021 Dec 8;7(1):87. doi: 10.1038/s41522-021-00257-w
- 19) R.J. Gibbons. Bacterial Adhesion to Oral Tissues: A Model for Infectious Diseases. *J Dent Res* 1989 68: 750 DOI: 10.1177/00220345890680050101
- 20) Onderdonk, AB Kasper DL, Cisneros RL, Bartlett JG. The Capsular Polysaccharide of *Bacteroides fragilis* as a Virulence Factor: Comparison of the Pathogenic Potential of Encapsulated and Unencapsulated Strains. *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 136, Issue 1, July 1977, Pages 82–89, <https://doi.org/10.1093/infdis/136.1.82>
- 21) Nichols WW, Evans MJ, Slack MP, Walmsley HL. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol.* 1989 May;135(5):1291-303. doi: 10.1099/00221287-135-5-1291.

- 22) Brown ML, Aldrich HC, Gauthier JJ. Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Jan;61(1):187-93. doi: 10.1128/aem.61.1.187-193.1995
- 23) Valle J, Fang X, Lasa I. Revisiting Bap Multidomain Protein: More Than Sticking Bacteria Together. *Front Microbiol.* 2020 Dec 23;11:613581. doi: 10.3389/fmicb.2020.613581. eCollection 2020
- 24) O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:49-79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
- 25) Tran VN, Park S, Khan F, Truong VG, Jeong S, Lee DH, Kim YM, Kang HW. Collective bacterial disinfection by opto-chemical treatment on mature biofilm in clinical endoscope. *J Photochem Photobiol B.* 2022 Jan;226:112367. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112367. Epub 2021 Nov
- 26) Katharios-Lanwermeier S, O'Toole GA. Biofilm Maintenance as an Active Process: Evidence that Biofilms Work Hard to Stay Put. *J Bacteriol.* 2022 Apr 19;204(4):e0058721. doi: 10.1128/jb.00587-21. Epub 2022 Mar 21
- 27) Kaźmierczak N, Grygorcewicz B, Piechowicz L. Biofilm Formation and Prevalence of Biofilm-Related Genes Among Clinical Strains of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist.* 2021 Jul;27(7):956-964. doi: 10.1089/mdr.2020.0399. Epub 2021 Mar 3
- 28) Kaviar VH, Khoshnood S, Asadollahi P, Kalani BS, Maleki A, Yarahmadi S, Pakzad I. Survey on phenotypic resistance in *Enterococcus faecalis*: comparison between the expression of biofilm-associated genes in *Enterococcus faecalis* persister and non-persister cells. *Mol Biol Rep.* 2022 Feb;49(2):971-979. doi: 10.1007/s11033-021-06915-8. Epub 2021 Nov 9

- 29) Omid M, Firoozeh F, Saffari M, Sedaghat H, Zibaei M, Khaledi A. Ability of biofilm production and molecular analysis of spa and ica genes among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Res Notes*. 2020 Jan 7;13(1):19. doi: 10.1186/s13104-020-4885-9
- 30) Zhou M, Xu Y, Ouyang P, Ling J, Cai Q, Huang L, Zhou X, Zheng L. Evolution and distribution of resistance genes and bacterial community in water and biofilm of a simulated fish-duck integrated pond with stress. *Chemosphere*. 2020 Apr;245:125549. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125549. Epub 2019 Dec 16
- 31) Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Aug 11;14(9):563-75. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94
- 32) Frei E, Hodgkiss-Harlow K, Rossi PJ, Edmiston CE Jr, Bandyk DF. Microbial pathogenesis of bacterial biofilms: a causative factor of vascular surgical site infection. *Vasc Endovascular Surg*. 2011 Nov;45(8):688-96. doi: 10.1177/1538574411419528. Epub 2011 Sep 15
- 33) Di Perri G, Ferlazzo G. Biofilm Development and Approaches to Biofilm Inhibition by Exopolysaccharides. *New Microbiol*. 2022 Dec;45(4):227-236. Epub 2022 Oct 3
- 34) Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018 Jan 1;9(1):522-554. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372
- 35) Le Mauff F. Exopolysaccharides and Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2020;425:225-254. doi: 10.1007/82\_2020\_199
- 36) Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology (Reading)*. 2001 Jan;147(Pt 1):3-9. doi: 10.1099/00221287-147-1-3

- 37) Hazlett KR, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Inactivation of the *gbpA* gene of *Streptococcus mutans* alters structural and functional aspects of plaque biofilm which are compensated by recombination of the *gtfB* and *gtfC* genes. *Infect Immun*. 1999 Aug;67(8):3909-14. doi: 10.1128/IAI.67.8.3909-3914.1999
- 38) Matsumi Y, Fujita K, Takashima Y, Yanagida K, Morikawa Y, Matsumoto-Nakano M. Contribution of glucan-binding protein A to firm and stable biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol*. 2015 Jun;30(3):217-26. doi: 10.1111/omi.12085. Epub 2014 Nov 10
- 39) Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Mar;268(2):158-65. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00576.x. Epub 2006 Dec 1
- 40) Banas JA, Hazlett KR, Mazurkiewicz JE. An in vitro model for studying the contributions of the *Streptococcus mutans* glucan-binding protein A to biofilm structure. *Methods Enzymol*. 2001;337:425-33. doi: 10.1016/s0076-6879(01)37031-3
- 41) McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015 Jan 28;5:1. doi: 10.3389/fcimb.2015.00001. eCollection 2015
- 42) Ahmad S, Rahman H, Qasim M, Nawab J, Alzahrani KJ, Alsharif KF, Alzahrani FM. *Staphylococcus epidermidis* Pathogenesis: Interplay of *icaADBC* Operon and MSCRAMMs in Biofilm Formation of Isolates from Pediatric Bacteremia in Peshawar, Pakistan. *Medicina (Kaunas)*. 2022 Oct 24;58(11):1510. doi: 10.3390/medicina58111510
- 43) O'Connor A, McClean S. The Role of Universal Stress Proteins in Bacterial Infections. *Curr Med Chem*. 2017 Nov 24;24(36):3970-3979. doi: 10.2174/0929867324666170124145543

- 44) Alshalchi SA, Anderson GG. Involvement of stress-related genes *polB* and *PA14\_46880* in biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 2014 Nov;82(11):4746-57. doi: 10.1128/IAI.01915-14. Epub 2014 Aug 25
- 45) Davis RT, Brown PD. *spoT*-mediated stringent response influences environmental and nutritional stress tolerance, biofilm formation and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *APMIS*. 2020 Jan;128(1):48-60. doi: 10.1111/apm.13006
- 46) Motallebi M, Alibolandi Z, Aghmiyuni ZF, van Leeuwen WB, Sharif MR, Moniri R. Molecular analysis and the toxin, *MSCRAMM*, and biofilm genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from pemphigus wounds: A study based on *SCCmec* and *dru* typing. *Infect Genet Evol*. 2021 Jan;87:104644. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104644. Epub 2020 Nov 24
- 47) Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Jan;12(1):49-62. doi: 10.1038/nrmicro3161
- 48) Magalhães RP, Vieira TF, Fernandes HS, Melo A, Simões M, Sousa SF. The Biofilms Structural Database. *Trends Biotechnol*. 2020 Sep;38(9):937-940. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.04.002. Epub 2020 May 5
- 49) Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)*. 2005 Feb;70(2):267-74. doi: 10.1007/s10541-005-0111-6
- 50) Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. Social Behavior of Antibiotic Resistant Mutants Within *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Communities. *Front Microbiol*. 2019 Mar 22;10:570. doi: 10.3389/fmicb.2019.00570. eCollection 2019
- 51) Kreft JU. Biofilms promote altruism. *Microbiology (Reading)*. 2004 Aug;150(Pt 8):2751-2760. doi: 10.1099/mic.0.26829-0

- 52) Caldwell DE, Costerton JW. Are bacterial biofilms constrained to Darwin's concept of evolution through natural selection? *Microbiologia*. 1996 Sep;12(3):347-58
- 53) Hense BA, Schuster M. Core principles of bacterial autoinducer systems. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015 Mar;79(1):153-69. doi: 10.1128/MMBR.00024-14
- 54) Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*. 2014 Apr;18:96-104. doi: 10.1016/j.mib.2014.02.008. Epub 2014 Mar 20
- 55) Łusiak-Szelachowska M, Weber-Dąbrowska B, Górski A. Bacteriophages and Lysins in Biofilm Control. *Virol Sin*. 2020 Apr;35(2):125-133. doi: 10.1007/s12250-019-00192-3. Epub 2020 Mar 3
- 56) Obeng N, Pratama AA, Elsas JDV. The Significance of Mutualistic Phages for Bacterial Ecology and Evolution. *Trends Microbiol*. 2016 Jun;24(6):440-449. doi: 10.1016/j.tim.2015.12.009. Epub 2016 Jan 27
- 57) Allocati N, Masulli M, Di Ilio C, De Laurenzi V. Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. *Cell Death Dis*. 2015 Jan 22;6(1):e1609. doi: 10.1038/cddis.2014.570
- 58) Bayles KW. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Sep;5(9):721-6. doi: 10.1038/nrmicro1743
- 59) Li T, Zhai S, Xu M, Shang M, Gao Y, Liu G, Wang Q, Zheng L. SpxB-mediated H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> induces programmed cell death in *Streptococcus sanguinis*. *J Basic Microbiol*. 2016 Jul;56(7):741-52. doi: 10.1002/jobm.201500617. Epub 2016 Feb 16
- 60) Gueguen E, Durand E, Zhang XY, d'Amalric Q, Journet L, Cascales E. Expression of a *Yersinia pseudotuberculosis* Type VI Secretion System Is Responsive to Envelope Stresses through

the OmpR Transcriptional Activator. PLoS One. 2013 Jun 19;8(6):e66615. doi: 10.1371/journal.pone.0066615. Print 2013

61) May T, Okabe S. Escherichia coli harboring a natural IncF conjugative F plasmid develops complex mature biofilms by stimulating synthesis of colanic acid and Curli. J Bacteriol. 2008 Nov;190(22):7479-90. doi: 10.1128/JB.00823-08. Epub 2008 Sep 12

62) Murakami K, Nasu H, Fujiwara T, Takatsu N, Yoshida N, Furuta K, Kaito C. The Absence of Osmoregulated Periplasmic Glucan Confers Antimicrobial Resistance and Increases Virulence in Escherichia coli. J Bacteriol. 2021 May 20;203(12):e0051520. doi: 10.1128/JB.00515-20. Epub 2021 Apr 12.

## **Capitolo VII: Dalla teoria alla pratica, una visione d'insieme della complessa interazione fra biofilm e protesi nella medicina moderna**

Se la teoria di come il biofilm batterico nasce e si evolve è sicuramente interessante dal punto di vista biologico, l'impatto clinico della formazione di questo complesso ambiente che rende ai batteri vita facile all'interno degli organismi viventi superiori è il suo immediato riscontro nella vita di tutti i giorni. Perché conoscere le capacità e l'anatomia stessa del biofilm batterico è divenuto così fondamentale? La risposta è semplice e va cercata nell'enorme e progressivamente crescente numero di materiali protesici impiantati ogni anno in tutto il mondo. Una volta considerato che ognuno di questi impianti è a rischio di incontrare un batterio capace di formare un biofilm e che almeno da 3 a 5 protesi ogni 100 dovrà per questo motivo essere sottoposta a revisione o addirittura ad espanto, le dimensioni del problema diventano evidenti a chiunque<sup>1</sup>.

Gli impianti medici sono costituiti da una moltitudine di materiali differenti e il loro scopo è quello di restare all'interno del corpo umano per motivi diagnostici, terapeutici e riabilitativi. I benefici che questi dispositivi offrono sono in costante espansione e ci si aspetta che la domanda di impianti continui ad aumentare ad un tasso "furioso", in relazione all'incremento dell'età media della popolazione, per lo meno nel mondo occidentale. E' stato stimato che nei soli Stati Uniti e nel solo 2018, il mercato delle protesi abbia raggiunto un valore di 90 miliardi di dollari, mentre le previsioni di mercato per il quinquennio 2019-2024 prevedono un tasso di crescita annuale del 6.3%, cosicché nel 2025 si dovrebbe essere arrivati alla cifra di 140 miliardi di dollari, vicina al raddoppio della precedente. Fra i dispositivi più usati vi sono sicuramente quelli intravascolari, con una stima di circa 5 milioni inseriti ogni anno negli USA, seguiti dagli impianti ortopedici (600.000 all'anno), dentali (500.000) e cardiovascolari (400,000)<sup>2,3</sup>.

L'uso di questi strumenti ha migliorato il trattamento di innumerevoli patologie e pertanto la qualità di vita dei pazienti. Nonostante ciò le infezioni nosocomiali associate agli impianti e principalmente biofilm-correlate, rappresentano una delle maggiori preoccupazioni per la salute a livello mondiale,

con sostanziali conseguenze cliniche ed economiche. E' stato calcolato che i batteri nei biofilm siano fino a 1000 volte più resistenti di quelli planctonici, divenendo pertanto la causa principale di infezioni croniche persistenti, che a loro volta alterano il benessere degli individui ed incrementano i costi di trattamento per i sistemi sanitari nazionali<sup>4,5</sup>.

Un aspetto essenziale e purtroppo assai problematico della diagnosi di un'infezione biofilm-correlata di un impianto protesico sta però proprio nella difficoltà della diagnosi microbiologica.

Il metodo convenzionale di effettuare colture microbiche utilizzando campioni di tessuto o di fluido vicini al sito di infezione di un impianto in questi casi è spesso fallace o può dare risultati confondenti.

Un approccio più efficace, che può essere però applicato solo quando l'impianto viene rimosso, è la sonicazione dell'impianto stesso, per spostare il biofilm dalla superficie e disperdere le cellule nel fluido sonicato<sup>6</sup>. La coltura del fluido sottoposto a sonicazione ha una sensibilità molto più elevata rispetto ai metodi tradizionali, perché nelle infezioni associate al biofilm le cellule infette vengono trattenute nella matrice e la dispersione di quest'ultima ne incrementa l'identificazione. In effetti, l'uso dei sistemi tradizionali di coltura non è sempre indicativo della crescita del biofilm: un risultato negativo non indica necessariamente l'assenza di infezione, potrebbe semplicemente essere dovuto ad un tasso di crescita estremamente lento, il che è anche il motivo per cui, in caso di uso delle metodiche standard, molti laboratori sono ormai attrezzati per procedere con la coltura per almeno 10-14 giorni. Gli avanzamenti nei metodi di sequenziazione, come quella del gene 16SrRNA o la sequenziazione metagenomica (sequenziamento del genoma di microrganismi di uno stesso luogo, la cui analisi viene effettuata nel proprio habitat naturale) sono ormai spesso utilizzate per identificare questi complessi patogeni, fornendo dati che ne descrivono la composizione e funzione in siti multipli del corpo umano<sup>7-9</sup>. Sotto questo aspetto, sono molte le tecniche di coltura indipendenti che possono essere impiegate. L'elettroforesi a gradiente gel denaturante è una di queste. Viene eseguita tramite un gel di poliacrilammide che contiene concentrazioni ad incremento lineare di un agente denaturante, che serve a separare i DNA ribosomiali che hanno la stessa dimensione ma diversa frequenza. Il

polimorfismo di lunghezza del frammento di restrizione terminale è invece basato sulle differenze ottenute con un singolo enzima di restrizione (enzimi che riconoscono particolari sequenze di DNA e le scindono, separando un filamento di DNA in due ovunque trovino le sequenze che sono state codificate per riconoscere) ottimizzato al taglio del gene 16S rRNA. La sequenziatura diretta del gene 16S rRNA può identificare una singola specie batterica, ma negli ultimi anni, grazie al miglioramento delle tecniche, è diventato possibile analizzare un mix che include centinaia di differenti RNA transfer di una comunità batterica, così da isolare batteri differenti e le loro quantità relative nella comunità. Questo passo è essenziale, ovviamente, per iniziare un trattamento antibiotico ottimizzato ed efficace.

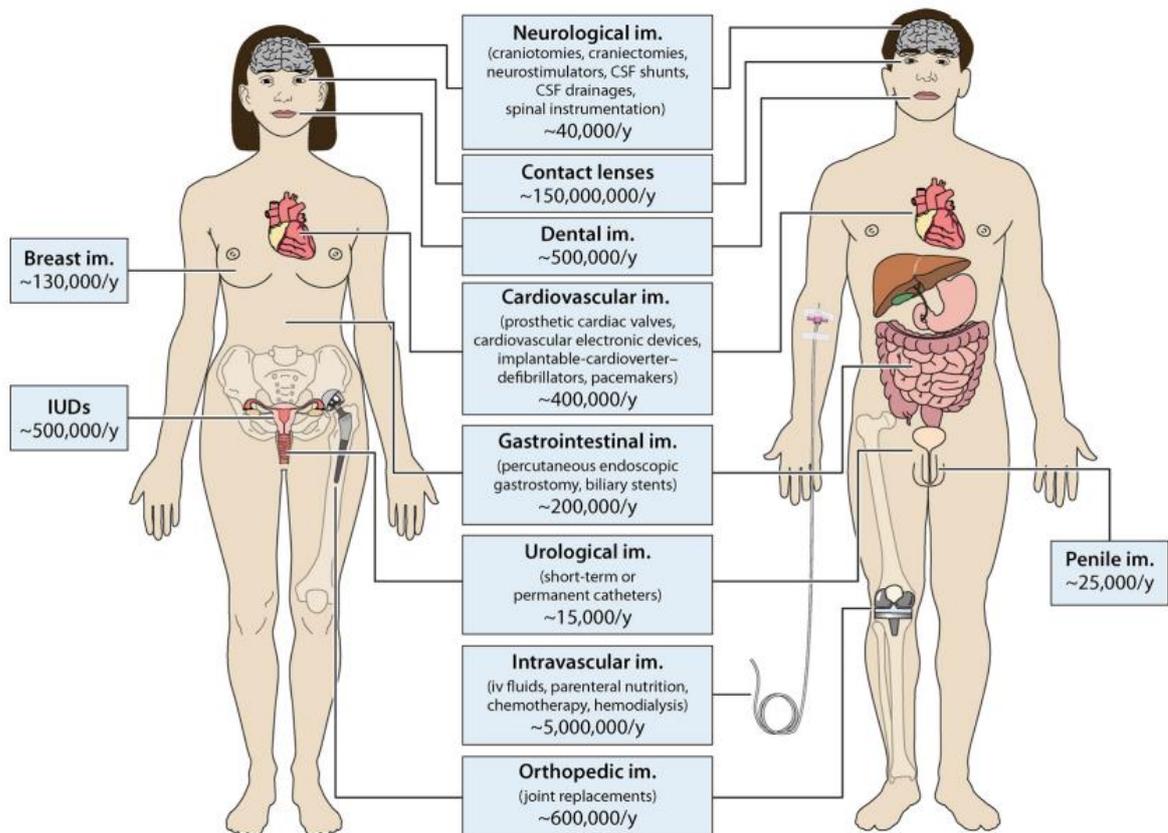
L'infezione protesica tende a presentarsi per lo più secondo due modalità: immediatamente (entro due settimane) dalla procedura chirurgica primaria, oppure a distanza (da alcuni mesi ad anni). Le ragioni che la causano sono state ricercate in varie possibili cause, che includono: 1) la contaminazione della superficie dell'impianto al momento della manipolazione della protesi stessa; 2) la contaminazione della sala operatoria, dell'equipaggiamento chirurgico o ad opera del chirurgo stesso, ovviamente senza sua consapevolezza; 3) un'infezione di cui il paziente è già portatore, nota e ritenuta sotto controllo o ignota al momento dell'impianto o dovuta a successivi fattori specifici (ad esempio depressione del sistema immunitario), che possono intervenire o modificarsi in una fase successiva all'impianto; 4) l'uso di disinfettanti contaminati; 5) l'infezione ad opera di altre persone. Oltre alla malnutrizione ed all'obesità, pazienti con condizioni come l'artrite reumatoide, il diabete mellito e gli stati di immunodeficienza acquisita sono ovviamente più a rischio di infezione. Come già anticipato inizialmente una metodologia comune in questi casi, laddove l'infezione si mostri resistente alle tecniche convenzionali di trattamento antibiotico a breve e lungo termine, consiste nella revisione chirurgica in 2 momenti. Dapprima si rimuove l'impianto e si cura l'infezione, poi si posiziona un nuovo impianto.

Per questo motivo, comprendere le cause della formazione del biofilm e la sua prevenzione è uno dei campi di ricerca più importanti nel campo dei dispositivi medici impiantabili. Lo stadio iniziale della formazione del biofilm richiede l'adesione dei microbi alla superficie dell'impianto e la proliferazione delle cellule. Durante la formazione del biofilm numerosi fattori sono responsabili dell'adesione iniziale, come la polarità, le forze di van der Waals e le interazioni idrofobiche. La struttura meglio nota come Polisaccaride A conduce all'adesione di partenza ed alla formazione di un tessuto mucillaginoso. Ad esempio nel caso dello *Stafilococco epidermidis* l'adesione alla superficie viene mediata da un'autolisina e da una proteina nota come BAP<sup>12,13</sup>. L'adesione del batterio alla superficie inerte conduce alla formazione di una microcolonia stabile sulla protesi. La proliferazione batterica e l'adesione intercellulare divengono progressivamente più importanti. In questo stadio, un polisaccaride di adesione intercellulare (PIA) ottimizza l'accumulo del biofilm, i microbi si moltiplicano e formano numerosi strati di cellule agglomerate sulla superficie del corpo estraneo<sup>14-16</sup>. Le microcolonie si trasformano poi in macrocolonie, racchiuse dalla matrice polisaccaridica extracellulare (EPS), che agisce come barriera e protegge i microbi dalle condizioni avverse. All'interno della matrice comincia a questo punto il quorum sensing, che controlla a sua volta l'adesione ed il distacco dei batteri dal biofilm. Studi sullo *Stafilococco aureo* hanno mostrato che, una volta raggiunta la massa critica, il biofilm comincia a generare microrganismi planctonici, che si allontanano dalla fonte e colonizzano le superfici adiacenti all'impianto o nuove aree dell'impianto stesso. Queste cellule batteriche divengono inattive o muoiono per carenza di nutrienti, riduzione del pH o accumulo di sottoprodotti metabolici tossici. In questa fase il biofilm è divenuto maturo. Le cellule batteriche disperse dal biofilm possono migrare nel flusso ematico, diffondendo l'infezione in altri distretti. Il distacco può essere dovuto a vari fattori, inclusa la dinamica dei fluidi e l'effetto di stiramento della massa. La modalità di dispersione cellulare differisce a seconda del batterio ed altera le caratteristiche morfologiche degli organismi. La *Pseudomonas fluorescens* si disperde e ricolonizza una superficie in circa 5 ore, il *Vibrio paraemoliticus* in 4, il *Vibrio harveyi* in 2 ore e 32 minuti. Questo processo pavimenta per le cellule il sentiero necessario a migrare da aree fortemente colonizzate, con

scarsi nutrienti, a superfici ricche degli stessi, e i nuovi aggregati batterici manterranno alcune caratteristiche e proprietà antibatteriche del biofilm. Le cellule che si sono sganciate a causa di condizioni non desiderabili tornano rapidamente indietro e fluttuano liberamente in superficie. Alcune di esse tendono a riallocarsi e a re-iniziare il ciclo di formazione del biofilm. In ogni caso, grazie alla modificata fisiologia batterica nel biofilm, il sistema immune e gli antibiotici non riescono ad eradicare le cellule intrappolate dal biofilm, cosicchè l'infezione diviene cronica. Inoltre, le cellule nel biofilm elicitano una risposta infiammatoria minore rispetto a quelle planctoniche, il che può rendere estremamente difficile la diagnosi di infezione.

Considerato quanto esposto, è facile comprendere come l'infezione da biofilm di un impianto sia una causa maggiore di fallimento dello stesso. Tutte le protesi mediche sono suscettibili alla colonizzazione e le stesse sono responsabili da sole di una percentuale compresa fra il 60 ed il 70% delle infezioni nosocomiali, particolarmente nel paziente cronicamente malato. Caratteristica tipica per le protesi è la colonizzazione contemporanea dell'impianto e della superficie dei tessuti adiacenti<sup>18,19</sup>. Una volta consolidatasi, l'infezione conduce alla distruzione dei tessuti, alla disseminazione sistemica del patogeno, alla disfunzione dell'impianto, determinando malattia grave e perfino morte. Come già detto, gli organismi principali responsabili delle infezioni protesiche appartengono alla famiglia dei Gram positivi (*Stafilococco aureo* ed *epidermidis*, *Enterococco fecale*, *Streptococco viridans*), seguiti da alcuni Gram negativi (*Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*). Un esempio interessante di come i batteri si comportino è mostrato dagli impianti in titanio affetti da biofilm da *Stafilococco epidermidis*. In questo caso i batteri vengono facilmente trovati nel tessuto circostante e colocalizzati sui macrofagi. In tali condizioni la messa in coltura mostra che molti dei batteri sono vitali e particolarmente attivi, perciò l'impianto contaminato funge da reservoir per infettare il tessuto circostante, dove i batteri possono risiedere intracellularmente. La diluita suscettibilità dei batteri sessili e la scarsa penetrazione degli antibiotici, a causa dalla mancanza di vascolarizzazione della protesi e della impoverita

vascularizzazione periprotetica (che rende la periferia dell'impianto estremamente vulnerabile all'azione colonizzatoria), fanno sì che gli antibiotici siano parzialmente efficaci solo se somministrati in terapia massimale e per periodi di tempo prolungati, senza alcuna possibilità che l'infezione venga effettivamente debellata. La mucillagine batterica infesta l'intero dispositivo, per cui il modo più semplice di trattarne l'infezione è quello di modificare la superficie del dispositivo stesso. Infezioni di questo genere sono state osservate su praticamente tutti i tipi di protesi, incluse le valvole artificiali, gli impianti di anca, femore, ginocchio, spalla, i cateteri intravascolari, le pompe, gli stimolatori ventricolari sinistri, i pace-maker, le derivazioni liquorali, i cateteri urinari, le protesi oculari, le lenti a contatto, i dispositivi contraccettivi intra-uterini<sup>19,20</sup>.



Una stima dei dispositivi mediamente impiantati in modo temporaneo o permanente ogni anno, nei soli Stati Uniti

Nei dispositivi non permanenti, il punto di colonizzazione del biofilm può originare dalla cute circostante il punto di inserzione o l'area circostante la porzione iniziale del catetere impiantato. Per i dispositivi permanenti al contrario, sono il danno tissutale e la formazione del coagulo legati alla procedura di inserimento che aumentano i tassi di colonizzazione. Dopo l'impianto si innesca una competizione fra il processo di integrazione del materiale nei tessuti circostanti e l'adesione dei batteri alla superficie dello stesso. Perché quest'ultima funzioni l'integrazione senza complicanze con il tessuto dell'ospite dovrebbe avere luogo prima che l'aderenza batterica divenga significativa, prevenendo pertanto la colonizzazione. Dopo aver aderito adeguatamente alla superficie, il batterio comincia da un lato a secernere dall'altro a raccogliere proteine, polisaccaridi e DNA, per creare il biofilm ottimale per sé stesso e l'ambiente.

Di seguito viene fornita una descrizione in maggiore dettaglio di quanto noto a riguardo delle infezioni di impianti per le singole specialità.

**Impianti cardiovascolari:** Vengono comunemente utilizzati per pazienti con patologie cardiache associate all'insufficienza di pompa. Comprendono pacemakers, defibrillatori impiantabili cardiovertitori e protesi valvolari<sup>22,23</sup>. Il loro numero in particolare è in costante aumento ma la maggior parte di essi viene rimpiazzato a causa di malfunzioni e, soprattutto, di infezioni. Si stima che il tasso di infezione annuale di queste protesi sia compreso fra l'1.2 and 2.4% del totale degli impianti, tasso che sale fino a 10 volte dopo la sostituzione del dispositivo iniziale o quella di un suo surrogato tecnologicamente più avanzato. Le infezioni che si verificano entro i primi 12 mesi dall'intervento sono dovute in modo predominante ad una colonizzazione al momento dell'atto chirurgico e il 25% di queste infezioni si manifesta entro il primo mese dall'impianto<sup>24</sup>. In particolare le infezioni dei sistemi di cardioversione sono gravate da alta morbilità e mortalità, specialmente quando esistono importanti comorbidità, insieme a spese sanitarie elevatissime. I microbi identificati più frequentemente sugli impianti o nelle tasche sottocutanee degli stimolatori sono rappresentati dagli *Stafilococchi coagulasi negativi* (fra il 60 e l'80% del totale) e lo *Stafilococco aureo* (dall'11 al

29%). Sono rilevati in percentuali nettamente inferiori *Enterococco*, *Streptococco*, *Haemofilus*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella*, nonché alcuni funghi, soprattutto *Candida albicans*<sup>25</sup>. Nei defibrillatori e nei pacemaker la colonizzazione polimicrobica occupa una nicchia che vale fra l'1 ed il 7% del totale dei dispositivi, sebbene la composizione di questi mix non sia stata sufficientemente investigata in letteratura da scoprire un pattern comune. I pazienti con possibili infezioni degli stimolatori elettrici vengono regolarmente sottoposti ad emocolture per identificare sia aerobi che anaerobi, perché lo *Stafilococco aureo meticillino-resistente* resta il principale contaminante<sup>26</sup>. In queste situazioni solitamente la vancomicina è l'antibiotico di scelta iniziale. Una volta che il contaminante è stato identificato, si esegue una cura mirata per 10-14 giorni poi il dispositivo viene sostituito. Per ridurre il rischio di recidiva di infezione sono stati utilizzati la profilassi antibiotica e involucri antibatterici coprenti la superficie dell'impianto<sup>27,28</sup>. Ad esempio, l'uso di una mesh in polipropilene a rilascio di minociclina e rifampicina si è mostrato efficace, ad una prima valutazione, nel ridurre l'incidenza delle infezioni degli stimolatori. Anche patogeni orali in grado di causare periodontiti, come lo *Streptococco mutans*, potrebbero raggiungere le valvole cardiache passando per il flusso ematico e causando infezione<sup>29</sup>. Sebbene una buona igiene orale in un soggetto sano sia sufficiente ad eliminare il problema, i pazienti ad alto rischio di endocardite dovrebbero essere al contrario sottoposti ad una profilassi prima di qualunque procedura odontoiatrica. In questi casi l'amoxicillina viene normalmente suggerita come antibiotico di scelta. Nonostante l'importanza clinica delle infezioni associate a questi sistemi, si conosce molto poco della crescita dei biofilm sugli stessi<sup>30,31</sup>. Qualche evidenza viene dagli studi in vitro su isolati clinici. In particolare, ceppi di cutibatterio (*Propionibacterium acnes*) isolati dalla superficie di pacemakers espuntati da pazienti senza segni clinici di infezione, hanno mostrato la crescita in biofilm<sup>31</sup>. Inoltre l'uso della microscopia elettronica ha confermato la presenza di materiale citoplasmatico e di una matrice fibrosa di DNA extracellulare (eDNA) in questi biofilm, suggerendo che l'eDNA possa giocare un ruolo perlomeno nell'iniziare o nello stabilizzare i biofilm sui pacemakers<sup>32</sup>.

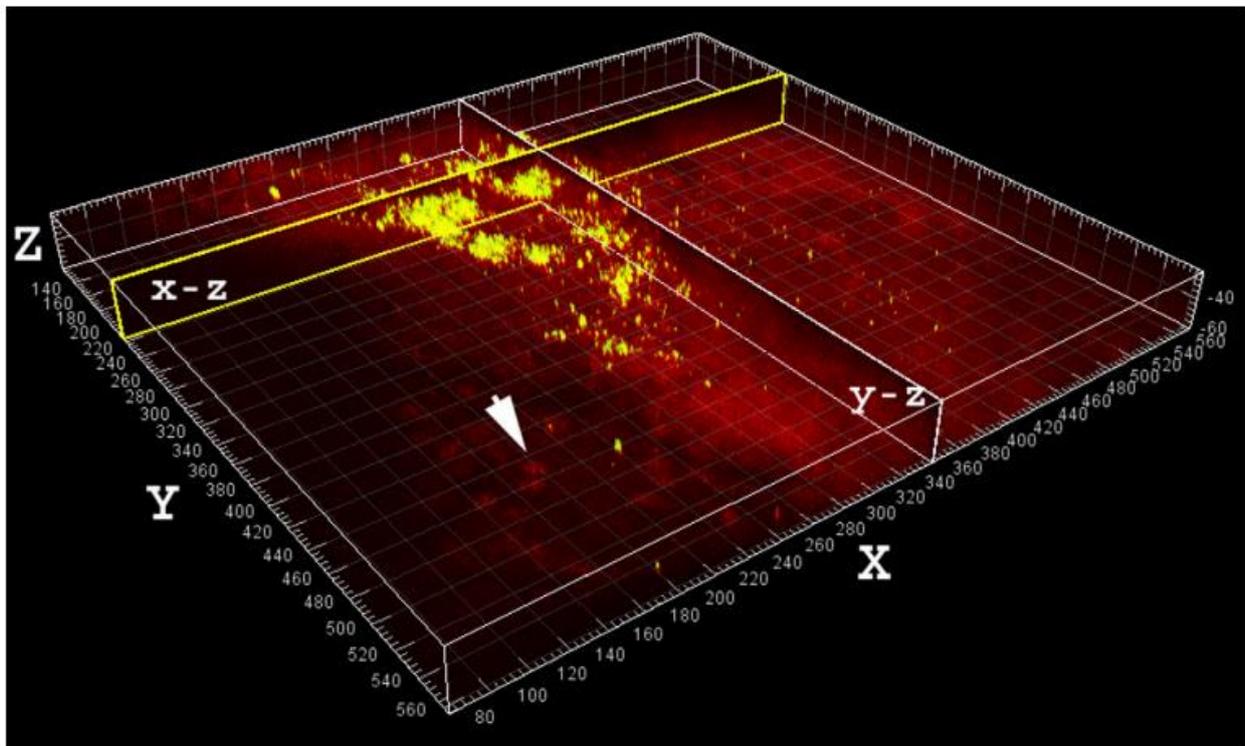
**Impianti gastrointestinali:** La gastrostomia percutanea (PEG) è la via più comune di accesso per la nutrizione enterale sia nella popolazione pediatrica che in quella adulta<sup>34</sup>. D'altra parte, i tubi per PEG sono stati riconosciuti come fattori di rischio per la colonizzazione gastrointestinale e la formazione di biofilm da parte di batteri antibiotico-resistenti in Istituti di cura a lungo termine<sup>35</sup>. Tutti gli studi condotti su tubi da PEG hanno sempre rivelato la presenza di biofilm batterici e fungini, nonostante la loro presenza non fosse stata la causa della rimozione. In uno degli studi più ampi mai eseguiti (Dauntle e collaboratori) è stato analizzato il microbiota associato ai tubi di silicone usati per un periodo di 3-47 mesi per la nutrizione enterale in età pediatrica (da 6 mesi a 17 anni)<sup>36</sup>. Tutti gli impianti mostravano la presenza di biofilms, con 24 specie batteriche identificate, incluso *Bacillus subtilis*, *Enterococco*, *Stafilococco*. In questo studio, le misure alla microscopia elettronica mostravano che i difetti sulla superficie dei tubi PEG divenivano siti protetti per l'adesione iniziale e lo sviluppo successivo del biofilm stesso. In uno studio successivo, dei tubi PEG venivano rimossi da 12 pazienti dopo un intervallo di tempo compreso fra 4 e 233 settimane, per poi essere campionati ed esaminati alla ricerca di colonizzazione microbica. Le colture erano positive per contaminazione fungina in tutti i casi (*Candida tropicalis* la specie più frequente), ma le pareti interne dei tubi usati per più di 12 settimane, erano sempre incrostate da uno spesso biofilm, il cui spessore nonostante tutto non sembrava legato al tempo di stazionamento della PEG nell'organismo.

Un altro esempio di dispositivi facilmente colonizzati in gastroenterologia è rappresentato dagli stents biliari posizionati in caso di cancro pancreatico o perampollare<sup>37</sup>. Attualmente, oltre il 70% dei pazienti con ittero ostruttivo viene trattato mediante questi dispositivi in condizioni di urgenza, per poi essere inviato a centri ad elevata specializzazione. Spesso inoltre, date le lunghe liste di attesa o la necessità di terapie neoadiuvanti chemio e radio, l'intervento viene posposto per settimane anche nei centri di riferimento, per cui lo stent biliare è praticamente obbligatorio. Durante questo periodo, guadagnando accesso al sistema biliare, i batteri duodenali possono aderire alla superficie dello stent e cominciare a formare biofilm, giocando un ruolo critico nella catena che conduce l'impianto ad

intasarsi<sup>48</sup>. Gli impianti gastrointestinali sono associati con uno spettro estremamente vario di specie. I primi lavori su questo argomento hanno mostrato una chiara connessione fra la presenza degli stent biliari ed un drammatico incremento della contaminazione della bile, prevalentemente causato dal microbiota duodenale, ovvero l'*Enterococco*<sup>39</sup>. In uno studio seguente, a carattere prospettico, degli stents di poliuretano retti o a coda di maiale sono stati rimossi da 120 pazienti (62.5% maschi; età media 64 years), affetti da restringimenti biliari (maligni nel 35% dei casi, benigni nei restanti), fra 1 e 1274 giorni di tempo di residenza<sup>40</sup>. I tassi di occlusione degli stents, che aumentavano significativamente il rischio di colangite, erano dell'11.5% nei drenaggi a coda di maiale e del 13% in quelli retti. La colonizzazione predominante era polimicrobica (95.8% contro 4.2%), includendo *Enterococco* (79.3%), *Enterobacteriacee* (73.7%) e *Candida* (55.9%) come patogeni predominanti. In aggiunta, la *Candida* era più comune sugli stent di pazienti che in precedenza avevano ricevuto terapia antibiotica prolungata<sup>41</sup>.

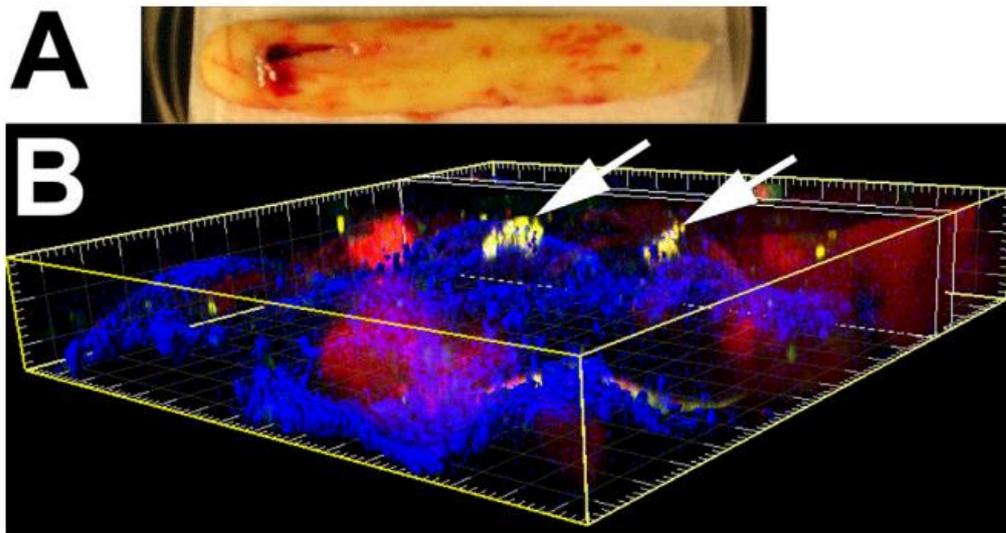
**Impianti ortopedici:** La sostituzione protesica globale di un'articolazione è una procedura sicura e ormai standardizzata, che può portare al recupero della funzionalità e migliorare il benessere dei pazienti con grav artrite di ginocchio e anca. Nonostante queste procedure siano da considerarsi sicure, si verificano comunque delle complicanze post-operatoria, la più comune delle quali è l'infezione di protesi articolare (PJI = prosthetic joint infection), un meccanismo principale del fallimento dell'impianto, che richiede spesso la revisione chirurgica<sup>42,43</sup>. In molti casi, sia che venga effettuata una toilette chirurgica mantenendo l'impianto in situ sia che si scelga la rimozione ed il successivo reimpianto, il trattamento fallisce. Nell'ultima decade è stata descritta una vera e propria classificazione della patogenesi e dell'eziologia delle PJI. Queste vengono ormai divise in una forma acuta, ad inizio precoce od ultra precoce e causata da batteri estremamente virulenti, una forma di basso grado, cronica, causata da germi a bassa virulenza ed infine una forma tardiva da disseminazione ematogena, aggressiva e ad alto rischio. In generale le specie batteriche trovate sono lo *Stafilococco aureo*, *epidermidis* e *lungdunensis*<sup>44,45</sup>. Alcuni studi hanno identificato 3 diversi

meccanismi fisiopatologici nell'infezione cronica da Stafilococco nelle protesi ortopediche: 1) la formazione di piccole colonie varianti (small colony variants, SCV); 2) l'internalizzazione batterica negli osteoblasti; 3) la formazione del biofilm<sup>46</sup>. Il primo ed il terzo meccanismo sono stati osservati per *l'aureo*, *l'epidermidis* ed *il lungdunensis*. La forma acuta è causata pressochè esclusivamente da *aureo* e in più del 50% dei casi dalla variante meticillino-resistente. In particolare *l'aureo* è stato recuperato dal cemento osseo durante chirurgia di revisione e nei campioni di fluidi sinoviali, in forma di aggregati simil-biofilm.



Microscopia confocale ed elaborazione matematica: Grandi aggregati di cocci vitali (verdastro-gialli) nell'aspirato di liquid sinoviale in una protesi infetta dopo colorazione e con uso di sonde molecolari (Live/dead). Gli accumuli maggiori rilevati raggiungevano i 100 mm di diametro d avevano una morfologia eterogenea, consistente con quella della crescita in vivo dei biofilm di *Stafilococco aureo*. Gli aggregati potrebbero rappresentare gruppi di batteri che si sono separati dal biofilm per contribuire ai sintomi sistemici. Sono mostrate anche sezioni sagittali attraverso i gruppi, nei piani verticali indicate come x-z ed y-z- I nuclei umani (freccia) ed il tessuto associato sono colorati in rosso.

Sono state inoltre identificate nei casi di PJI comunità polimicrobiche contenenti *Pseudomonas Aeruginosa* –*Enterococco fecale* e *Klebsiella pneumoniae*, *Stafilococco aureo* meticillino sensibile-meticillino resistente e *Stafilococco epidermidis* meticillino resistente ed *Enterococco fecale*.

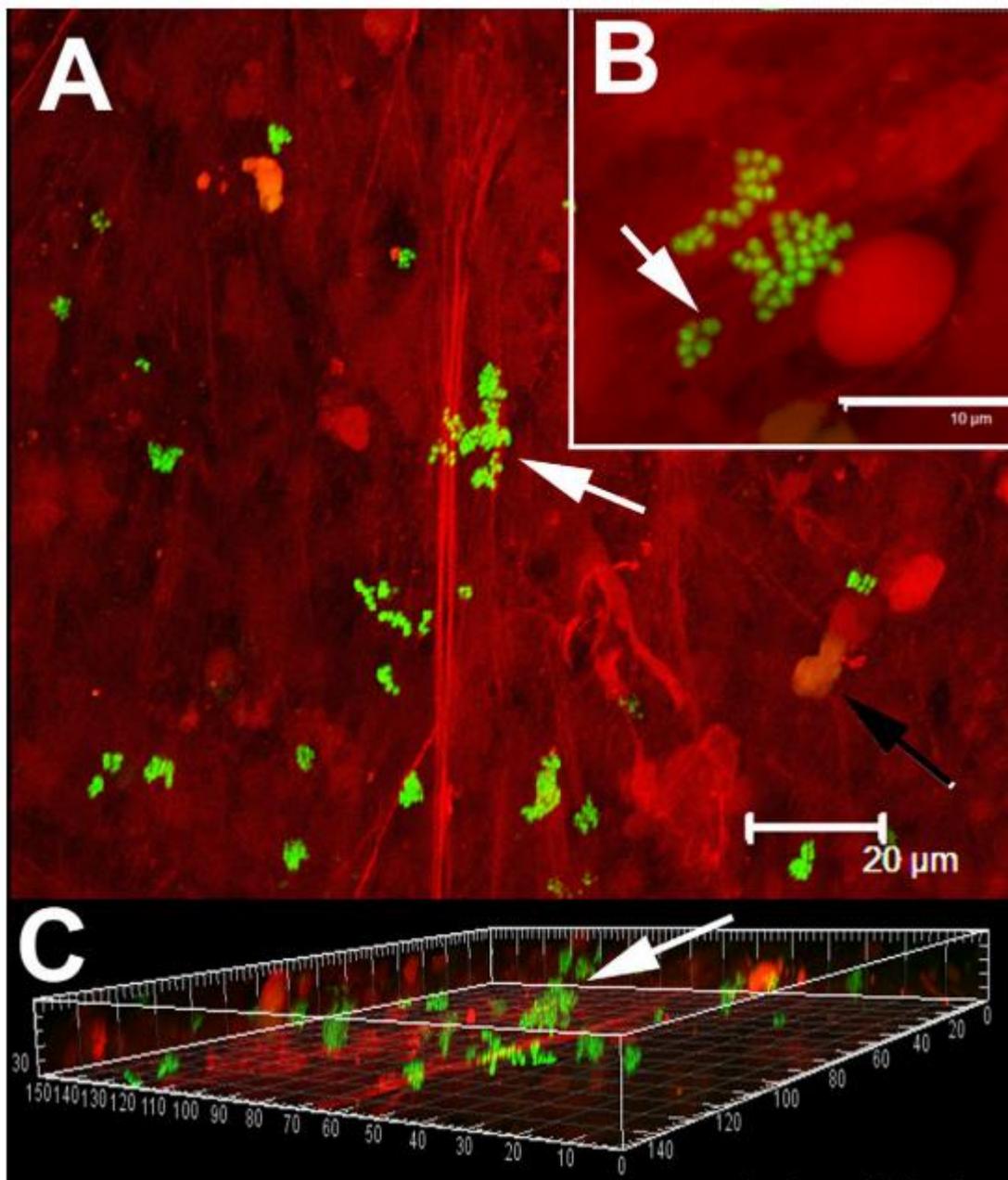


**Microscopia confocale ed elaborazione matematica: Stafilococchi nel biofilm, adesi ad un pezzo di cemento rimosso durante la revisione chirurgica. A: immagine macroscopica del cemento immerso in una soluzione tampone in una piastra di Petri. Il campione veniva orientato per la successiva osservazione confocale con l'uso di un obiettivo ad immersione in acqua. B: Visione ortogonale tridimensionale che mostra gli accumuli di biofilm (verde-giallo, indicato dalle frecce), adeso alla superficie del cemento osseo (in blu).**

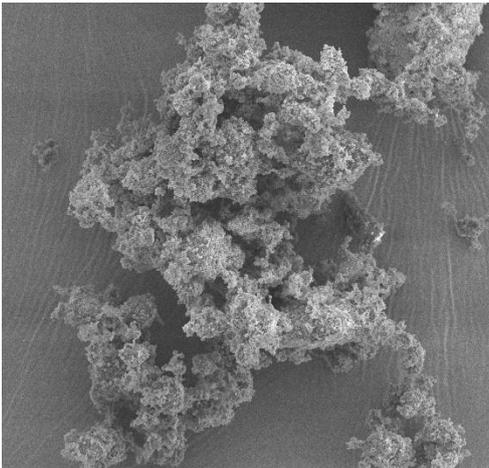
Di recente, sono state prese in considerazione modificazioni della superficie delle protesi, per prevenire la colonizzazione e la formazione del biofilm. Fra questi approcci il più studiato è il rivestimento in argento, nonostante le limitazioni, in particolare la tossicità. Per questa ragione sono state prese in considerazione diversi tipi di nanoparticelle con capacità antimicrobiche, come argento, rame, ossido di zinco, disperse sulla superficie allo scopo di ridurre la vitalità cellulare e l'adesione batterica<sup>48</sup>. Sempre allo scopo di trattare l'osteomielite, è stato proposto l'uso del biovetro o vetro

bioattivo (BAG-S53P4), un sostituto osso con provate capacità antibatteriche e di legame all'osso stesso<sup>49,50</sup>.

E' stato inoltre scoperto che un rivestimento di idrogel antibatterico, compost da ialuronano, poli-D-L-lactide (rivestimento antibatterico difensivo, DAC, defensive antibacterial coating), potrebbe essere usato come protezione per i biomateriali, in associazione con antibiotici topici, così da prevenire l'adesione batterica e la formazione del biofilm<sup>51</sup>.



Singole cellule ed accumuli di cocci vitali (colorati in verde con l'uso del Live/dead), adesi al tessuto e mostranti la caratteristica morfologia dello stafilococco. A: Immagine a bassa risoluzione che mostra le cellule batteriche (freccette) adese al materiale fibroso (striatura rossa). I nuclei delle cellule umane sono visibili (freccia nera). B: A maggiore magnificazione viene evidenziato un gruppo di cocci con alcune cellule in fase di divisione (freccia), indicante che sono ancora vitali, in accordo con il risultato della vitalità della colorazione. C: Proiezione ortogonale tridimensionale del pannello A, che mostra gli accumuli di biofilm (freccia) adesi e protrudenti dal materiale fibroso.



Esempio di biovetro. I biovetri sono vetri a base di silicati degradabili nei fluidi corporei e che possono agire come veicolo per ioni curativi. Il biovetro si differenzia dagli altri biomateriali come l'idrossiapatite perché è il solo materiale con proprietà anti-infettive e pro-angiogeniche.

Alcuni lavori infine, hanno mostrato che i meccanismi di persistenza del biofilm coinvolgono una interazione diretta del batterio con le cellule di soppressione derivate dalla linea mieloide, ovvero monociti e granulociti immaturi che sono coinvolti, durante il processo infiammatorio, nella generazione di cellule mature. Durante e possibilmente proprio a causa dell'infezione batterica strutturata in modalità biofilm, queste cellule perdono la capacità di maturare, e regolano pertanto in modo negativo i meccanismi infiammatori attraverso le loro funzioni soppressive, finendo per aiutare la colonia nella sua lotta per la sopravvivenza.

Queste cellule sembrerebbero infine migliorare la persistenza batterica attraverso la produzione di Interleukina 10.<sup>52</sup>

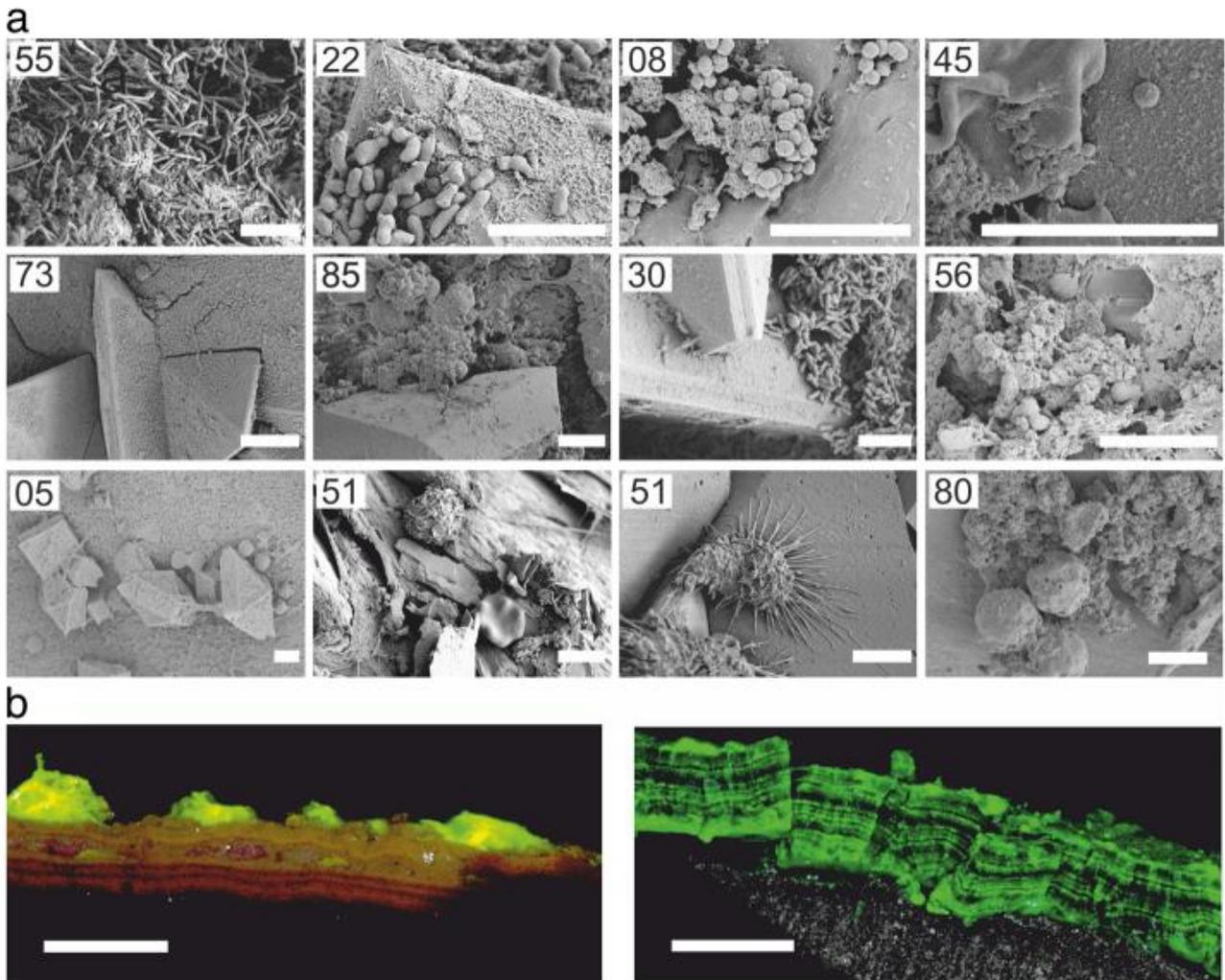
A causa di quanto detto, il trattamento delle PJI resta estremamente complesso, soprattutto a causa del fatto che per lo più conduce dapprima alla rimozione e poi al reimpianto di una nuova protesi. Per ridurre la morbilità, la terapia antibiotica potrebbe essere implementata nella prima fase, allo scopo di tentare quanto più possibile di non rimuovere l'impianto. Risultati promettenti da questo punto di vista sono giunti da un modello di ratto, che ha dimostrato una elevata efficacia di una combinazione rifampicina-vancomicina rispetto alla monoterapia<sup>53</sup>.

**Impianti urologici: nefrostomie, stent.** La formazione di biofilm è stata osservata nella maggioranza dei dispositivi impiantabili del tratto urogenitale, sia a breve termine che permanenti, inclusi cateteri, stent ureterali, tubi da nefrostomia e protesi peniene<sup>54,55</sup>. Nella pratica corrente, I cateteri a permanenza sono ampiamente usati per alleviare le ostruzioni del tratto urinario superiore, prevenire la formazione di stenosi, drenare tramite fistolosi, ridurre le complicanze chirurgiche.

Gli stent, che sono il tipo di protesi più soggetta a infezioni, batteriemia e morte sono luogo estremamente proni alla colonizzazione. La penetrazione batterica in questi casi è probabilmente dovuta all'ambiente permissivo; infatti questi impianti vengono a contatto con polisaccaridi, ioni e glicoproteine, che aiutano la formazione di un film di condizionamento sulla superficie dell'impianto, permettendo poi alle specie planctoniche di aderire e formare biofilm. Questo evento abitualmente si verifica entro 24 ore dall'inserimento dello stent. Inoltre, le incrostazioni parietali potrebbero di per sé stesse condurre alla formazione del biofilm. Questo processo coinvolge la deposizione di cristalli minerali sulla superficie e nel lume dello stent. Come risultato, quest'ultimo si calcifica e perde la sua forza tensile, aumentando il rischio di frattura o avulsione durante la rimozione<sup>56-58</sup>.

In uno dei primi lavori che analizzavano le incrostazioni e la loro relazione con le infezioni da biofilm, Wollin e collaboratori riscontrarono uno strato condizionante il biofilm, su stent rimossi da 64 pazienti. La metà dei quali mostrava incrostazione ed il 13% un biofilm maturo. Sebbene la produzione di ureasi (catalizzante l'idrolisi dell'urea in biossido di carbonio e ammoniaca) possa condurre ad incrostazione la correlazione fra i due processi è poco compresa<sup>59</sup>.

Da una parte infatti il biofilm batterico può facilitare la precipitazione di cristalli causando l'incrostazione, dall'altra, la stessa costituirebbe una nicchia ottimale per la colonizzazione e la formazione di biofilm.



Immagini rappresentative in microfotografia elettronica di incrostazioni di stent ureterali e biofilm. In A biofilm di vari batteri, inclusi *L. jensenii* (ST55), *Gardnerella vaginalis* (ST22), *S. anginosus* (ST08), *Stafilococco aureo* (ST45), *Stafilococco epidermidis* (ST85) e *Corinebatterio* (ST30). Altri esempi includono cellule fungine e cellule ematiche (ST05, ST51 and ST80). Scala = 5  $\mu\text{m}$ . In B, immagini al microscopio confocale. Le incrostazioni si colorano in verde, con la fluorescenza associate con una struttura stratificata. Scala = 50  $\mu\text{m}$

I patogeni più comuni trovati in questi impianti includono *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococco fecale*, *Stafilococchi* e *Candida tropicalis*. Sono stati

effettuati numerosi studi sull'adesione dei batteri uropatogeni alla cellula ospite. Per *l'Escherichia coli* è stata trovata una connessione fra i pili di tipo I (in particolare una proteina di nome FimH) e la proteina di Tamm-Horsfall (THP) o uromodulina (la principale proteina presente nell'urina umana). Proprio questa proteina solitamente si occupa di eliminare i batteri, ma in presenza di stent permanenti essa diventa un'ancora per *l'Escherichia coli* attraverso FimH e per *Pseudomonas* e *Proteus* mediante differenti proteine di adesione. Il trattamento antibiotico è spesso insufficiente per eliminare o evitare la formazione del biofilm sugli stent, perciò l'approccio usuale consiste nella rimozione e nella sostituzione precoce degli stessi.

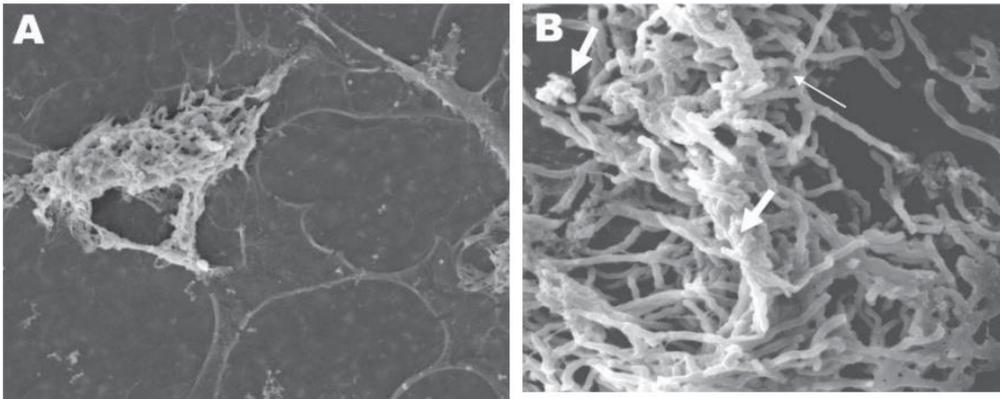
Anche in questo caso si è pensato a modifiche della superficie del materiale per prevenire la formazione del biofilm. Differenti strategie di prevenzione per evitare l'incrostazione sono allo studio. Il metodo più comune è rivestire gli impianti. L'uso di rivestimenti in argento e sue nanoparticelle, antibiotici, batteriofagi, clorexidina, triclosan, peptidi antimicrobici, enzimi, idrogel, politetrafluoroetilene, polzwitterioni e polietilene glicole sono fra i più esplorati ed utilizzati<sup>60</sup>. Sono stati testati anche cambiamenti della topografia di superficie per evitare l'adesione batterica. Recentemente Mosayyebi ha proposto un approccio innovativo nel quale un modello microfluidico dell'uretere stentato ed occluso è stato usato per studiare l'effetto dell'architettura dello stent sulla distribuzione delle forze di stress di parete e dell'incrostazione di superficie<sup>61</sup>.

Le protesi peniene sono usate principalmente per la disfunzione erettile, una condizione che colpisce fra il 20 ed il 25% degli uomini sopra i 40 e fra il 5 ed il 10% di quelli al di sotto di questa età. Questa patologia è spesso legata a condizioni mediche di altra natura, incluso il diabete e le malattie cardiovascolari. Le complicanze infettive in queste protesi generalmente sono rare (circa il 3% dei primi impianti ma fino al 18% delle revisioni), ma possono causare complicanze gravi sia sal punto di vista clinico che da quello emotivo<sup>62-64</sup>.

Durante le chirurgie di revisione in questi pazienti vengono trovati batteri in ben il 70% dei casi, la maggioranza rappresentata da *Stafilococco epidermidis*. Nonostante ciò, numerosi miglioramenti

hanno avuto luogo di recente nelle tecniche di inserimento delle protesi, che sono state mutate dalle chirurgie ortopediche, con netta riduzione delle infezioni<sup>65</sup>.

**I dispositivi intravascolari.** I dispositivi intravascolari vengono utilizzati per differenti applicazioni, inclusa la somministrazione di fluidi endovenosi, la nutrizione parenterale, la terapia antibiotica, la chemioterapia e la dialisi.



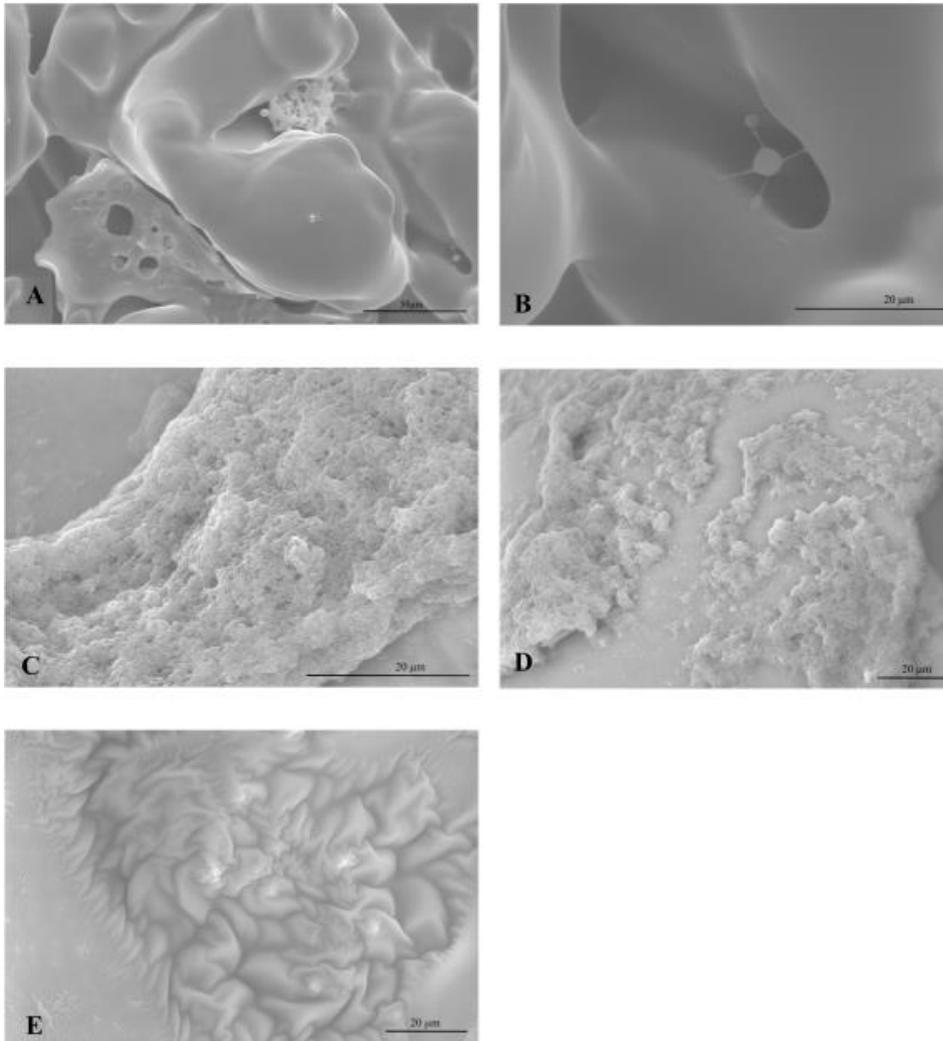
**Microscopia elettronica di un biofilm da Nocardia nel lume di un catetere venoso centrale. In A evidente l'abbondante matrice di biofilm che copre cellule filamentose. In B, una rete matura di filamenti (freccette sottili), parzialmente coperti da una matrice opaca di biofilm (freccette spesse) Ingrandimento 2500 x.**

Si stima che ogni anno nei soli Stati Uniti ne vengano impiantati oltre 5 milioni. I connettori senz'ago e le valvole Luer, si aggiungono a questi sistemi. Sfortunatamente, le contaminazioni ambientali, la mancanza di adeguate procedure di disinfezione (viene suggerita una disinfezione cutanea con alcol al 70% per 5-60 secondi) e tecniche di disinfezione delle mani insoddisfacenti, incrementano enormemente i rischi infettivi, di norma sottostimati nel caso di questi dispositivi. La colonizzazione dei connettori senz'ago causa almeno il 50% delle infezioni correlate a catetere. Gli agenti causali principali di infezione includono lo *Stafilococco aureo*, l'*epidermidis*, l'*Enterococco fecale*, la *Pseudomonas aeruginosa* e la *Klebsiella pneumoniae*<sup>66,67</sup>. All'interno di questo ambiente, la *Candida albicans* è anch'essa un fungo isolato con elevate frequenze. Tutti questi microrganismi sono correlati ad infezioni del flusso ematico, un problema maggiore negli Stati Uniti che causa da solo almeno

200.000 casi di infezione per anno, con il risultato di prolungare le ospedalizzazioni ed aumentare i costi delle stesse. Il primo step del trattamento in questi casi è sempre la terapia antibiotica e poiché nella maggior parte delle infezioni l'agente principale è lo *Stafilococco meticillino resistente*, viene tipicamente usata la Vancomicina, attiva sia contro l'aureo che contro altri stafilococchi coagulase negativi. Altro germe che non è infrequente identificare è la *Pseudomonas*, per la quale sono raccomandate le cefalosporine di quarta generazione, come ceftazidime e cefepime<sup>70</sup>. Qualora venga identificato un fungo, è raccomandato l'uso dell'Amfotericina B<sup>71</sup>. Spesso però i microbi vengono isolate da biofilm cresciuti sul catetere e con un'elevata resistenza antibiotica. Non solo, ma uno dei problemi è che di frequente l'impianto contaminato a lunga permanenza (midline, cateteri periferici ad accesso centrale), tende ad essere trombizzato proprio a causa dell'infezione e resta pertanto non rimuovibile in una prima fase. Per ottenere una concentrazione localmente elevata di farmaco è necessario effettuare quella che viene chiamata terapia serratura<sup>72,73</sup>. In sostanza, poiché la maggior parte delle infezioni si diffonde al lume del catetere, lo stesso deve essere "irrorato" con il farmaco adatto per ore o giorni, così da eradicare il contaminante. Idealmente, le soluzioni serratura dovrebbero essere dirette contro patogeni comuni o mirate a batteri specifici, per essere capaci di colpire il biofilm. Dovrebbero essere inoltre compatibili con gli anticoagulanti, avere alta stabilità chimica e bassa tossicità, non indurre antibiotico-resistenza ed essere vantaggiosi in termini di costo/efficacia. Complessivamente, le combinazioni considerate ottimali in questi casi includono la vancomicina sommata all'eparina, la taurolidina e l'aminociclina con l'EDTA, che possono danneggiare l'integrità strutturale del biofilm e sinergizzare l'attività dell'antibiotico. Una volta che questa strategia abbia fallito, non resta che rimuovere il catetere e appena possibile rimpiazzarlo con uno nuovo.

**Protesi mammarie.** Le protesi mammarie vengono utilizzate sia per procedure ricostruttive che cosmetiche. Rispetto ad altre procedure chirurgiche, gli impianti mammari affrontano rischi di ematoma, sieroma, alterazione della sensibilità a livello dell'areola, cicatrizzazione, rottura,

contrattura capsulare, ognuna delle quali può facilmente portare ad alterazione della cute superficiale, esposizione ed infezione dell'impianto. La revisione è particolarmente elevata nei casi di contrattura capsulare, responsabile di dolore e con la recidiva della stessa condizione<sup>74</sup>.



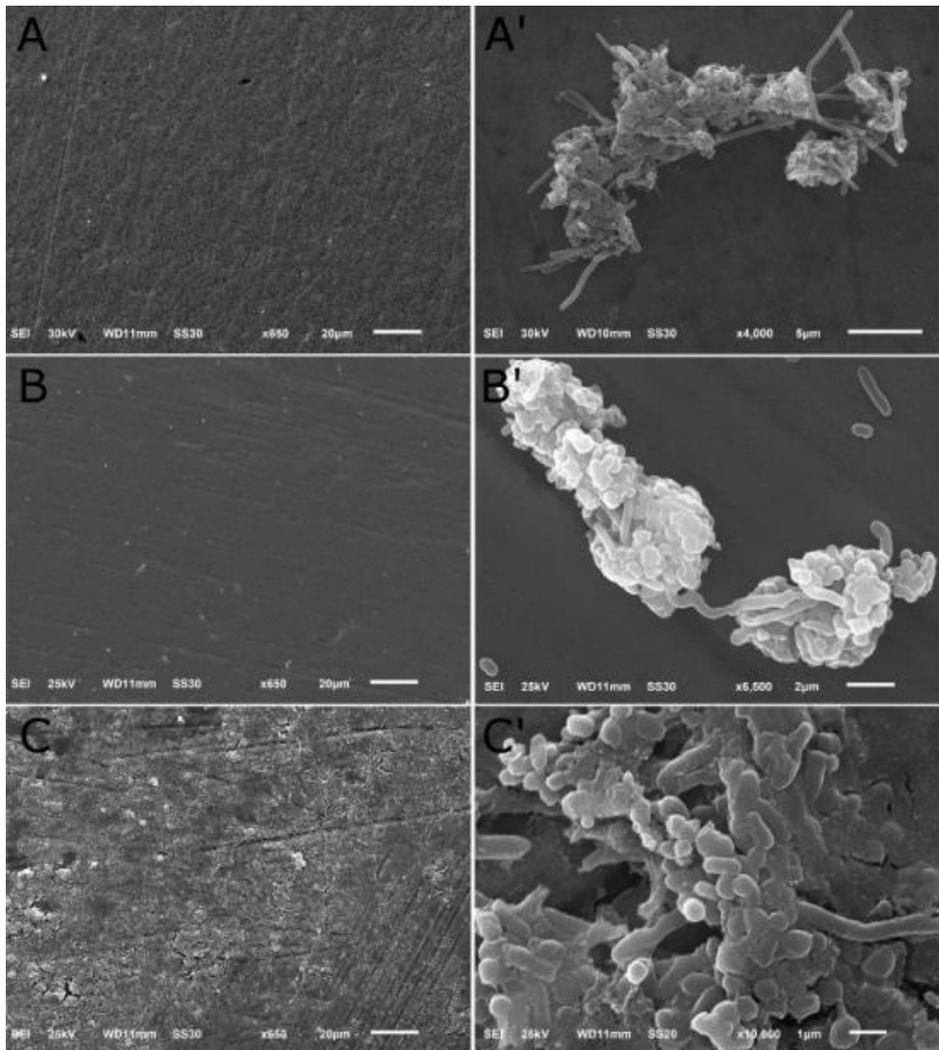
**In microscopia elettronica, ingrandimento 2000x (A) e 4000x (B), (C), (D), che mostrano differenti immagini di protesi mammarie in presenza di biofilm. (E) Stesso ingrandimento 4000 x, nessuna evidenza di biofilm**

Numerosi fattori contribuiscono alla contrattura: 1) la tipologia della procedura chirurgica in relazione alla scelta della sede dell'incisione; 2) la predisposizione genetica; 3) l'infiammazione che deriva dall'infezione subclinica e dalla formazione del biofilm; 4) la tessitura superficiale dell'impianto. Specie batteriche vengono identificate in oltre l'85% degli impianti mammari in questa

situazione ed i biofilm osservati al microscopio elettronico vengono scoperti in circa la metà di queste<sup>75,76</sup>. E' ancora una volta lo Stafilococco a farla da padrone, in particolare epidermidis, seguito da aureo. Nonostante ciò sono stati isolati numerosi batteri nell'ambiente periprotetico in grado di formare biofilm, incluso il *Corynebacterium acnes* (una specie commensale di cute e intestine), alcuni streptococchi, il *Bacillus subtilis*, l'*Escherichia coli*, diverse specie di *Micobacterio* e *Lattobacilli*<sup>77</sup>. Un altro fattore potenzialmente implicato nella formazione del biofilm è come già detto prima la suttrura superficiale della protesi, la cosiddetta texture o tessitura<sup>79</sup>. Numerosi studi hanno mostrato sia in vivo che in vitro che la formazione di biofilm è più comune sulle superfici irregolari e rugose. Nonostante ciò, anche le protesi lisce non sono scevre da rischi. Sebbene la contrattura capsulare sia considerata un problema maggiore negli impianti mammari, recentemente è stato posto sotto indagine il fenomeno del cosiddetto linfoma anaplastico a grandi cellule impianto associate. Descritto per la prima volta nel 1997, non è ancora noto se il suo sviluppo dipenda dalla formazione di biofilm su protesi a tessitura particolare. La popolazione batterica evidenziata in questi casi è quella di un agente molto poco noto ed estremamente raro, la *Ralstonia*, che sembra preferire le protesi microtexturizzate. Allo scopo di prevenire la formazione di questa patologia, i clinici hanno spinto sull'ottimizzazione delle procedure chirurgiche, somministrando profilassi endovenose, evitando le incisioni periareolari, riducendo la permanenza dei drenaggi, utilizzando coppette areolari per evitare lo stillicidio di batteri dal cepezzolo nella tasca chirurgica, irrigando la tasca stessa con una soluzione di tre antibiotico betadine, usando mesh impregnate di antibiotico nei reimpianti ed implementando il metodo della zero manipolazione per introdurre le protesi senza contatto diretto con la cute.

**Impianti dentali.** Il microbiota orale è estremamente complesso, poiché la cavità orale è il sito del corpo umano che ospita più specie batteriche, capaci di colonizzare differenti nicchie (lingua, guancia, dentatura, gengive). La colonizzazione della bocca inizia alla nascita e cambia nel tempo, per via dell'invecchiamento, della comparsa e caduta dei denti, delle caratteristiche della saliva e dell'uso degli antibiotici).

*Bacteroides*, *Proteobatteri*, *Actinobatteri*, *Spirochete*, *Fusobatteri* e *Firmicuti* sono le specie più rappresentative<sup>81</sup>. Grazie al miglioramento tecnologico è ormai possibile descrivere in dettaglio la complessità del mondo microbico della cavità orale umana e valutare la sua composizione quando sorgono problemi di salute.

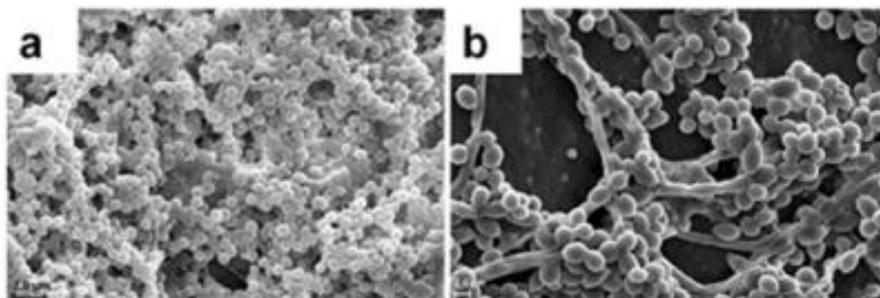


**Microscopia elettronica di impianti in zirconio (A e A'), titanio (B e B') e stampi di dischi di titanio (C e C') con biofilm, in visione panoramica e in dettaglio, dopo 48 ore di crescita.**

In effetti, i batteri orali sono stati implicati nelle malattie cardiache, le polmoniti, il diabete ed alcune patologie sistemiche, per cui la prevenzione ed il controllo delle malattie orali sono essenziali per prevenire queste condizioni. Le superfici dei biomateriali impiegati per restaurare la funzionalità

ottimale del cavo orale possono essere colonizzate da parecchi microbi, che spesso formano biofilm stabile che conduce a peri-implantiti<sup>82</sup>. Le conseguenze possono essere gravi e la salute gengivale compromessa; le resine composite in queste situazioni si degradano, conducendo alla possibilità di ulteriore invasione batterica all'interfaccia fra il dente e l'area di recupero, con demineralizzazione dello smalto<sup>83</sup>. A causa delle numerose componenti della saliva, dei tessuti dell'ospite e dei prodotti batterici, si forma una pellicola intorno alla superficie dell'impianto entro pochi minuti dal suo posizionamento e la colonizzazione microbica da cocchi Gram positivi e microbi a bastoncino è la prima a verificarsi, creando la struttura base che facilita la colonizzazione secondaria, grazie ai fenomeni di adesione interspecie. Nelle condizioni in cui sono i Gram negativi ad iniziare la colonizzazione, le specie dominanti sono il *Fusobacterio*, la *Porfiromona gengivale*, l'*Eikenella corrodens*, la *Prevotella intermedia*, il *Campylobacter* e la *Candida albicans*. In queste condizioni la peri-implantite può svilupparsi in meno di un anno dal posizionamento iniziale dell'impianto<sup>84</sup>. La profilassi antibiotica in generale è in grado di impedire questo fenomeno. Anche in questi casi comunque valutare eventuali modificazioni della superficie protesica e differenti possibilità di rivestimento potranno aiutare a scegliere i materiali meno proni alla colonizzazione<sup>85</sup>.

**Lenti a contatto.** La cheratite microbica è un'infezione della cornea che se non adeguatamente trattata può portare a Perdita del visus. Il fattore di rischio principale è rappresentato dall'ampio uso delle lenti a contatto. La cheratite batterica è stata indiscutibilmente connessa a batteri formanti biofilm, delle specie *Stafilococco coagulasi-negativo*, *Cutibacterio*, *Corinebacterio*, *Stafilococco aureo* e *Pseudomonas Aeruginosa*<sup>86,87</sup>.



**Biofilm su cornea di cadavere umano in microscopia elettronica. L'esame evidenzia a 24 ore *Stafilococco epidermidis* (a) e *Candida albicans***

L'origine dell'infezione è legata all'abilità di tutte le lenti a contatto, incluse quelle ad uso cosmetico, di indurre alterazioni nella continuità dell'epitelio corneale, portando organismi alla superficie oculare. Gli organismi sulle lenti a contatto formano biofilm stabili, principalmente da *Pseudomonas*, in seguito alla capacità del batterio di sopravvivere a situazioni di stress di differente entità e di aderire a superfici estremamente diverse fra loro. Alcune peculiari caratteristiche fisiche e chimiche delle lenti, insieme con la capacità di trattenere acqua e la loro idrofobicità, influenzano positivamente la colonizzazione. La presenza dei neutrofili in questi tessuti tende inoltre ad aumentare la crescita dei biofilm da *Pseudomonas*. Ovviamente su questi fenomeni pesa l'utilizzo di adeguate soluzioni sterilizzanti per le lenti, campo di enorme ricerca al momento attuale<sup>88,89</sup>.

**Altri impianti.** I dispositivi intrauterini costituiscono un'efficace metodo di contraccezione a lungo termine. Il loro periodo di utilizzo oscilla generalmente fra i 4 ed i 5 anni a meno che non compaiano segni di malattia infiammatoria pelvica. In ogni caso, questi impianti rappresentano un corpo estraneo facile da colonizzare per batteri e funghi<sup>90,91</sup>. Le specie più comuni associate a queste protesi sono lo *Stafilococco aureo*, l'*Enterococco fecale*, l'*Escherichia coli*, lo *Streptococco*, l'*Actinomyces*, la *Prevotella*, il *Bacteroides*, il *Clostridio* e la *Candida*<sup>92,93</sup>.

I pazienti connessi a ventilatori meccanici possono sviluppare polmoniti da ventilatore. Questa condizione ad alto rischio per la vita è spesso legata alla formazione del biofilm su tubi endotracheali. Numerosi fattori contribuiscono allo sviluppo dell'infezione: dato che i tubi prevengono il riflesso della tosse, determinando una inibizione della clearance mucosale, l'infezione danneggia l'epitelio tracheale e forma biofilm sulla superficie, rappresentando una pericolosa sede di accumulo di batteri, potenzialmente capaci di migrare e causare polmoniti<sup>94,95</sup>. I batteri principali responsabili di questa colonizzazione includono la *Klebsiella pneumoniae*, l'*Escherichia coli*, la *Pseudomonas aeruginosa* e l'*Acinetobacter baumannii*, spesso trovati come popolazione mista. Le comunità polimicrobiche

sono osservate fra l'8 ed il 58% dei tubi endotracheali. Quando questi germi, tutti forti produttori di biofilm, colonizzano stabilmente il tubo, vengono coperti da sostanze polimeriche extracellulari tipiche della crescita del biofilm stesso<sup>96,97</sup>.

Anche gli impianti cocleari sono prони all'infezione, con un'incidenza di questa complicanza compresa fra l'1.7 ed il 4.1% dei pazienti, un problema che può condurre alla rimozione dell'impianto e perfino, in rari casi, alla morte<sup>98,99</sup>. *Stafilococo aureo* e *Candida albicans* ne sono i principali agenti causali<sup>100</sup>.

L'enorme diversità dei sistemi impiantabili e soprattutto la incredibile varietà degli ambienti nei quali gli stessi si trovano immersi spiegano già di per sé le difficoltà legate al trattamento delle protesi contaminate. Per questo motivo, sebbene rimuovere spesso significhi curare, potrebbe non significare guarire, o peggio, peggiorare. Di conseguenza è chiaro che trattamenti personalizzati, ritagliati sul paziente come un vestito, debbano necessariamente essere presi in considerazione caso per caso.

## **Bibliografia**

- 1) Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. Proc Inst Mech Eng H. 2014 Oct;228(10):1083-99. doi: 10.1177/0954411914556137
- 2) Del Pozo JL. Biofilm-related disease. Expert Rev Anti Infect Ther. 2018 Jan;16(1):51-65. doi: 10.1080/14787210.2018.1417036. Epub 2017 Dec 19
- 3) Caldara M, Belgiovine C, Secchi E, Rusconi R. Environmental, Microbiological, and Immunological Features of Bacterial Biofilms Associated with Implanted Medical Devices. Clin Microbiol Rev. 2022 Apr 20;35(2):e0022120. doi: 10.1128/cmr.00221-20. Epub 2022 Jan 19

- 4) Naik K, Srivastava P, Deshmukh K, Monsoor MS, Kowshik M. Nanomaterial-Based Approaches for Prevention of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices and Implants. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015 Dec;15(12):10108-19. doi: 10.1166/jnn.2015.11688
- 5) Mirzaei R, Mohammadzadeh R, Alikhani MY, Shokri Moghadam M, Karampoor S, Kazemi S, Barfipoursalar A, Yousefimashouf R. The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices. *IUBMB Life*. 2020 Jul;72(7):1271-1285. doi: 10.1002/iub.2266. Epub 2020 Mar 9
- 6) Dhaliwal JS, Abd Rahman NA, Ming LC, Dhaliwal SKS, Knights J, Albuquerque Junior RF. Microbial Biofilm Decontamination on Dental Implant Surfaces: A Mini Review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Oct 8;11:736186. doi: 10.3389/fcimb.2021.736186. eCollection 2021
- 7) Asghar S, Ahmed A, Khan S, Lail A, Shakeel M. Genomic characterization of lytic bacteriophages AϕL and AϕM infecting ESBL K. pneumoniae and its therapeutic potential on biofilm dispersal and in-vivo bacterial clearance. *Microbiol Res*. 2022 Sep;262:127104. doi: 10.1016/j.micres.2022.127104. Epub 2022 Jun 30
- 8) Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Jul;65(2):183-95. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x. Epub 2012 Apr 23
- 9) Fritz B, Stavnsbjerg C, Markvart M, Damgaard PB, Nielsen SH, Bjørndal L, Qvortrup K, Bjarnsholt T. Shotgun sequencing of clinical biofilm following scanning electron microscopy identifies bacterial community composition. *Pathog Dis*. 2019 Feb 1;77(1):ftz013. doi: 10.1093/femspd/ftz013
- 10) Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, Leopold SR, Hanson BM, Agresta HO, Gerstein M, Sodergren E, Weinstock GM. Evaluation of 16S rRNA gene

sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun.* 2019 Nov 6;10(1):5029. doi: 10.1038/s41467-019-13036-1

11) Sanschagrín S, Yergeau E. Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. *J Vis Exp.* 2014 Aug 29;(90):51709. doi: 10.3791/51709

12) Schiffer C, Hilgarth M, Ehrmann M, Vogel RF. Bap and Cell Surface Hydrophobicity Are Important Factors in *Staphylococcus xylosus* Biofilm Formation. *Front Microbiol.* 2019 Jun 25;10:1387. doi: 10.3389/fmicb.2019.01387. eCollection 2019

13) Rezaei N, Rahmati P, Noorbakhsh F, Farhadyar N, Lotfali E. Investigation the effects of silver nanoparticles and gold nanoparticles on expression of bap and csu genes in biofilm formation of *Acinetobacter baumannii*. *Iran J Microbiol.* 2022 Aug;14(4):510-517. doi: 10.18502/ijm.v14i4.10237

14) McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015 Jan 28;5:1. doi: 10.3389/fcimb.2015.00001. eCollection 2015

15) Nguyen HTT, Nguyen TH, Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020 Nov 4;18:3324-3334. doi: 10.1016/j.csbj.2020.10.027. eCollection 2020

16) Nasser A, Dallal MMS, Jahanbakhshi S, Azimi T, Nikouei L. *Staphylococcus aureus*: Biofilm Formation and Strategies Against it. *Curr Pharm Biotechnol.* 2022;23(5):664-678. doi: 10.2174/1389201022666210708171123

17) Zheng Y, He L, Asiamah TK, Otto M. Colonization of medical devices by staphylococci. *Environ Microbiol.* 2018 Sep;20(9):3141-3153. doi: 10.1111/1462-2920.14129. Epub 2018 May 6

- 18) Kurmoo Y , Hook AL , Harvey D , Dubern JF , Williams P , Morgan SP , Korposh S , Alexander MR . Real time monitoring of biofilm formation on coated medical devices for the reduction and interception of bacterial infections. *Biomater Sci.* 2020 Mar 7;8(5):1464-1477. doi: 10.1039/c9bm00875f. Epub 2020 Jan 22
- 19) Stewart PS, Bjarnsholt T. Risk factors for chronic biofilm-related infection associated with implanted medical devices. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Aug;26(8):1034-1038. doi: 10.1016/j.cmi.2020.02.027. Epub 2020 Feb 29
- 20) Francolini I, Donelli G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 Aug;59(3):227-38. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x. Epub
- 21) Greenfeld JI, Sampath L, Popilskis SJ, Brunnert SR, Stylianos S, Modak S. Decreased bacterial adherence and biofilm formation on chlorhexidine and silver sulfadiazine-impregnated central venous catheters implanted in swine. *Crit Care Med.* 1995 May;23(5):894-900. doi: 10.1097/00003246-199505000-00018
- 22) Junghans S, Rojas SV, Skusa R, Püschel A, Grambow E, Kohlen J, Warnke P, Gummert J, Gross J. Bacteriophages for the Treatment of Graft Infections in Cardiovascular Medicine. *Antibiotics (Basel).* 2021 Nov 25;10(12):1446. doi: 10.3390/antibiotics10121446
- 23) Laohapensang K, Arworn S, Orrapin S, Reanpang T, Orrapin S. Management of the infected aortic endograft. *Semin Vasc Surg.* 2017 Jun-Sep;30(2-3):91-94. doi: 10.1053/j.semvascsurg.2017.11.001. Epub 2017 Nov 14
- 24) Palraj BR, Farid S, Sohail MR. Strategies to prevent infections associated with cardiovascular implantable electronic devices. *Expert Rev Med Devices.* 2017 May;14(5):371-381. doi: 10.1080/17434440.2017.1322506. Epub 2017 May 4

- 25) Woitschach F, Kloss M, Grabow N, Reisinger EC, Sombetzki M. Mimicking critical environment factors for a static in vitro biofilm formation model on blood-contact implant materials. *Curr Res Microb Sci.* 2022 Jul 23;3:100156. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100156. eCollection 2022
- 26) Tascini C, Cardinali G, Barletta V, Di Paolo A, Leonildi A, Zucchelli G, Corte L, Colabella C, Roscini L, Consorte A, Pasticci MB, Menichetti F, Bongiorno MG. First Case of *Trichoderma longibrachiatum* CIED (Cardiac Implantable Electronic Device)-Associated Endocarditis in a Non-immunocompromised Host: Biofilm Removal and Diagnostic Problems in the Light of the Current Literature. *Mycopathologia.* 2016 Apr;181(3-4):297-303. doi: 10.1007/s11046-015-9961-7. Epub 2015 Nov 20
- 27) Chu XM, Li B, An Y, Li XB, Guo JH. Genetic identification and risk factor analysis of asymptomatic bacterial colonization on cardiovascular implantable electronic devices. *Biomed Res Int.* 2014;2014:725163. doi: 10.1155/2014/725163. Epub 2014 Nov 2
- 28) Carmona-Torre F, Rua M, Del Pozo JL. Non-valvular intravascular device and endovascular graft-related infection. *Rev Esp Quimioter.* 2017 Sep;30 Suppl 1:42-47
- 29) Qi H, Li B, Wang H, Cai Q, Quan X, Cui Y, Meng W. Effects of d-valine on periodontal or peri-implant pathogens: *Porphyromonas gingivalis* biofilm. *J Periodontol.* 2018 Mar;89(3):303-314. doi: 10.1002/JPER.17-0405. Epub 2018 Feb 22
- 30) Moerke C, Kloss M, Wulf K, Illner S, Kischkel S, Sombetzki M, Grabow N, Reisinger E, Öner A, Ince H. Evaluation of a Murine Model for Testing Antimicrobial Implant Materials in the Blood Circulation System. *Biomedicines.* 2021 Oct 13;9(10):1464. doi: 10.3390/biomedicines9101464
- 31) Dréno B, Pécastaings S, Corvec S, Veraldi S, Khammari A, Roques C. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and *acne vulgaris*: a brief look at the latest updates. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2018 Jun;32 Suppl 2:5-14. doi: 10.1111/jdv.15043

- 32) Babeer A, Oh MJ, Ren Z, Liu Y, Marques F, Poly A, Karabucak B, Steager E, Koo H. Microrobotics for Precision Biofilm Diagnostics and Treatment. *J Dent Res*. 2022 Aug;101(9):1009-1014. doi: 10.1177/00220345221087149. Epub 2022 Apr 21
- 33) Reinisch W. PEG and Mucosal Biofilms in Irritable Bowel Syndrome and Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2022 Mar;162(3):992-993. doi: 10.1053/j.gastro.2021.06.053. Epub 2021 Jun 25.
- 34) Mufty H, Van Den Eynde J, Meuris B, Metsemakers WJ, Van Wijngaerden E, Vandendriessche T, Steenackers HP, Fourneau I. Pre-clinical In Vitro Models of Vascular Graft Coating in the Prevention of Vascular Graft Infection: A Systematic Review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2022 Jan;63(1):119-137. doi: 10.1016/j.ejvs.2021.07.015. Epub 2021 Oct 19
- 35) Diepoltová A, Konečná K, Jand'ourek O, Nachtigal P. Study of the impact of cultivation conditions and peg surface modification on the in vitro biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in a system analogous to the Calgary biofilm device. *J Med Microbiol*. 2021 May;70(5). doi: 10.1099/jmm.0.001371
- 36) Dautle MP, Wilkinson TR, Gauderer MW. Isolation and identification of biofilm microorganisms from silicone gastrostomy devices. *J Pediatr Surg*. 2003 Feb;38(2):216-20. doi: 10.1053/jpsu.2003.50046
- 37) Sun M, Chan KF, Zhang Z, Wang L, Wang Q, Yang S, Chan SM, Chiu PWY, Sung JJY, Zhang L. Magnetic Microswarm and Fluoroscopy-Guided Platform for Biofilm Eradication in Biliary Stents. *Adv Mater*. 2022 Aug;34(34):e2201888. doi: 10.1002/adma.202201888. Epub 2022 Jul 19
- 38) Sung JY, Leung JW, Shaffer EA, Lam K, Costerton JW. Bacterial biofilm, brown pigment stone and blockage of biliary stents. *J Gastroenterol Hepatol*. 1993 Jan-Feb;8(1):28-34. doi: 10.1111/j.1440-1746.1993.tb01171.x
- 39) Sung JJ. Bacterial biofilm and clogging of biliary stents. *J Ind Microbiol*. 1995 Sep;15(3):152-5. doi: 10.1007/BF01569819

- 40) Vaishnavi C, Samanta J, Kochhar R. Characterization of biofilms in biliary stents and potential factors involved in occlusion. *World J Gastroenterol*. 2018 Jan 7;24(1):112-123. doi: 10.3748/wjg.v24.i1.112
- 41) Henrich B, Schmitt M, Bergmann N, Zanger K, Kubitz R, Häussinger D, Pfeffer K. *Mycoplasma salivarium* detected in a microbial community with *Candida glabrata* in the biofilm of an occluded biliary stent. *J Med Microbiol*. 2010 Feb;59(Pt 2):239-241. doi: 10.1099/jmm.0.013110-0. Epub 2009 Oct 8
- 42) Boisrenoult P. *Cutibacterium acnes* prosthetic joint infection: Diagnosis and treatment. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2018 Feb;104(1S):S19-S24. doi: 10.1016/j.otsr.2017.05.030. Epub 2017 Dec 2
- 43) Beam E, Osmon D. Prosthetic Joint Infection Update. *Infect Dis Clin North Am*. 2018 Dec;32(4):843-859. doi: 10.1016/j.idc.2018.06.005. Epub 2018 Sep 18
- 44) Davidson DJ, Spratt D, Liddle AD. Implant materials and prosthetic joint infection: the battle with the biofilm. *EFORT Open Rev*. 2019 Nov 5;4(11):633-639. doi: 10.1302/2058-5241.4.180095. eCollection 2019 Nov
- 45) Hodges NA, Sussman EM, Stegemann JP. Aseptic and septic prosthetic joint loosening: Impact of biomaterial wear on immune cell function, inflammation, and infection. *Biomaterials*. 2021 Nov;278:121127. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121127. Epub 2021 Sep 9
- 46) Tande AJ, Osmon DR, Greenwood-Quaintance KE, Mabry TM, Hanssen AD, Patel R. Clinical characteristics and outcomes of prosthetic joint infection caused by small colony variant staphylococci. *mBio*. 2014 Sep 30;5(5):e01910-14. doi: 10.1128/mBio.01910-14
- 47) Gallo J, Panacek A, Prucek R, Kriegova E, Hradilova S, Hobza M, Holinka M. Silver Nanocoating Technology in the Prevention of Prosthetic Joint Infection. *Materials (Basel)*. 2016 May 5;9(5):337. doi: 10.3390/ma9050337

- 48) Leonetti S, Tuvo B, Campanella B, Legnaioli S, Onor M, Bramanti E, Totaro M, Baggiani A, Giorgi S, Privitera GP, Piolanti N, Parchi PD, Casini B. Evaluation of Microbial Adhesion and Biofilm Formation on Nano-Structured and Nano-Coated Ortho-Prosthetic Materials by a Dynamic Model. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Feb 5;17(3):1013. doi: 10.3390/ijerph17031013
- 49) Bortolin M, De Vecchi E, Romanò CL, Toscano M, Mattina R, Drago L. Antibiofilm agents against MDR bacterial strains: is bioactive glass BAG-S53P4 also effective? *J Antimicrob Chemother*. 2016 Jan;71(1):123-7. doi: 10.1093/jac/dkv327. Epub 2015 Oct 12
- 50) Drago L, Vassena C, Fenu S, De Vecchi E, Signori V, De Francesco R, Romanò CL. In vitro antibiofilm activity of bioactive glass S53P4. *Future Microbiol*. 2014;9(5):593-601. doi: 10. Front Med (Lausanne)
- 51) Ferry T, Batailler C, Petitjean C, Chateau J, Fevre C, Forestier E, Brosset S, Leboucher G, Kolenda C, Laurent F, Lustig S. The Potential Innovative Use of Bacteriophages Within the DAC® Hydrogel to Treat Patients With Knee Megaprosthesis Infection Requiring "Debridement Antibiotics and Implant Retention" and Soft Tissue Coverage as Salvage Therapy. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Jul 31;7:342. doi: 10.3389/fmed.2020.00342. eCollection 2020
- 52) Heim CE, Vidlak D, Odvody J, Hartman CW, Garvin KL, Kielian T. Human prosthetic joint infections are associated with myeloid-derived suppressor cells (MDSCs): Implications for infection persistence. *J Orthop Res*. 2018 Jun;36(6):1605-1613. doi: 10.1002/jor.23806. Epub 2017 Dec 5
- 53) Pant N, Miranda-Hernandez S, Rush C, Warner J, Eisen DP. Effect of savirin in the prevention of biofilm-related *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection. *Front Pharmacol*. 2022 Sep 15;13:989417. doi: 10.3389/fphar.2022.989417. eCollection 2022
- 54) Tomer N, Garden E, Small A, Palese M. Ureteral Stent Encrustation: Epidemiology, Pathophysiology, Management and Current Technology. *J Urol*. 2021 Jan;205(1):68-77. doi: 10.1097/JU.0000000000001343. Epub 2020 Aug 28

- 55) Wilson SK, Gross MS. Biofilm and penile prosthesis infections in the era of coated implants: 2021 update. *Int J Impot Res.* 2022 Aug;34(5):411-415. doi: 10.1038/s41443-021-00423-w. Epub 2021 Mar 13
- 56) Scotland KB, Lo J, Grgic T, Lange D. Ureteral stent-associated infection and sepsis: pathogenesis and prevention: a review. *Biofouling.* 2019 Jan;35(1):117-127. doi: 10.1080/08927014.2018.1562549. Epub 2019 Feb 8
- 57) Zumstein V, Betschart P, Albrich WC, Buhmann MT, Ren Q, Schmid HP, Abt D. Biofilm formation on ureteral stents - Incidence, clinical impact, and prevention. *Swiss Med Wkly.* 2017 Feb 3;147:w14408. doi: 10.4414/smw.2017.14408. eCollection 2017
- 58) Barghouthy Y, Wiseman O, Ventimiglia E, Letendre J, Cloutier J, Daudon M, Kleinclauss F, Doizi S, Corrales M, Traxer O. Silicone-hydrocoated ureteral stents encrustation and biofilm formation after 3-week dwell time: results of a prospective randomized multicenter clinical study. *World J Urol.* 2021 Sep;39(9):3623-3629. doi: 10.1007/s00345-021-03646-0. Epub 2021 Mar 10
- 59) Wollin TA, Tieszer C, Riddell JV, Denstedt JD, Reid G. Bacterial biofilm formation, encrustation, and antibiotic adsorption to ureteral stents indwelling in humans. *J Endourol.* 1998 Apr;12(2):101-11. doi: 10.1089/end.1998.12.101
- 60) Lim H, Chung JH, Park Y, Baek N, Seo Y, Park H, Cho YK, Jung D, Han DH. Inner surface modification of ureteral stent polyurethane tubes based by plasma-enhanced chemical vapor deposition to reduce encrustation and biofilm formation.
- 61) Mosayyebi A, Manes C, Carugo D, Somani BK. Advances in Ureteral Stent Design and Materials. *Curr Urol Rep.* 2018 Apr 10;19(5):35. doi: 10.1007/s11934-018-0779-y
- 62) Herati AS, Lo EM. Penile prosthesis biofilm formation and emerging therapies against them. *Transl Androl Urol.* 2018 Dec;7(6):960-967. doi: 10.21037/tau.2018.09.05

- 63) Dawn LE, Henry GD, Tan GK, Wilson SK. Biofilm and Infectious Agents Present at the Time of Penile Prosthesis Revision Surgery: Times Are a Changing. *Sex Med Rev.* 2017 Apr;5(2):236-243. doi: 10.1016/j.sxmr.2017.01.002. Epub 2017 Feb 24
- 64) Pineda M, Burnett AL. Penile Prosthesis Infections-A Review of Risk Factors, Prevention, and Treatment. *Sex Med Rev.* 2016 Oct;(4):389-398. doi: 10.1016/j.sxmr.2016.03.003. Epub 2016 May 13
- 65) Leong JY, Capella CE, D'Amico MJ, Isguven S, Purtill C, Machado P, Delaney LJ, Henry GD, Hickok NJ, Forsberg F, Chung PH. A scoping review of penile implant biofilms-what do we know and what remains unknown? *Transl Androl Urol.* 2022 Aug;11(8):1210-1221. doi: 10.21037/tau-22-195
- 66) Wolcott R. Biofilm and catheter-related bloodstream infections. *Br J Nurs.* 2021 Apr 22;30(8):S4-S9. doi: 10.12968/bjon.2021.30.8.S4
- 67) Donlan RM. Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. *Clin Infect Dis.* 2011 Apr 15;52(8):1038-45. doi: 10.1093/cid/cir077
- 68) Percival SL, Kite P. Intravascular catheters and biofilm control. *J Vasc Access.* 2007 Apr-Jun;8(2):69-80
- 69) Lin PY, Chen HL, Huang CT, Su LH, Chiu CH. Biofilm production, use of intravascular indwelling catheters and inappropriate antimicrobial therapy as predictors of fatality in *Chryseobacterium meningosepticum* bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Nov;36(5):436-40. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.033
- 70) Morales M, Méndez-Alvarez S, Martín-López JV, Marrero C, Freytes CO. Biofilm: the microbial "bunker" for intravascular catheter-related infection. *Support Care Cancer.* 2004 Oct;12(10):701-7. doi: 10.1007/s00520-004-0630-5

- 71) Brunetti G, Navazio AS, Giuliani A, Giordano A, Proli EM, Antonelli G, Raponi G. Candida blood stream infections observed between 2011 and 2016 in a large Italian University Hospital: A time-based retrospective analysis on epidemiology, biofilm production, antifungal agents consumption and drug-susceptibility. *PLoS One*. 2019 Nov 7;14(11):e0224678. doi: 10.1371/journal.pone.0224678. eCollection 2019
- 72) Walraven CJ, Lee SA. Antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):1-8. doi: 10.1128/AAC.masthead.57-1. Epub 2012 Oct 15
- 73) Mansouri MD, Ramanathan V, Mansouri DL, Hull RA. In vitro activities of N-acetyl cysteine and levofloxacin as a catheter lock therapy against catheter-associated infections. *J Appl Microbiol*. 2022 May;132(5):3915-3924. doi: 10.1111/jam.15490. Epub 2022 Feb 26
- 74) Ajdic D, Zoghbi Y, Gerth D, Panthaki ZJ, Thaller S. The Relationship of Bacterial Biofilms and Capsular Contracture in Breast Implants. *Aesthet Surg J*. 2016 Mar;36(3):297-309. doi: 10.1093/asj/sjv177. Epub 2016 Feb 2
- 75) Jacombs A, Tahir S, Hu H, Deva AK, Almatroudi A, Wessels WLF, Bradshaw DA, Vickery K. In vitro and in vivo investigation of the influence of implant surface on the formation of bacterial biofilm in mammary implants. *Plast Reconstr Surg*. 2014 Apr;133(4):471e-480e. doi: 10.1097/PRS.0000000000000020
- 76) Danino MA, Nizard N, Paek LS, Govshievich A, Giot JP. Do Bacteria and Biofilm Play a Role in Double-Capsule Formation around Macrot textured Implants? *Plast Reconstr Surg*. 2017 Nov;140(5):878-883. doi: 10.1097/PRS.00000000000003767
- 77) Wixtrom RN, Stutman RL, Burke RM, Mahoney AK, Codner MA. Risk of breast implant bacterial contamination from endogenous breast flora, prevention with nipple shields, and implications for biofilm formation. *Aesthet Surg J*. 2012 Nov;32(8):956-63. doi: 10.1177/1090820X12456841. Epub 2012 Sep 10

- 78) James GA, Boegli L, Hancock J, Bowersock L, Parker A, Kinney BM. Bacterial Adhesion and Biofilm Formation on Textured Breast Implant Shell Materials. *Aesthetic Plast Surg.* 2019 Apr;43(2):490-497. doi: 10.1007/s00266-018-1234-7. Epub 2018 Oct 1
- 79) Brown T. Surface Areas of Textured Breast Implants: Implications for the Biofilm Theory of Capsule Formation. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2018 Mar 19;6(3):e1700. doi: 10.1097/GOX.0000000000001700. eCollection 2018 Mar
- 80) Jewell ML, Adams WP Jr. Betadine and Breast Implants. *Aesthet Surg J.* 2018 May 15;38(6):623-626. doi: 10.1093/asj/sjy044
- 81) Dhaliwal JS, Abd Rahman NA, Ming LC, Dhaliwal SKS, Knights J, Albuquerque Junior RF. Microbial Biofilm Decontamination on Dental Implant Surfaces: A Mini Review. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Oct 8;11:736186. doi: 10.3389/fcimb.2021.736186. eCollection 2021
- 82) Philip J, Buijs MJ, Pappalardo VY, Crielaard W, Brandt BW, Zaura E. The microbiome of dental and peri-implant subgingival plaque during peri-implant mucositis therapy: A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2022 Jan;49(1):28-38. doi: 10.1111/jcpe.13566. Epub 2021 Nov 3
- 83) Preethanath RS, AlNahas NW, Bin Huraib SM, Al-Balbeesi HO, Almalik NK, Dalati MHN, Divakar DD. Microbiome of dental implants and its clinical aspect. *Microb Pathog.* 2017 May;106:20-24. doi: 10.1016/j.micpath.2017.02.009. Epub 2017 Feb 8
- 84) Belibasakis GN, Charalampakis G, Bostanci N, Stadlinger B. Peri-implant infections of oral biofilm etiology- *Adv Exp Med Biol.* 2015;830:69-84. doi: 10.1007/978-3-319-11038-7\_4
- 85) Bordin D, Cavalcanti IM, Jardim Pimentel M, Fortulan CA, Sotto-Maior BS, Del Bel Cury AA, da Silva WJ. Biofilm and saliva affect the biomechanical behavior of dental implants. *J Biomech.* 2015 Apr 13;48(6):997-1002. doi: 10.1016/j.jbiomech.2015.02.004. Epub 2015 Feb 12

- 86) Dosler S, Hacıoglu M, Yilmaz FN, Oyardi O. Biofilm modelling on the contact lenses and comparison of the in vitro activities of multipurpose lens solutions and antibiotics. *PeerJ*. 2020 Jun 24;8:e9419. doi: 10.7717/peerj.9419. eCollection 2020
- 87) Fritsch LN, Dias ALT, Silva NC, Fernandes GJM, Ribeiro FBAO. Comparative analysis of biofilm formation by *Candida albicans* and *Candida krusei* in different types of contact lenses. *Arq Bras Oftalmol*. 2022 May-Jun;85(3):235-239. doi: 10.5935/0004-2749.20220033
- 88) Kackar S, Suman E, Kotian MS. Bacterial and fungal biofilm formation on contact lenses and their susceptibility to lens care solutions. *Indian J Med Microbiol*. 2017 Jan-Mar;35(1):80-84. doi: 10.4103/ijmm.IJMM\_16\_273
- 89) Di Onofrio V, Gesuele R, Maione A, Liguori G, Liguori R, Guida M, Nigro R, Galdiero E. Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation on Soft Contact Lenses by *Allium sativum* Fermented Extract (BGE) and Cannabinol Oil Extract (CBD). *Antibiotics (Basel)*. 2019 Dec 10;8(4):258. doi: 10.3390/antibiotics8040258
- 90) Borges KRA, Pimentel IV, Lucena LCLDS, Silva MACND, Monteiro SG, Monteiro CA, Nascimento MDDSB, Bezerra GFB. Adhesion and biofilm formation of *Candida parapsilosis* isolated from vaginal secretions to copper intrauterine devices. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018 Oct 22;60:e59. doi: 10.1590/S1678-9946201860059
- 91) Hardy L, Cerca N, Jaspers V, Vaneechoutte M, Crucitti T. Bacterial biofilms in the vagina. *Res Microbiol*. 2017 Nov-Dec;168(9-10):865-874. doi: 10.1016/j.resmic.2017.02.001. Epub 2017 Feb 21
- 92) Shanmughapriya S, Sornakumari H, Lency A, Kavitha S, Natarajaseenivasan K. Synergistic effect of amphotericin B and tyrosol on biofilm formed by *Candida krusei* and *Candida tropicalis* from intrauterine device users. *Med Mycol*. 2014 Nov;52(8):853-61. doi: 10.1093/mmy/myu046. Epub 2014 Sep 8

- 93) Abdel-Hafeez M, El-Mehallaway N, Khalil I, Abdallah F, Elnaggar A. Microbiological profile and biofilm formation on removed intrauterine contraceptive devices from a sample of Egyptian women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014 Jun;40(6):1770-6. doi: 10.1111/jog.12412
- 94) Dexter AM, Scott JB Airway Management and Ventilator-Associated Events. *Respir Care.* 2019 Aug;64(8):986-993. doi: 10.4187/respcare.07107
- 95) Coppadoro A, Bellani G, Foti G. Non-Pharmacological Interventions to Prevent Ventilator-Associated Pneumonia: A Literature Review. *Respir Care.* 2019 Dec;64(12):1586-1595. doi: 10.4187/respcare.07127. Epub 2019 Sep 24
- 96) Kumar S, Anwer R, Azzi A. Virulence Potential and Treatment Options of Multidrug-Resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms.* 2021 Oct 6;9(10):2104. doi: 10.3390/microorganisms9102104
- 97) Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018 Apr;58(4):428-439. doi: 10.1165/rcmb.2017-0321TR
- 98) Chen X, Chen Y, Zhang R, Ye S, Lin Z, Nian S, Lin C. The biofilm characteristics and management of skin flap infection following cochlear implantation. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2022 Aug;42(4):372-379. doi: 10.14639/0392-100X-N1985
- 99) Cozma V, Rosca I, Radulescu L, Martu C, Nastasa V, Varganici CD, Ursu EL, Doroftei F, Pinteala M, Racles C. Antibacterial Polysiloxane Polymers and Coatings for Cochlear Implants. *Molecules.* 2021 Aug 12;26(16):4892. doi: 10.3390/molecules26164892
- 100) Asfour L, Smyth D, Whitchurch CB, Cavaliere R, Roland JT Jr. Fluorescence in situ hybridization and microbial community profiling analysis of explanted cochlear implants. *Acta Otolaryngol.* 2022 May;142(5):395-401. doi: 10.1080/00016489.2022.2070931. Epub 2022 May 12.

## Capitolo VIII: La nostra esperienza sperimentale

### **Materiali e metodi per la crescita e la coltura del biofilm batterico su materiali da impianto cranico.**

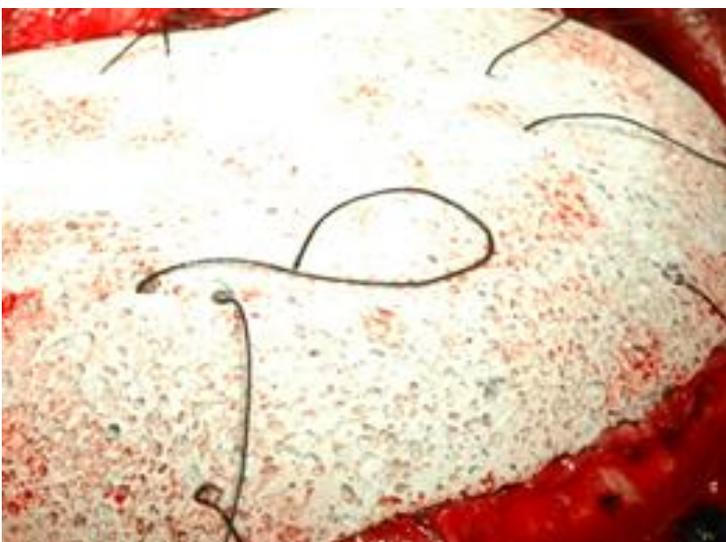
Dopo questa lunga introduzione siamo finalmente giunti allo scopo del presente lavoro ed alla descrizione della metodologia con cui è stato condotto.

E' necessario dire, introduttivamente, che la nostra esperienza di laboratorio si è basata in primis su quanto maturato dalla attività clinica svolta nel quindicennio precedente l'inizio di questa ricerca (2002-2017). Come abbiamo visto, le specie batteriche in grado di colonizzare un impianto neurochirurgico sono numerose. Per tale motivo la selezione di quali germi valessero la pena di un'indagine approfondita avrebbe potuto facilmente condurre fuori strada, divenendo infinita e scarsamente utile. Proprio la valutazione della nostra casistica ci ha permesso di focalizzare la ricerca sulle 4 specie batteriche fondamentali in quanto riscontrate con la maggiore frequenza, dotate di una notevole aggressività e facilmente reperibili nella flora del nostro Ospedale, ovvero lo *Stafilococco aureo meticillino-resistente*, la *Klebsiella pneumoniae*, la *Pseudomonas Aeruginosa* e l'*Acinetobacter Baumannii*. Inoltre, abbiamo preso in considerazione i ceppi capaci non solo di formare di biofilm ma anche di opporre la massima resistenza alla terapia, problema ormai divenuto endemico nelle strutture ospedaliere di tutto il mondo. Per la *Pseudomonas* e la *Klebsiella* si trattava di una forma multiresistente con sensibilità ai soli carbapenemici, per l'*Acinetobacter* di sensibilità alla sola Colistina.

La seconda scelta ha riguardato quali materiali testare in relazione alla capacità dei ceppi batterici sopra indicati di produrre biofilm. Poiché, sebbene l'osso autologo all'atto del suo riposizionamento venga ormai considerato alla stregua di e letteralmente definito una cranioplastica, non è però prevista in alcun caso la sua seconda rimozione per una nuova criopreservazione. Per tale motivo e per l'ovvia indisponibilità del materiale stesso, non abbiamo ritenuto necessario testarlo. D'altra parte, essendo l'idrossiapatite porosa composta della matrice di fosfato tricalcico tipica della componente inorganica

dell'osso, crediamo di poter considerare i dati ottenuti per quest'ultima come sostanzialmente estrapolabili all'osso autologo stesso in condizioni di infezione, sulla base della netta somiglianza di comportamento nella clinica fra i 2 materiali e della principale componente residua inorganica nell'osso congelato. Degli altri sostituti cranici abbiamo poi preso in esame tutte le categorie attualmente disponibili, ovvero il titanio, la resina acrilica ed il PEEK. Nel nostro Istituto non abbiamo mai fatto uso di polietilene poroso, per cui il comportamento di quest'ultimo materiale non è stato studiato.

Un elemento importante, preso fin da subito in considerazione, ha riguardato le caratteristiche di superficie dei materiali da testare. Per l'idrossiapatite porosa avevamo a disposizione due forme diverse, quella in granuli e quella in frammenti.



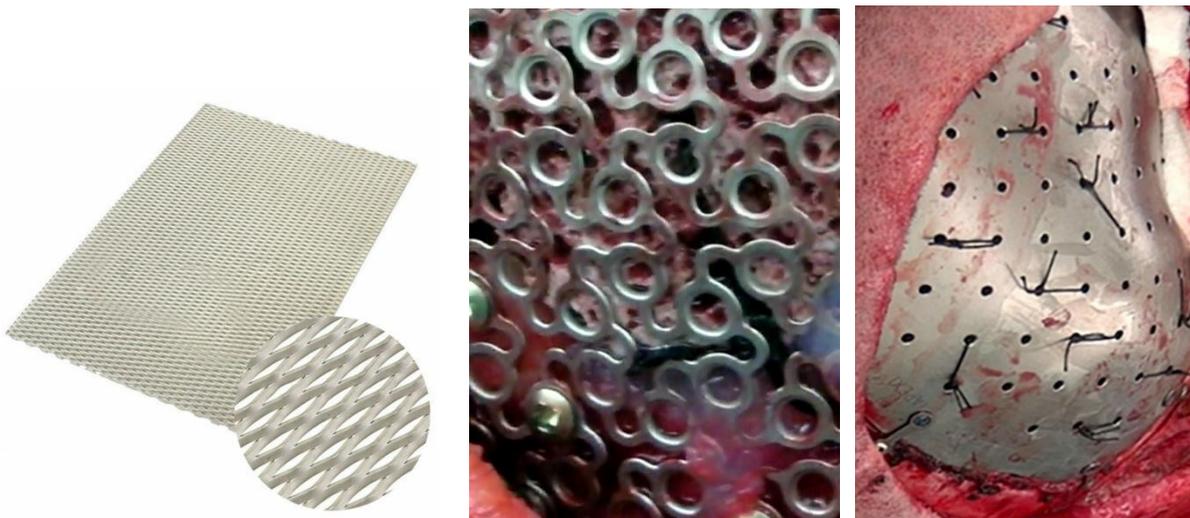
Fra le due esisterebbe in teoria una differenza significativa, poiché la forma in granuli tende ad avere una superficie che, sebbene moderatamente rugosa, ha una discreta regolarità. Al contrario i frammenti (derivati da backup di cranioplastiche custom non utilizzati e vicini alla scadenza), presentano superficie largamente irregolare, tipicamente cavitata. Considerato quanto detto in precedenza, ci si potrebbe aspettare una differenza nella capacità di colonizzazione dei ceppi infettanti, favorente i frammenti proprio grazie alla presenza di numerose introflessioni ed alla loro maggiore similitudine con la cranioplastica di uso chirurgico e per questo sui frammenti è ricaduta la scelta di utilizzo.

Laddove il PEEK esiste solo in forma di una plastica a superficie liscia e perfettamente regolare, il taglio dello stesso rappresenta un problema, poiché il materiale viene sostanzialmente trasformato in polvere con l'uso delle comuni frese da taglio dei trapani neurochirurgici.



Può essere però diviso in strisce sottili (con alcune asperità di superficie) mediante la sega oscillante. Anche in questo caso è stato pertanto necessario valutare quale delle due forme fosse quella più adatta allo studio, venendo preferita la seconda.

Per quanto riguarda il titanio, l'utilizzo in neurochirurgia ne prevede due forme, che rappresentano l'una l'evoluzione dell'altra. La prima, descritta in precedenza, è rappresentata dalle reti traforate, maglie dello spessore fra 0.1 e 0.6 mm, alternate a strisce compatte. La seconda consiste in fogli di titanio compatto, dello spessore fino ad 1 mm. Sebbene la prima tipologia di materiale fosse più simile ai sostituti cranici usati nel passato, estremamente malleabili e leggeri, la seconda è certamente sovrapponibile, per compattezza, resistenza alla deformabilità e piccole dimensioni delle lacune fra i pilastri di supporto, alle più moderne plastiche in titanio compatto.



Per la resina acrilica, la disponibilità di modellazione manuale a caldo ci ha permesso di formare dei piccoli agglomerati a superficie perfettamente liscia.

Dal punto di vista procedurale dovevamo inoltre considerare due fattori fondamentali: 1) non conoscevamo, a priori, quale fosse la suscettibilità di ogni singolo materiale ad ogni corrispondente ceppo batterico; in sostanza non sapevamo se lo stesso batterio fosse in grado di creare biofilm indifferentemente su tutti i materiali o se al contrario esistesse una tendenza alla specificità per il

singolo dispositivo; 2) era necessario riprodurre una condizione che fosse assimilabile a quella osservata in clinica per poter decidere come procedere.

In merito al primo punto, la nostra esperienza clinica sembrava documentare una maggiore tendenza dei germi Gram positivi (*Stafilococco aureo ed epidermidis*) ad infettare l'opercolo osseo autologo e l'idrossiapatite, laddove il PEEK, la resina acrilica ed il titanio sembravano essere particolarmente predisposti alla colonizzazione da parte dei Gram negativi. Purtroppo però, come ampiamente dimostrato in letteratura, in alcuni casi di infezione non avevamo comunque riscontrato una positività documentata e dunque questi dati erano solo parziali e confondenti.

Per quanto riguardava la possibilità di ricostruire una situazione simile a quella tipicamente osservata in ambito clinico avevamo incontrato pazienti affetti da infezione di cranioplastica, per i quali la semplice rimozione della stessa, seguita da sterilizzazione del focolaio chirurgico con terapia antibiotica e successivo riposizionamento, non corrispondeva ad una strategia attuabile, se non a gravissimo rischio *quoad vitam* e *quoad valetudinem*. Nello specifico, ci eravamo trovati ad affrontare prevalentemente due scenari: A) il primo, quello di soggetti sottoposti ad intervento per patologia tumorale, gliale o meningiomatosa di alto grado, che avevano sviluppato un'infezione del sito chirurgico, con deiscenza della ferita ed esposizione dell'opercolo osseo autologo o di una cranioplastica posizionata in occasione di un precedente intervento; B) pazienti sottoposti ad una pregressa procedura di revisione per infezione dell'opercolo osseo o di una cranioplastica, che avevano sviluppato un'infezione che aveva condotto a rimozione dell'impianto, trattamento antibiotico prolungato, riposizionamento di una nuova protesi dopo 12 mesi e nuovo deterioramento clinico per ricomparsa di infezione nella stessa sede.

Nel primo caso non avevamo ritenuto possibile lasciare il paziente privo della opportuna copertura cranica, poiché questo avrebbe voluto dire permettere potenzialmente alla neoplasia di crescere attraverso e perfino di rompere i piani cutanei, dato che il tempo richiesto per la sterilizzazione antibiotica del focolaio sarebbe stato insufficiente in relazione alla prospettiva globale di

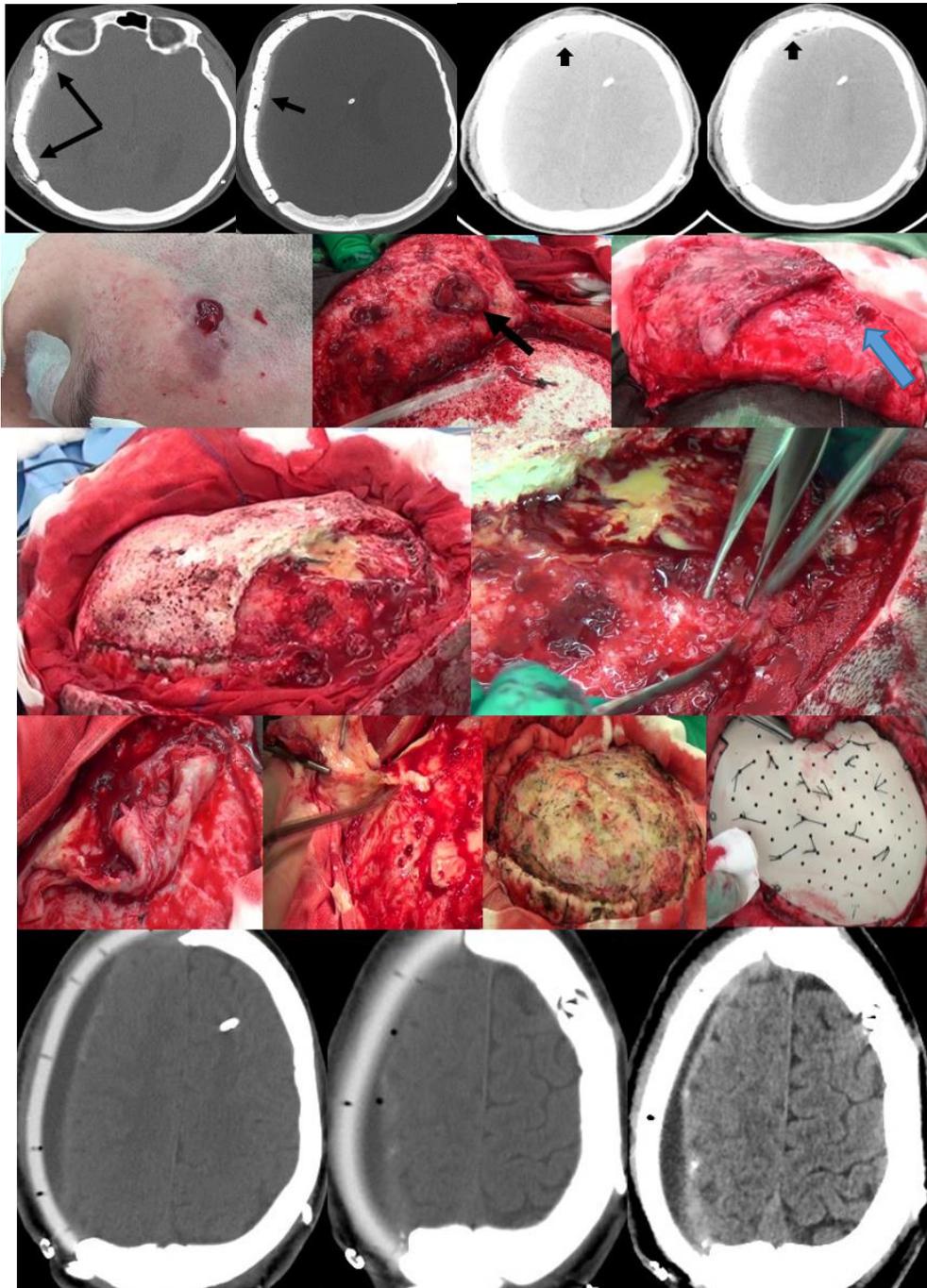
sopravvivenza. Eravamo stati inoltre costretti, in caso di sopravvivenza per un periodo superiore all'atteso, a ponderare la temibile complicità di trovarci di fronte ad una estroflessione non riducibile del parenchima malato e della cute sovrastante per via dell'edema legato alla malattia o all'infiltrazione, da parte della stessa, dei piani cutanei con perdita dell'integrità del lembo per comparsa di tramiti di deiscenza e a volte anche di fistola liquorale. Infine, nelle infezioni precoci, intervenute poco prima del previsto inizio del trattamento radioterapico, rimuovere quest'ultimo non avrebbe potuto essere effettuato in caso di assenza dell'opercolo, anche per la vicinanza dell'evento infettivo, togliendo al paziente un'arma fondamentale del suo trattamento. In particolare per le lesioni meningiomatose di grado II complicate da infezione, la preoccupazione era che l'assenza dell'opercolo facilitasse una lenta ed inesorabile infiltrazione dei piani cutanei, che avrebbe reso impossibile chiudere nuovamente la pelle una volta riaperta al momento della inevitabile ricrescita della lesione stessa. Al contrario, per i pazienti sottoposti a craniectomia decompressiva e portatori di shunt controlaterali, nei casi di infezione osservavamo regolarmente, un assottigliamento della cute del lembo decompressivo, per cui alla rimozione del lembo osseo poteva conseguire una retrazione della cute tale da rendere difficile riposizionare una nuova protesi senza rischiare che quest'ultima restasse esposta al momento della futura ricostruzione, richiedendo una programmazione ben più complessa, coinvolgente i colleghi chirurghi plastici e l'inserimento di espansori sottocutanei, peraltro nella sede di un pregresso processo infettivo.

Per i motivi sopra elencati, abbiamo cominciato ad utilizzare una strategia basata su una serie di step ben precisi. Al momento della sospetta o accertata (su base clinica) positività per infezione, il paziente veniva ricoverato, sottoposto ad uno screening colturale e sierologico completo, nonché ad indagine TC senza e con mezzo di contrasto (RMN solo in casi selezionati) ed infine, in presenza di una franca deiscenza di ferita, sottoposto a tampone profondo e campionamento della raccolta secreta.

A questo punto si iniziava una terapia antibiotica a largo spettro, capace di coprire sia germi Gram positivi che negativi e si valutava la risposta al trattamento nelle due settimane successive. La terapia

antibiotica veniva ovviamente modificata in caso di identificazione del germe causale. In presenza di risposta al trattamento, valutato in termini di riduzione dei fenomeni di iperemia del lembo, interruzione della produzione di secrezioni, riduzione o stazionarietà della raccolta sottocutanea ma soprattutto di eventuali raccolte epidurali e di miglioramento degli indici di flogosi, il paziente veniva avviato ad una revisione chirurgica basata su: 1) rimozione dell'osso autologo o della cranioplastica infetta; 2) toilette aggressiva della superficie epidurale, fino a scoprire il piano durale originariamente ricostruito; 3) refresh dei bordi ossei mediante drilling; 4) toilette aggressive dei piani tegumentari, in particolare della superficie interna del lembo che aveva fronteggiato la cranioplastica infetta. Questa regione veniva comunemente trovata ricoperta da uno strato di tessuto estremamente ispessito, pressochè avascolare, di colorito grigio-brunastro, in alcune zone molto consistente in altre più friabile, estremamente adeso al sottocute proprio del lembo. Tutto il materiale rimosso veniva inviato in microbiologia per l'identificazione del germe causale. Una volta trovato un punto di penetrazione adatto, l'intero rivestimento infiammatorio del lembo poteva essere rimosso in grossolani frammenti, ottenendo un significativo sanguinamento del lembo stesso, portato a tessuto vitale. Infine si eseguivano lavaggi ripetuti con soluzione ossigenata e iodata e posizionamento di una nuova plastica. Un drenaggio veniva utilizzato per almeno 6 giorni dopo l'intervento, per permettere ad eventuale materiale purulento di continuare a fuoriuscire. Nelle successive 2 settimane il paziente continuava ad essere trattato con antibiotici endovenosi. Allo scadere della quarta settimana di trattamento globale si decideva come continuare la terapia a livello domiciliare per altre 8 settimane. Una tc con contrasto veniva acquisita a 2 settimane e poi a 90 giorni dall'intervento, per escludere recidive. Il paziente veniva dimesso solo dopo la rimozione dei punti e la ferita rivista settimanalmente per i primi 40 giorni, poi a intervalli regolari di 3 settimane. Non tutti i materiali erano prontamente disponibili, poiché sia il PEEK che il titanio preformato (in forma compatta, non in mesh) richiedevano un minimo di 10 giorni di tempo per essere fabbricati, al contrario il polimetilmetacrilato e le mesh in titanio erano disponibili in sede pur rimanendo il limite della modellazione manuale in sede intraoperatoria. La maggiore capacità di copertura offerta dall'acrilico

e la sua migliore adattatività alle conformazione del difetto cranico lo rendevano spesso il materiale di scelta.



Un esempio della procedura descritta. In alto le frecce indicano la raccolta epidurale nelle immagini TC. In sede intraoperatoria evidenza di deiscenza cutanea sull'esterno del lembo e tessuto di granulazione (freccia nera sottile) vicino allo stesso sul versante interno. Sempre nella stessa posizione (freccia azzurra), il tessuto di granulazione sovrastante la cranioplastica, presente sulla superficie interna del lembo, staccato nella sua interezza. In basso ricostruzione con PEEK e TC post-operatoria.

Come ripetere dunque questo schema in laboratorio? Visti i risultati positivi ottenuti con la metodologia clinica (solo un caso di reinfezione di cranioplastica immediata e conseguente ad una fistola liquorale), abbiamo presunto che il successo terapeutico fosse legato al fatto che la maggior parte della colonia batterica formante biofilm si trovasse sulla cranioplastica stessa, al di sotto di essa sul piano epidurale e nel tessuto fibroso sovrastante la stessa, pressochè costantemente sede di uno o più tramiti fistolosi.

In considerazione del comportamento clinico nei casi di reinfezione dopo rimozione temporanea della plastica cranica e di quanto descritto in letteratura, ritenevamo inoltre che colonie batteriche residuassero nel tessuto circostante la plastica infetta, sia in forma planctonica (per fenomeno di dispersione dalla colonia principale) sia in forma di biofilm vero e proprio. Nonostante ciò, queste colonie avevano una minore probabilità di sopravvivenza e minore incidenza numerica in caso di trattamento antibiotico adeguato, poichè il tessuto ospite del paziente presentava ancora caratteristiche di buona vascolarizzazione e pressochè normale rappresentazione strutturale.

Abbiamo dunque deciso di procedere secondo lo schema seguente:

- 1) Presentazione del materiale alle 4 famiglie batteriche selezionate e conseguente identificazione del materiale a maggiore specie-specificità (più elevata facilità di crescita con formazione di numerose colonie) = equivalente alla fase di infezione
- 2) Rimozione del materiale ed isolamento dal brodo di coltura della colonia organizzata in biofilm= equivalente alla fase di rimozione della plastica cranica
- 3) Disseminazione del batterio su nuovi pozzetti ognuno dei quali contenente sia il materiale di partenza che gli altri tre;
- 4) A questo punto, incubazione in brodo di coltura in assenza ed in presenza di terapia antibiotico-specifica, per valutare: 1) la tendenza della specie infettante a reinfettare lo stesso materiale di partenza con maggiore aggressività rispetto agli altri; 2) l'efficacia

dell'accoppiata sostituzione del materiale + antibiotico = scelta del materiale a minor rischio di infezione, efficacia della sostituzione grazie all'integrazione con la terapia mirata

Questa condizione in vitro corrisponderebbe alla rimozione della plastica infetta avendo come residuo solo parte del biofilm nel tessuto sottocutaneo sovrastante ed in quello epidurale, mimando inoltre la ripresa di infezione al posizionamento della nuova plastica.

Tale procedura veniva ripetuta su 3 ceppi differenti di ognuna delle 4 specie scelte per gli esperimenti, allo scopo di verificare (ove esistesse) la specie-specificità della singola specie per un determinato materiale, cercando così di incrementando la significatività statistica.

Restava però il problema di valutare il comportamento di eventuali batteri rimasti nel cavo chirurgico una volta rimossa la cranioplastica infetta, che, fossero essi planctonici oppure organizzati in biofilm e che avrebbero potuto vanificare la sostituzione con il nuovo impianto. A questo scopo:

- 1) Abbiamo indotto la formazione di colonie batteriche in provette falcon, ancora una volta selezionando il materiale peggiore per ogni singola specie (in clinica, proliferazione dei ceppi rimasti in assenza di antibioticoterapia);
- 2) Abbiamo poi rimosso il materiale, lavato la falcon dai residui e recuperato lo strato di biofilm adeso alle pareti della provetta= (biofilm circostante l'area a maggior concentrazione infettiva);
- 3) Questo strato è stato poi nuovamente seminato con i materiali stessi e sottoposto/non sottoposto a terapia antibiotica (inserimento della nuova cranioplastica e valutazione infezione da parte dei germi residui ) per comprendere: 1) se la capacità di crescita in questa situazione fosse paragonabile numericamente a quella dei germi fatti ricrescere sugli impianti; 2) se a carica ridotta la specificità per il materiale si mantenesse invariata.

Descrivendo in maggiore dettaglio la procedura strumentale, dodici isolati batterici sono stati utilizzati per condurre lo studio. In particolare, 4 ceppi di riferimento: *S. aureus* ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 19606 e 8 isolati clinici (vedi Tabella sottostante)

Isolati batterici	MIC (mg/L)			Produttori di biofilm
	LNZ	MER	COL	
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	2			F
<i>S. aureus</i> 3503	2			M
<i>S. aureus</i> 3508	2			M
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		0.5	1	F
<i>P. aeruginosa</i> 778				F
<i>P. aeruginosa</i> 780				F
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603		≤0.06		F
<i>K. pneumoniae</i> 8104		≤0.03		F
<i>K. pneumoniae</i> 8107		≤0.03		F
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606			2	F
<i>A. baumannii</i> 3714			2	D
<i>A. baumannii</i> 3832			2	D

Gli antibiotici linezolid, meropenem e colistina sono stati acquistati sottoforma di polveri (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) e risospesi mediante opportuni solventi ad una concentrazione finale di 10 mg/L. Le sospensioni madri sono state conservate a -20° C.

## **Test di sensibilità**

La sensibilità degli isolati batterici è stata determinata mediante il metodo della microdiluzione in brodo in accordo con la procedura raccomandata dallo European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) (\*Eucast, 2023 [Broth microdilution - EUCAST reading guide v 4.0]). La tecnica prevede di standardizzare l'inoculo batterico ad una concentrazione di  $5 \times 10^5$  CFU/ml in Mueller-Hinton II (Oxoid, Basinstoke, UK). I campioni venivano poi inoculati in multiwell, precedentemente preparate con concentrazioni scalari degli antibiotici di interesse. Le piastre erano incubate successivamente a 37°C per 24 ore. I valori di MIC sono stati interpretati sulla base dei breakpoint suggeriti da Eucast (\*Eucast, clinical breakpoint v 13.0] 2023). *S. aureus* ATCC 29213 è stato utilizzato come ceppo di controllo per il linezolid mentre *P. aeruginosa* ATCC 27853 per colistina e meropenem.

## **Produzione di biofilm**

La capacità di produrre biofilm dei ceppi è stata valutata seguendo il protocollo stilato da Stepanovic e colleghi con qualche modifica (Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation *Journal of Microbiological Methods* 40 (2000) 175–179, 2000 [DOI: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6]). Brevemente, una singola colonia batterica è stata inoculata in 5 ml di Brain Heart infusion (BHI, Oxoid, Basinstoke, UK) supplementato con 1% di glucosio (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) ed incubata over night a 37°C per 24 ore. Successivamente i ceppi sono stati standardizzati a 0.5 Mcfarland per avere una concentrazione cellulare di circa  $1 \times 10^8$  UFC/ml. L'inoculo è stato realizzato aliquotando 0.2 ml di sospensione batterica all'interno di pozzetti di piastre 96-well a fondo piatto (ThermoScientific, Vilnius, Lituania). Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37°C. Il terzo giorno è stato rimosso il terreno e sono stati effettuati 3 lavaggi con acqua per eliminare i batteri non adesi. Il biofilm è stato asciugato mantenendo la piastra per 1 ora a 60°C in stufa. Successivamente ad ogni

pozzetto sono stati aggiunti 0.1 ml di cristalvioletto (ThermoScientific, Vilnius, Lituania). Trascorsi 10 minuti il colorante è stato rimosso e sono stati effettuati 3 lavaggi con acqua per eliminarne l'eccesso.

Sono stati aggiunti 0.1 ml di etanolo al 95% ad ogni pozzetto poi la piastra è stata posta in agitazione per 10 minuti per permettere la solubilizzazione del cristalvioletto legatosi al biofilm. Infine, la piastra è stata letta con il multiscan Ascend (Thermofisher) utilizzando un filtro a 450 nm.

I dati ottenuti sono stati sottratti del valore medio del bianco (serie di pozzetti in cui era presente solo il terreno di coltura) ed è stata calcolata la OD<sub>c</sub>. OD<sub>c</sub> corrisponde al limite soglia calcolato come la deviazione standard media (DSB) dei valori di assorbanza del bianco moltiplicata per 3 e sommata al valore medio della densità del bianco (OD<sub>MB</sub>):

$$OD_c = DSB \times 3 + OD_{MB}$$

Per ogni isolato è stato calcolato il valore medio di densità ottica (OD<sub>m</sub>).

I risultati sono stati utilizzati per classificare i ceppi secondo il seguente schema:

- Non produttore:  $OD_m \leq OD_c$
- Debole produttore:  $OD_c < OD_m \leq 2 \times OD_c$
- Medio produttore:  $2 \times OD_c < OD_m \leq 4 \times OD_c$
- Forte produttore:  $4 \times OD_c < OD_m$

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato per ogni ceppo batterico studiato

## **Biofilm e impianti**

Come già descritto in precedenza, sono state utilizzate 4 tipologie di materiale:

- 1) idrossiapatite porosa in frammenti

- 2) PEEK
- 3) Titanio in rete traforata dello spessore di 0.6 mm
- 4) Resina acrilica

Sono state effettuate tre serie di esperimenti, inoculo, subinoculo e Falcon Devices

### **Serie Inoculo**

0.6 g di ogni materiale sono stati introdotti in tubi da 50 ml. Gli isolati batterici sono stati fatti crescere in 5 ml di BHI overnight a 37°C. Il giorno successivo le brodocolture sono state standardizzate mediante densità ottica fino ad ottenere una concentrazione di  $1 \times 10^8$  UFC/ml in BHI addizionato con l'1% di glucosio. 5 ml di brodocoltura sono stati aliquotati in ogni tubo per ogni tipologia di materiale utilizzato e lasciati per 72 ore a 37°C. Trascorso il tempo necessario è stato rimosso il terreno (e le cellule planctoniche) e sostituito con 5 ml di BHI addizionato con glucosio all'1% fresco. I campioni sono stati posti a 37°C per altre 72 ore. Al sesto giorno sono stati trasferiti i diversi campioni di materiali in pozzetti di piastre 12-well (ThermoScientific, Vilnius, Lituania). Tutti i materiali sono stati sottoposti ad almeno 3 lavaggi con acqua deionizzata ed infine trattati con 1 ml di PBS (Phosphate Buffered Saline) più 0.5% di Tween20. Le piastre sono state lasciate per 10 minuti in agitazione. Tale soluzione permette di staccare le cellule dal materiale e separarle della matrice del biofilm. Per valutare il numero delle UFC/ml sono state eseguite delle diluizioni scalari successivamente state seminate in Mueller-Hinton II agar (MHA, Oxoid, Basinstoke, UK) ed incubate a 37°C per 24 ore. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

### **Serie Sub-inoculo**

Per l'allestimento delle serie sub-inoculo è stata preparata una brodocoltura standardizzata ad una concentrazione di  $1 \times 10^8$  UFC/ml in BHI addizionato con l'1% di glucosio. 5ml della brodocoltura

sono stati incubati insieme a 0.6 g di materiale. La scelta del materiale utilizzato è stato ceppo-specifica: per ogni ceppo è stato scelto il materiale che risultava, dalla serie inoculo, avere il maggior numero di UFC/ml adese al materiale stesso. Trascorse 72 ore di incubazione a 37°C, 0.1 ml di brodocoltura veniva trasferito in nuovi tubi contenenti i 4 diversi materiali e 5 ml di BHI più 1% glucosio. Parallelamente è stata eseguita una serie di esperimenti paralleli utilizzando 5 ml di BHI supplementato con 1% di glucosio e antibiotico. Gli antibiotici e le relative concentrazioni sono stati utilizzati come segue: i) per la specie *S. aureus* linezolid a 16 µg/ml; ii) *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* meropenem a 16 e 8 µg/ml, rispettivamente; iii) per la specie *A. baumannii* colistina a 8 µg/ml. Le concentrazioni utilizzate rappresentano i valori di breakpoint di resistenza riportati nelle tabelle EUCAST. Dopo ulteriori 72 ore di incubazione a 37°C sono state valutate UFC/ml come descritto in precedenza.

### **Serie Falcon-devices**

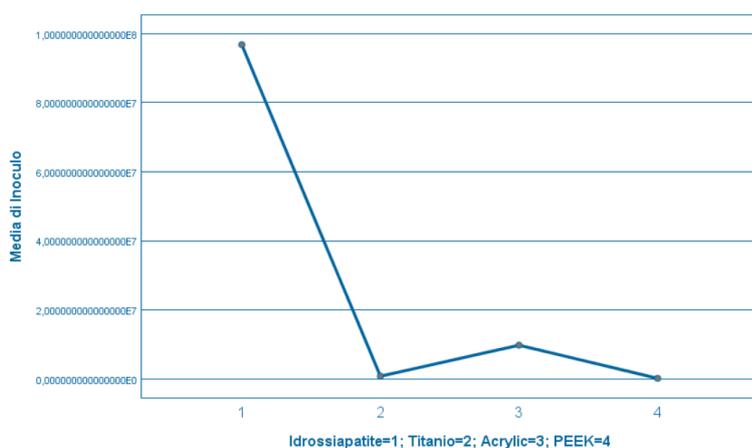
La serie falcon-devices segue una prima fase identica alla serie sub-inoculo precedentemente descritta. Trascorse le prime 72 ore di incubazione dai tubi vengono eliminati il device e il terreno. Si esegue 1 lavaggio con acqua per eliminare le cellule planctoniche e si inseriscono 0.6 gr dei diversi devices nelle falcon. Anche in questo caso si sviluppano due set di esperimenti, uno con e uno senza antibiotico. Le concentrazioni e il tipo di antibiotico sono equivalenti agli esperimenti della serie sub-inoculo. Tutti i tubi vengono incubati per 72 ore a 37°C al termine dei quali si effettuano le conte di UFC/ml come precedentemente descritto.

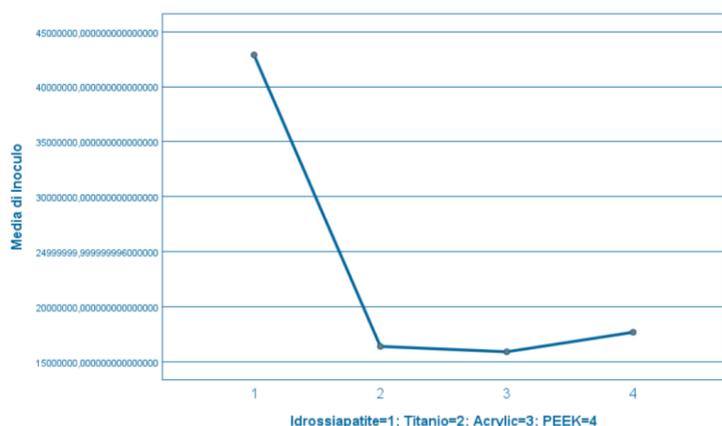
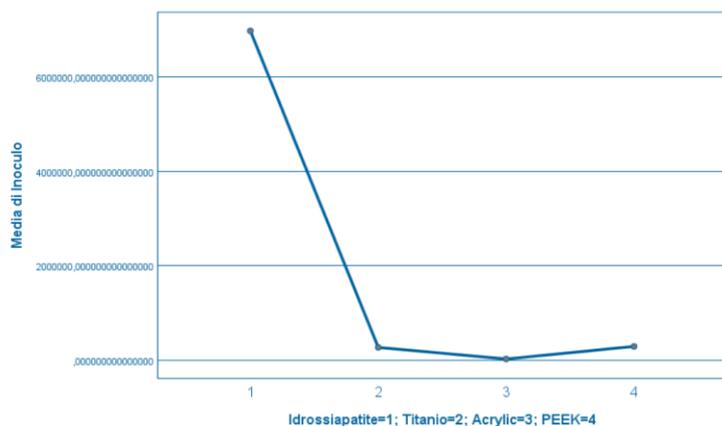
Nelle seguenti serie di dati le Unità Formanti Colonie sono state espresse in potenza con la seguente formulazione: 7.5 E+ 10 (es: 7.5 x 10<sup>5</sup>).

## Risultati: i dati grezzi e la loro analisi per singole specie batteriche, considerazioni

### Stafilococco Aureo Meticillino-resistente

Nelle prove di inoculo, alla ricerca del materiale peggiore ovvero di quello con la maggiore tendenza a permettere la formazione di colonie batteriche, l'idrossiapatite è risultata la più adatta alla residenza degli Stafilococchi, sebbene con una differenza fra i tre ceppi considerati. Per MRSA 43300 è stato riscontrato un valore di UFC pari a  $9,68E+07$  per idrossiapatite, seguita dalla resina acrilica ( $9,76E+06$ ), dal titanio ( $7,79E+05$ ) e dal PEEK ( $1,64E+05$ ). Per MRSA 3503, l'idrossiapatite resta il peggior materiale ( $4,29E+07$ ), seguita dal PEEK ( $1,77E+07$ ), dal titanio ( $1,64E+07$ ) e dalla resina acrilica ( $1,59E+07$ ), tutti pressochè attestati sugli stessi valori. Per MRSA 3508, l'idrossiapatite primeggia ancora ( $6,98E+06$ ), seguita da PEEK ( $2,89E+05$ ), titanio ( $2,68E+05$ ) e resina ( $2,29E+04$ ). Esaminando i materiali per tipologia per gruppo di specie, l'idrossiapatite resta ovviamente il materiale peggiore ( $4,73E+07$ ), seguita da una sostanziale omogeneità degli altri, (resina =  $8,72E+06$ , PEEK =  $5,61E+06$ , titanio =  $5,47E+06$ ). Prendendo in esame la struttura di superficie, si osserva una chiara differenza in favore dei materiali a struttura irregolare (idrossiapatite + titanio =  $2,64E+07$ , PEEK + resina =  $7,17E+06$ ).

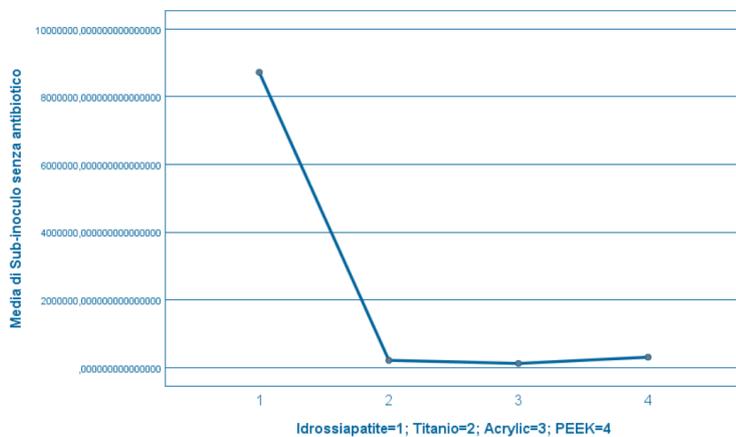
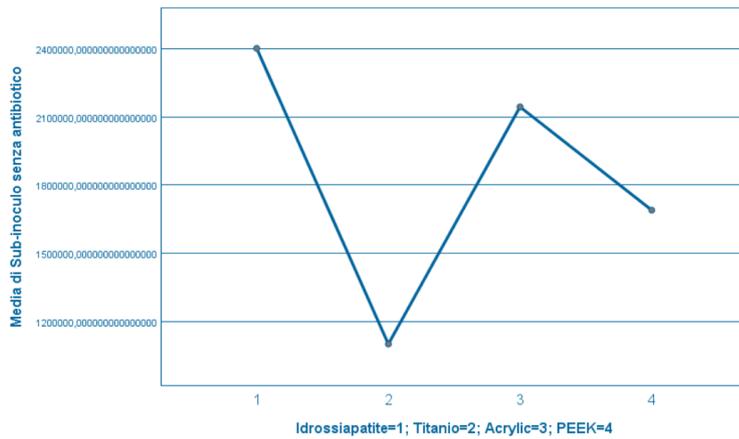
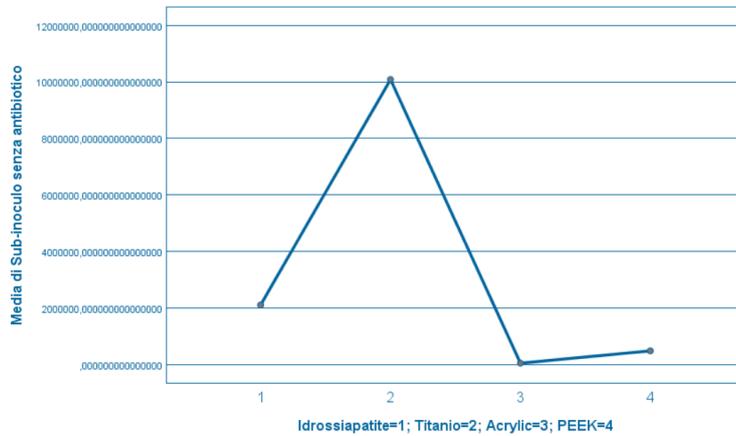




**Prove di inoculo pr MRSA. In alto 43300, al cenro 3503, in basso 3508. E' evidente la preopnderanza di idrossiapatite in termini di formazione colonie**

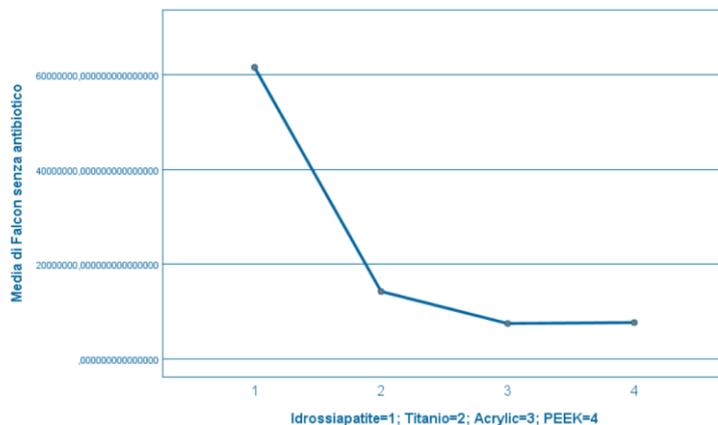
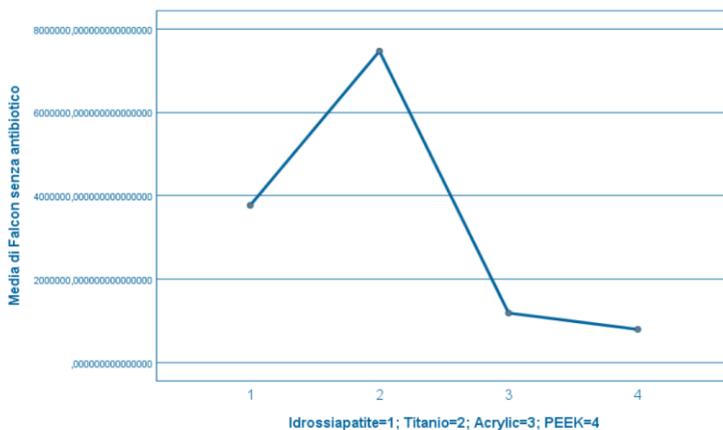
Andando ad esaminare la serie di sub-inoculo, in assenza di antibiotici, per MRSA 43300 era il titanio il materiale peggiore ( $1,01E+07$ ), seguito da idrossiapatite ( $2,10E+06$ ), PEEK ( $4,80E+05$ ) e resina ( $4,51E+04$ ). Per MRSA 3503 l'idrossiapatite si riconfermava materiale peggiore ( $2,40E+06$ ), sebbene seguito a breve distanza da tutti gli altri (resina =  $2,15E+06$ , PEEK =  $1,69E+06$ , titanio =  $1,10E+06$ ). Per MRSA 3508 infine, l'idrossiapatite mostrava maggiore colonizzazione ( $8,72E+06$ ) rispetto al PEEK ( $3,04E+05$ ), al titanio ( $2,12E+05$ ) ed alla resina acrilica ( $2,12E+05$ ). Dal punto di vista del peggior materiale sui tre ceppi, questo risultava essere l'idrossiapatite ( $4,41E+06$ ), seguita da vicino dal titanio ( $3,80E+06$ ) ed entrambi ben distaccati dal PEEK ( $8,25E+05$ ) e dalla resina acrilica ( $7,70E+05$ ), fra loro praticamente equivalenti. In termini di struttura di superficie, i materiali

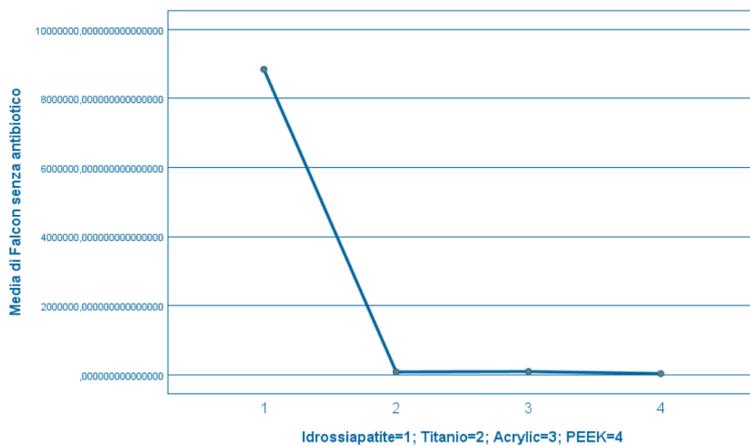
irregolari restavano i più colonizzati (idrossiapatite + titanio =  $4,10E+06$ , Vs PEEK e resina =  $7,97E+05$ ).



**Al subinoculo senza antibiotico, idrossiapatite resta il materiale più colonizzato**

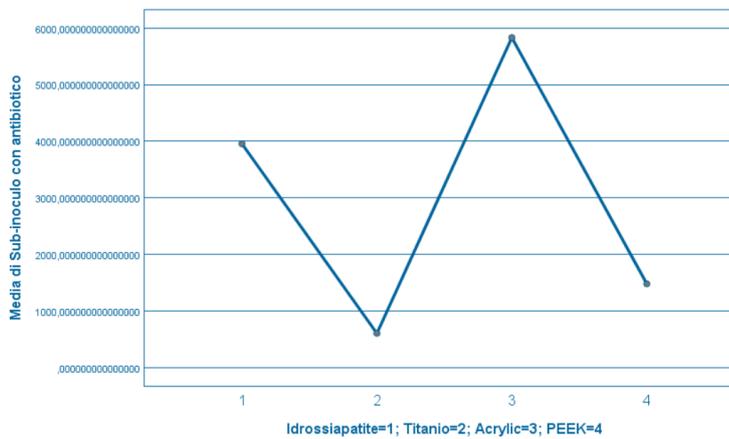
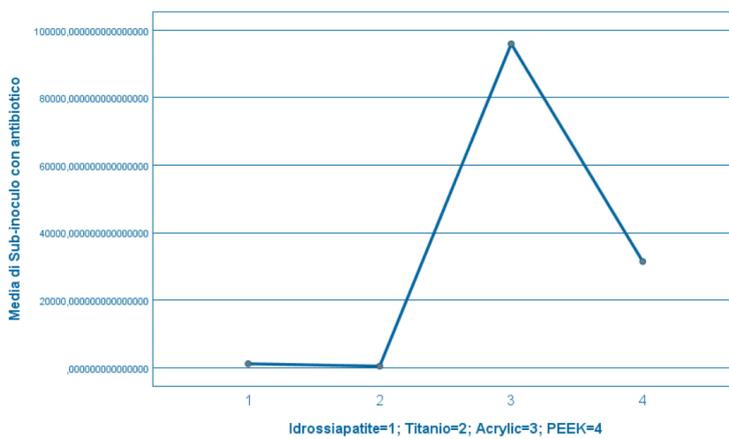
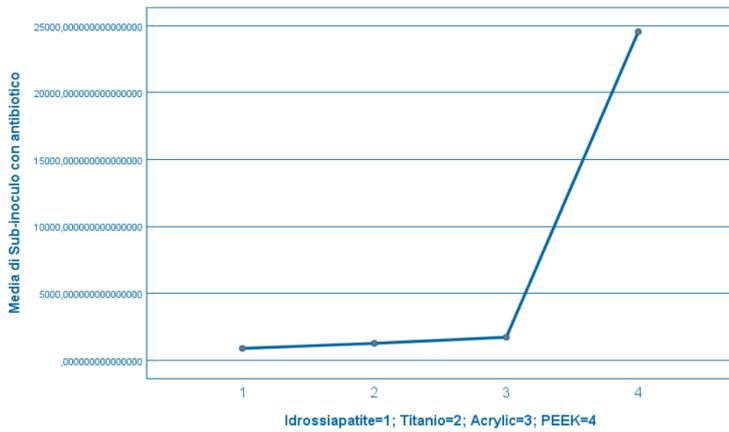
Per la serie in falcon device senza antibiotico, per MRSA 43300 era nuovamente il titanio il peggior materiale ( $7,47E+06$ ), seguito da idrossiapatite ( $3,77E+06$ ), resina acrilica ( $1,19E+06$ ) ed infine PEEK ( $7,94E+05$ ). Al contrario, per MRSA 3503 il peggior materiale si riconfermava l'idrossiapatite ( $6,17E+07$ ), seguita dal titanio ( $1,42E+07$ ), dal PEEK ( $7,65E+06$ ) e dalla resina ( $7,45E+06$ ), senza differenze negli ultimi due. Per MRSA 3508, idrossiapatite era ancora il substrato più colonizzato ( $8,84E+06$ ), seguita dalla resina ( $9,08E+04$ ), dal titanio ( $7,99E+04$ ) e dal PEEK ( $3,03E+04$ ). In termini di materiale sulle tre specie, l'idrossiapatite si confermava come il più colonizzato ( $2,48E+07$ ), seguito da tutti gli altri ma senza grossolane differenze (titanio =  $8,18E+06$ , resina =  $2,95E+06$  e PEEK =  $2,80E+06$ , identici fra loro gli ultimi due). Dal punto di vista della superficie di materiale, titanio ed idrossiapatite restavano i preferiti da tutte e tre le specie di *Stafilococco* multiresistente ( $1,65E+07$ ) rispetto a PEEK e resina ( $2,88E+06$ ).





**Anche in falcon device senza antibiotico idrossiapatite prevale, eccetto per una lieve differenza con titanio in 43300**

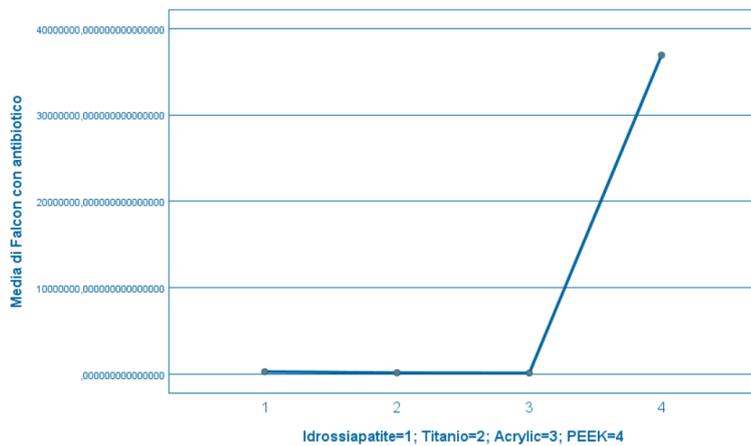
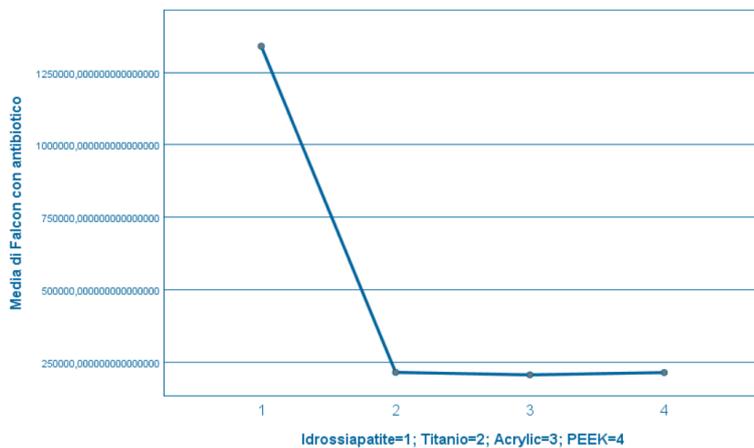
Che effetti ha la somministrazione di antibiotico? Nella serie sub-inoculo con antibiotico per MRSA 43300, è il PEEK a mostrarsi come materiale peggiore ( $2,46E+04$ ), seguito dalla resina ( $1,72E+03$ ), dal titanio ( $1,26E+03$ ) e dall'idrossiapatite ( $8,77E+02$ ). Per MRSA 3503, è la resina acrilica il peggior materiale ( $9,60E+04$ ), seguita dal PEEK ( $3,15E+04$ ), dall'idrossiapatite ( $1,14E+03$ ) e dal titanio ( $4,33E+02$ ). Infine, per MRSA 3508, è ancora la resina a mostrarsi come il substrato più colonizzato ( $5,83E+03$ ), stavolta seguita da idrossiapatite ( $3,96E+03$ ), PEEK ( $1,48E+03$ ) e titanio ( $6,03E+02$ ). Per quanto attinente alla media dei materiali per le tre specie, è la resina il peggior materiale ( $3,45E+04$ ), seguita dal PEEK ( $1,92E+04$ ), entrambi ben distanziati dall'idrossiapatite ( $1,99E+03$ ) e dal titanio ( $7,64E+02$ ). In termini di struttura di superficie, in presenza di antibiotico *Aureus* sembra crescere meglio su superfici regolari (PEEK + resina =  $2,68E+04$ ), rispetto alle irregolari (idrossiapatite + titanio =  $1,38E+03$ ).

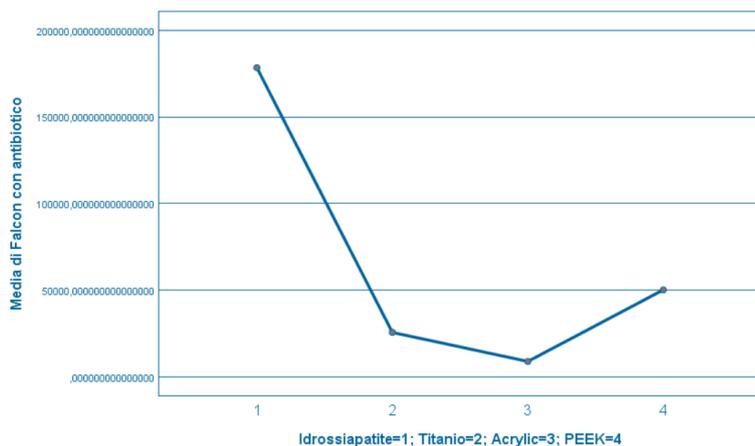


**In sub-inoculo con antibiotico, i materiali meno performanti sono quelli plastici, PEEK ed acrilico, a superficie regolare**

Nella serie falcon device con antibiotico, in MRSA 43300 è nuovamente l'idrossiapatite il materiale a maggior rischio di colonizzazione ( $1,49E+06$ ), seguita da resina acrilica ( $1,42E+05$ ), PEEK

(1,35E+05) e titanio (1,29E+05), praticamente equivalenti fra loro. Per MRSA 3503, è il PEEK a primeggiare (3,69E+07), seguito da idrossiapatite (2,62E+05), titanio (1,41E+05) ed infine resina acrilica (1,07E+05). Per MRSA 3508, l'idrossiapatite viene maggiormente colonizzata (1,78E+05), a scapito di PEEK (5,01E+04), titanio (2,55E+04) e resina (8,78E+03). In termini di media per le tre specie, è il PEEK il materiale più colonizzato (1,24E+07), seguito dall'idrossiapatite (6,45E+05), dal titanio (9,87E+04) ed infine dalla resina (8,61E+04). Per quanto attinente alla specificità per i materiali, ancora una volta prevalgono quelli regolari (PEEK + resina = 6,23E+06), rispetto agli irregolari titanio ed idrossiapatite (3,72E+05).





**PEEK ed idrossiapatite sono entrambi colonizzati in falcon con antibiotico, con minore risposta alla terapia**

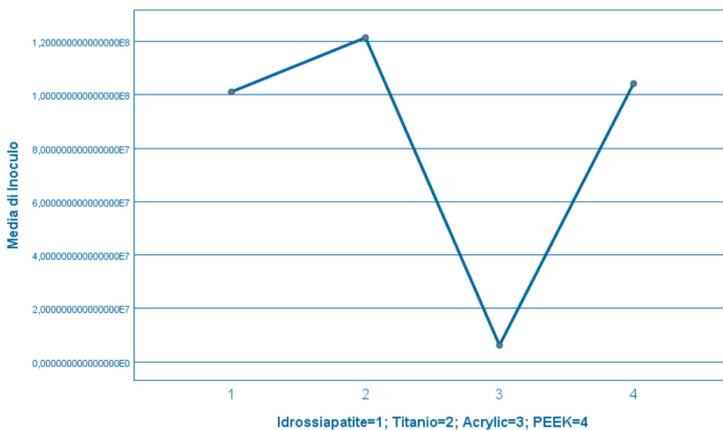
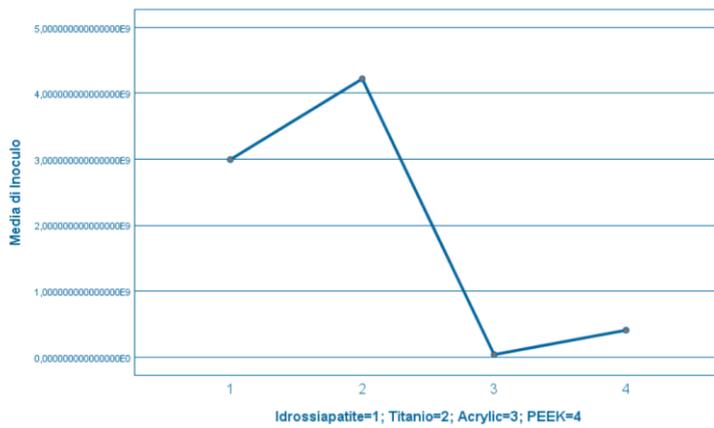
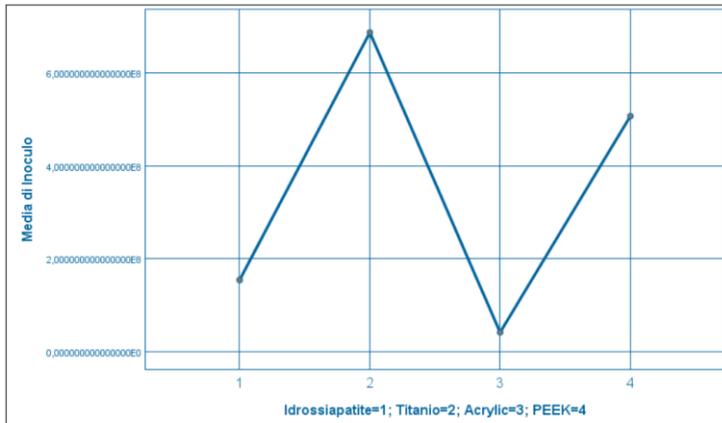
Come interpretare questi dati? In primo luogo, sembra evidente la propensione di *Aureo* a crescere sull'idrossiapatite. Questo risultato non giunge inatteso, considerato, come detto in partenza, che la stragrande maggioranza delle infezioni di opercolo autologo (oltre l'80%) è causata da un germe della famiglia degli Stafilococchi e considerata la forte similitudine strutturale fra l'idrossiapatite e l'osso autologo. Inoltre, in tutte e tre le tipologie di prove effettuate senza somministrazione di antibiotico, i materiali a superficie irregolare (idrossiapatite e titanio) sono risultati sempre i più facilmente colonizzabili. Nonostante siano ovviamente necessari studi di più ampio respiro, l'elevato numero di prove effettuate fa pensare che, per pazienti in cui si sia avuta un'infezione di cranioplastica biologica, sia osso autologo o idrossiapatite, la rimozione della stessa e la sua sostituzione con un altro materiale biologico potrebbe facilitare la reinfezione. Sarebbe inoltre, data la differenza intrinseca nelle prove di sub-inoculo e falcon device, che sia il biofilm creato da *Aureus* in corrispondenza della cranioplastica (epidurale, sottocutaneo in corrispondenza del lembo) sia quello residente in periferia della stessa, siano in grado di ricolonizzare il materiale preferito con la stessa efficacia, il che ci conferma nella necessità di effettuare una toilette chirurgica quanto più aggressiva possibile nell'area infetta, oltre alla rimozione dell'impianto. A corollario di ciò, la sostituzione con un materiale a superficie irregolare, come la maglia di titanio preformata, potrebbe anch'esso essere controindicato,

facilitando al batterio il compito di colonizzare il nuovo substrato. In questi casi, qualora si volesse procedere ad una sostituzione immediata della calotta cranica, sarebbe più opportuno utilizzare un materiale a superficie regolare e poco colonizzabile, come il PEEK o la resina acrilica. Per quanto attinente ai dati sulla somministrazione di antibiotico, in fase di sub-inoculo si nota una netta riduzione del numero di colonie su titanio ed idrossiapatite rispetto a PEEK e resina acrilica. Sebbene nella serie falcon device questa tendenza sia confermata, è però di dimensioni ridotte. Ciò potrebbe essere dovuto a differenze genetiche fra i 3 ceppi batterici in termini di antibiotico-resistenza, ma potenzialmente anche alle caratteristiche di superficie dei materiali. Infatti, l'antibiotico-terapia sembra far prevalere i batteri capaci di formarsi su superfici regolari, quindi in grado di formare biofilm estesi e compatti, molto ben difesi, rispetto a quelli tridimensionalmente meno compatti nati su materiali "anfrattuosi". La differenza fra somministrazione e non somministrazione di antibiotico è ovviamente una pura condizione di laboratorio, non realizzabile in clinica. In caso di necessità di sostituire una cranioplastica infetta dovremmo utilizzare un materiale non irregolare solo perché stiamo somministrando antibiotici? La risposta è no, in prima istanza perché non dobbiamo dimenticare che l'ospite possiede un suo sistema immunitario, che potrebbe colmare il gap in termini di risultato, in secondo luogo, il dato ci dice semplicemente che, se usassimo l'antibiotico, i materiali come titanio ed idrossiapatite risponderebbero meglio, ma comunque la carica UFC non si ridurrebbe a zero, aumentando pertanto il rischio di reinfezione. Sceglieremmo dunque il materiale meno colonizzabile, supportando l'antibiotico al trattamento di toilette chirurgica, in grado di ridurre la carica batterica di partenza nel tessuto ospite e minimizzare l'effetto re-infezione. Volendolo interpretare in maniera differente, questo dato può anche dirci che se nel provvedere alla sostituzione della cranioplastica infetta con un materiale come PEEK o resina acrilica questo si reinfettasse, le possibilità di controllare un'infezione, anche precoce, con la sola terapia antibiotica, sarebbero ridotte.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

La forma multiresistente della *Pseudomonas aeruginosa* è ormai un germe ospedaliero estremamente comune, nonché ad alta letalità. Nel nostro ospedale la sua presenza si è affermata negli ultimi 10 anni.

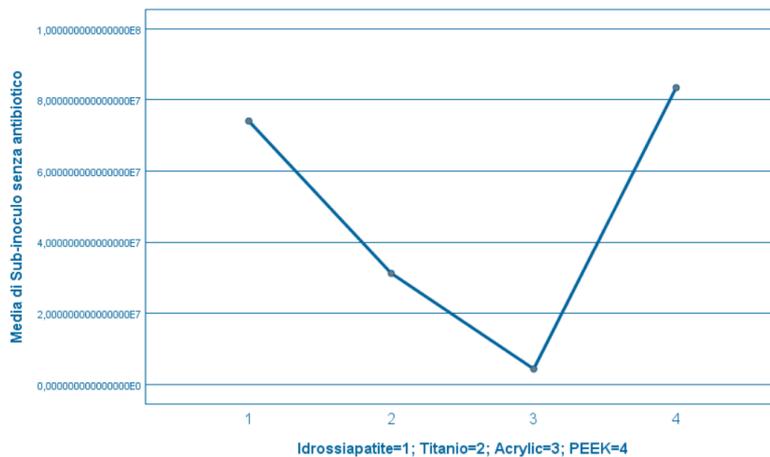
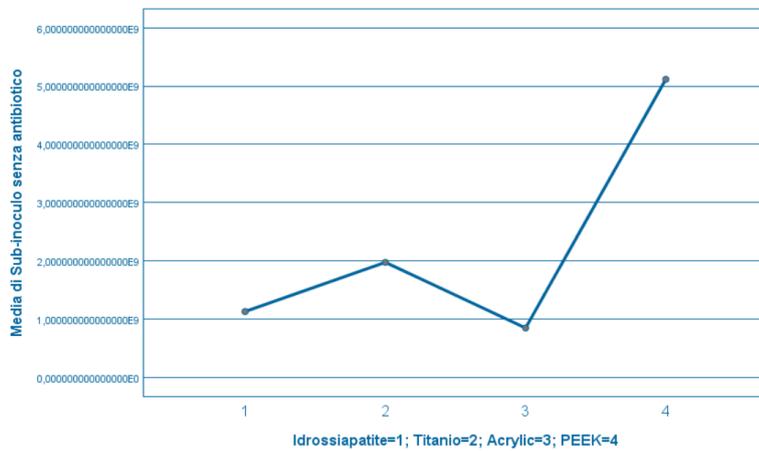
Nelle prove di inoculo, il primo ceppo testato, P.a. ATCC 27853, ha mostrato un'elevata affinità sia per il titanio ( $6,88E+08$ ), che per il PEEK ( $5,08E+08$ ), seguiti dall'idrossiapatite ( $1,54E+08$ ) ed infine dalla resina acrilica ( $4,11E+07$ ). Il secondo ceppo, P.a.778, ha confermato una imponente colonizzazione del titanio ( $4,22E+09$ ), similmente dell'idrossiapatite ( $2,99E+09$ ), nettamente minore nel caso del PEEK ( $4,07E+08$ ) ed ancora di più per la resina acrilica ( $3,63E+07$ ). Il terzo ceppo, P.a.780, ha mostrato ancora una volta maggiore facilità nel formare colonie sul titanio ( $1,21E+08$ ), quasi alla pari con il PEEK ( $1,04E+08$ ) e l'idrossiapatite ( $1,01E+08$ ), questi ultimi praticamente con la stessa UFC. Resta indietro e di molto, ancora una volta, la resina acrilica ( $6,22E+06$ ). Considerando i materiali per tipologia, titanio e idrossiapatite risultavano i più adatti per la formazione di colonie, con il titanio leggermente peggiore ( $1,68E+09$  contro  $1,08E+09$ ). Il terzo peggior materiale si confermava il PEEK ( $3,39E+08$ ), al contrario della resina acrilica che risultava essere quello meno colonizzabile ( $2,79E+07$ ) e pertanto il miglior materiale. Analizzando i materiali in merito alle caratteristiche di superficie, emergeva una netta differenza a favore di una maggiore colonizzazione dei materiali a superficie irregolare (titanio ed idrossiapatite,  $1,38E+09$ ), rispetto a quelli a superficie regolare (PEEK e resina acrilica,  $1,84E+08$ ), differenza non nettissima e su cui pesava sicuramente la forte colonizzazione subita dal PEEK.

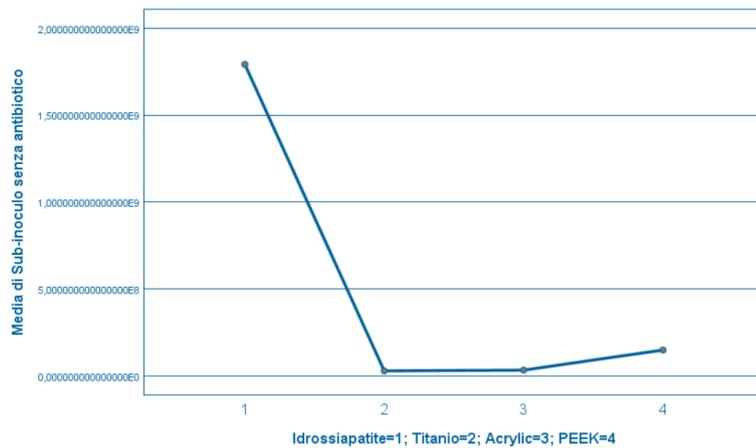


**Pseudomonas ATCC, 778, 780 in prova di inoculo. Titanio e PEEK sono i materiali più colonizzati, seguiti da idrossiapatite.**

Per le prove di sub-inoculo senza antibiotici, P.a. ATCC mostrava una forte tendenza a reinfectare il PEEK (5,12E+09), il titanio (1,97E+09) ed in misura leggermente minore l'idrossiapatite (1,13E+09) con la resina acrilica migliore performer (8,46E+08). P.a. 778 mostrava anch'essa maggiore

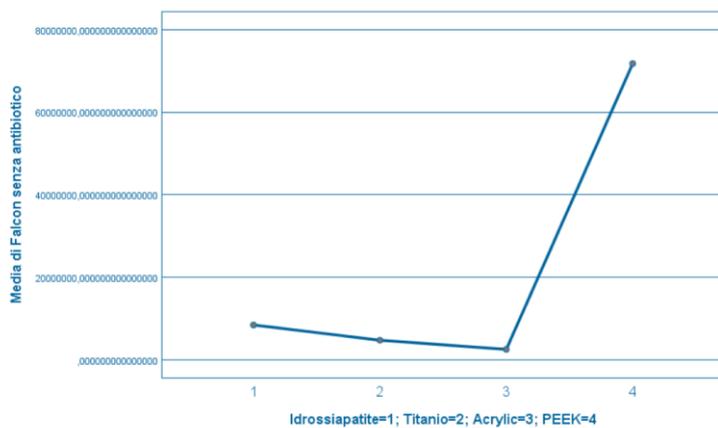
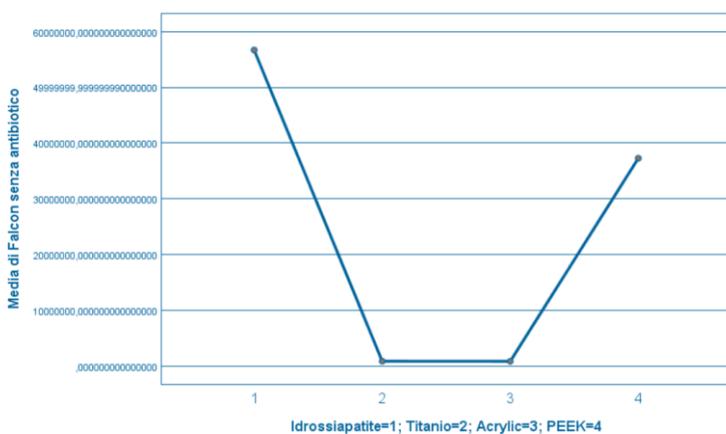
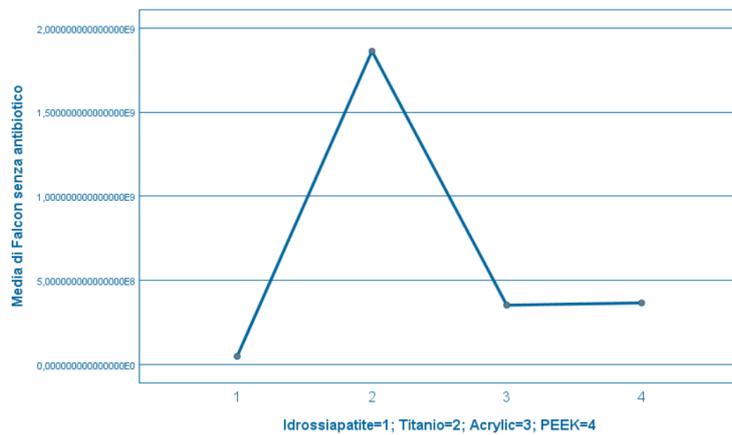
colonizzazione del PEEK ( $8,35E+07$ ), seguito da idrossiapatite ( $7,41E+07$ ) e titanio ( $3,12E+07$ ) e solo da ultimo dalla resina acrilica ( $4,33E+06$ ). P.a. 780 sembrava preferire idrossiapatite ( $1,79E+09$ ) e PEEK ( $1,48E+08$ ), seguiti a pari distanza da resina acrilica ( $3,22E+07$ ) e titanio ( $3,13E+07$ ), sostanzialmente equivalenti. Prendendo in esame le singole tipologie di materiale, il PEEK si confermava il materiale peggiore (UFC media  $1,78E+09$ ), seguito dal titanio ( $1,00E+09$ ) e con minima differenza dalla idrossiapatite ( $9,98E+08$ ) e dalla resina acrilica ( $2,94E+08$ ). In relazione alla struttura dei singoli materiali, non si apprezzava una vera differenza (resina + PEEK =  $1,04E+09$ , idrossiapatite + titanio =  $9,98E+08$ ).





**In subinoculo è il PEEK il peggior performer, sebbene in P.a. 780 idrossiapatite sembri avere una maggiore colonizzazione.**

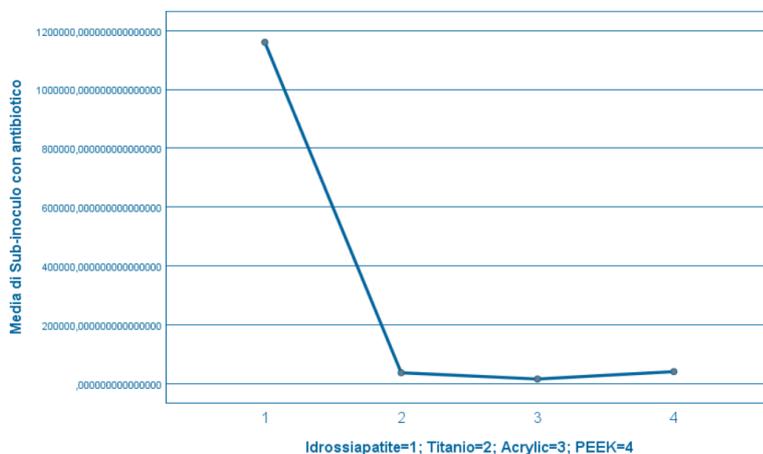
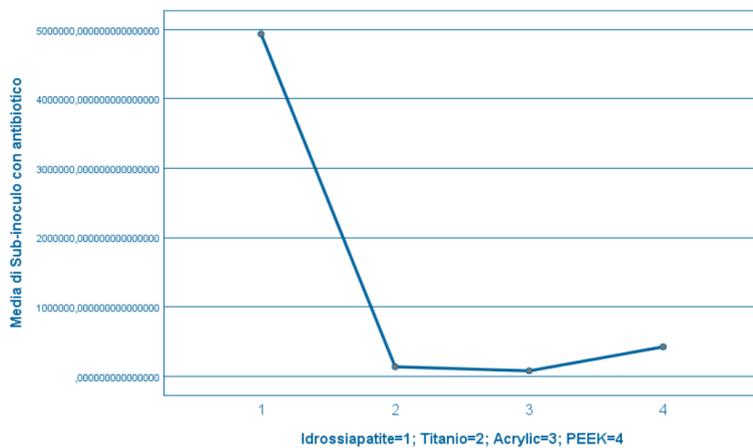
Per la prova in falcon device senza antibiotico, il ceppo P.a ATCC mostrava elevata colonizzazione su titanio ( $1,86E+09$ ), seguito da PEEK ( $3,65E+08$ ) e resina acrilica ( $3,52E+08$ ), pressochè sovrapponibili e minor colonizzazione per l'idrossiapatite ( $4,70E+07$ ). Il ceppo P.a. 778 mostrava maggiore tendenza a colonizzare idrossiapatite ( $5,67E+07$ ) e PEEK ( $3,73E+07$ ), con discreta colonizzazione del titanio ( $5,28E+06$ ) e bassa colonizzazione della resina acrilica ( $8,33E+05$ ). Infine, il ceppo P.a. 780 mostrava elevato tropismo per il PEEK ( $7,18E+07$ ) e l'idrossiapatite ( $8,41E+06$ ), seguita dal titanio ( $4,71E+06$ ) e dalla resina ( $2,49E+06$ ). In termini di tipologia di materiale, il titanio sembrava il materiale peggiore per la media delle tre specie ( $6,24E+08$ ), insieme con il PEEK ( $1,58E+08$ ) e la resina acrilica ( $1,18E+08$ ), laddove l'idrossiapatite risultava il materiale migliore ( $3,74E+07$ ). Per quanto riguardava il tipo di superficie, si osservava una modestissima prevalenza dei materiali irregolari (titanio + idrossi =  $3,31E+08$ ), comunque non significativa al confronto con quelli a contorno regolare (PEEK + resina =  $1,38E+08$ ).

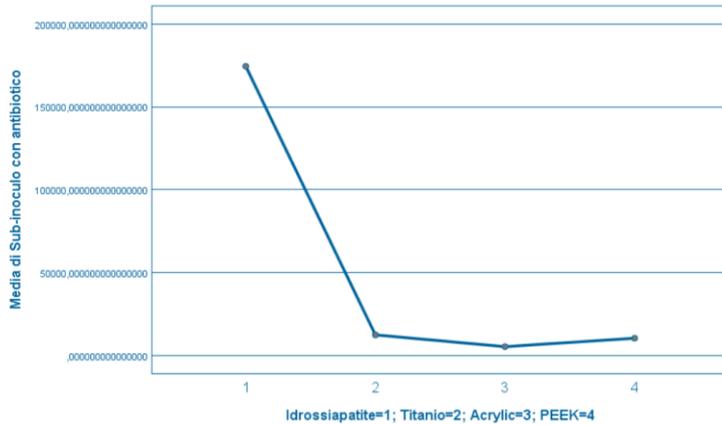


**In falcon device il PEEK tende ad essere il materiale più colonizzato, ma è il titanio in termine percentuali nelle tre specie ad ermegere come il peggiore**

Per la prova di sub-inoculo con antibiotico, P.a. ATCC il materiale peggiore diventava l'idrossiapatite (4,94E+06), seguita dal PEEK (4,23E+05), dal titanio (1,36E+05) e dalla resina (7,67E+04),

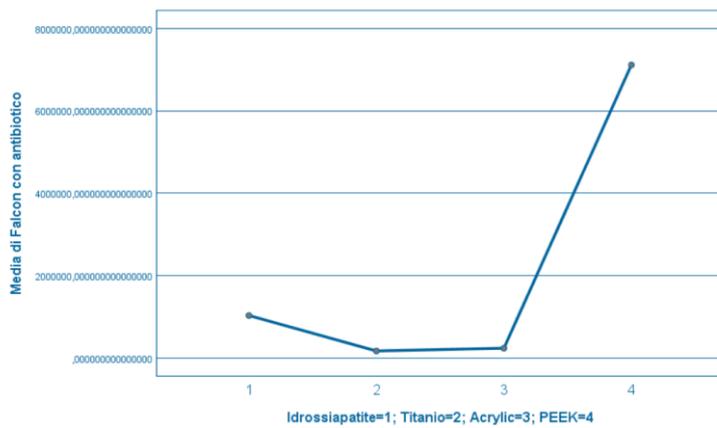
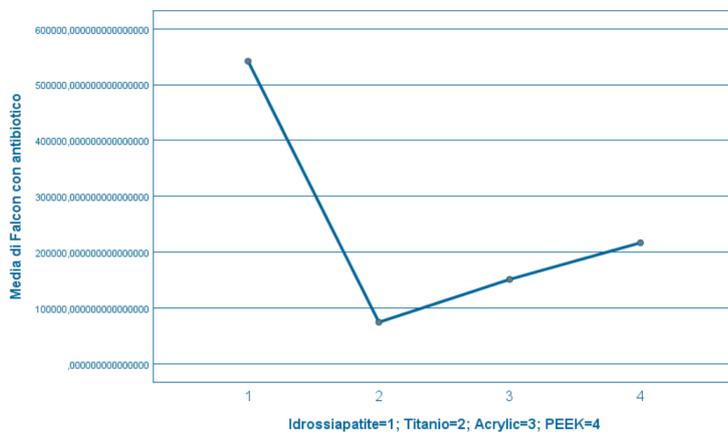
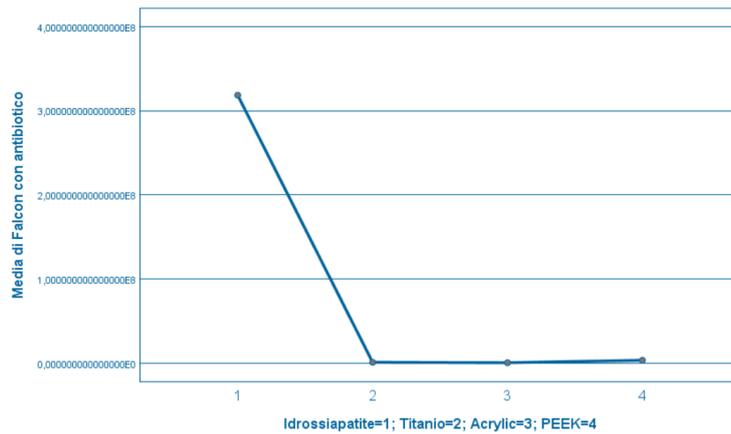
nettamente identificata come il materiale migliore. Anche per P.a. 778 l'idrossiapatite restava il peggior materiale ( $1,16E+06$ ), seguito a netta distanza dal PEEK ( $4,03E+04$ ), dal titanio ( $3,65E+04$ , sovrapponibile al PEEK) e dalla resina acrilica ( $1,52E+04$ ). Infine, per P.a. 780, l'idrossiapatite si confermava il materiale peggiore ( $1,74E+05$ ), seguita dal titanio ( $1,23E+04$ ) e dal PEEK ( $1,03E+04$ ) e a significativa distanza dalla resina ( $1,03E+04$ ). Dall'analisi dei materiali, l'idrossiapatite si confermava il peggiore in termini di UFC media ( $2,09E+06$ ), seguita dal PEEK ( $1,58E+05$ ), dal titanio ( $6,15E+04$ ) e dalla resina acrilica ( $3,24E+04$ ), vicina per colonizzazione al titanio. In termini di caratteristiche di superficie, dopo somministrazione di antibiotico sembrava emergere una preferenza di *Pseudomonas* per i materiali irregolari (idrossiapatite+titanio =  $1,08E+06$ ) rispetto a quelli regolari (PEEK + resina =  $9,52E+04$ ).





**In sub-inoculo con antibiotico idrossiapatite è il materiale peggiore, senza alcuna differenza fra i 3 ceppi**

Per le prove in falcon device con antibiotico, P.a. ATCC mostrava elevata colonizzazione dell'idrossiapatite ( $3,18E+08$ ), seguita dal PEEK ( $3,27E+06$ ), dal titanio ( $8,09E+05$ ) e dalla resina acrilica ( $3,72E+05$ ). P.a. 778 sembrava preferire il PEEK ( $7,11E+06$ ) e l'idrossiapatite ( $1,03E+06$ ), con minore tropismo per la resina acrilica ( $2,34E+05$ ) e per il titanio ( $1,67E+05$ ). In P.a. 780 idrossiapatite tornava ad essere il materiale peggiore ( $1,67E+05$ ), ma in vicinanza con il PEEK ( $2,17E+05$ ), la resina acrilica ( $1,51E+05$ ) e solo da ultimo il titanio ( $7,43E+04$ ). Riguardo alla tipologia di materiale, l'idrossiapatite presentava la maggiore probabilità di colonizzazione nonostante l'antibiotico ( $1,07E+08$ ), seguita dal PEEK ( $3,53E+06$ ) e dal titanio ( $3,50E+05$ ). Materiale migliore risultava la resina acrilica ( $2,52E+05$ ). Per quanto attinente alla diversità di superfici, se esposta all'antibiotico in falcon *Pseudomonas* preferisce ancora una volta, quelle irregolari (idrossiapatite + titanio =  $5,35E+07$ ) rispetto a quelle regolari (PEEK + resina =  $1,89E+06$ ).



**In falcon device con antibiotico P.a. ATCC e 778 sembrano prediligere l'idrossiapatite, P.a. 780 il PEEK**

Quali sono pertanto i risultati dell'analisi della performance di *Pseudomonas*? In tutte le prove senza antibiotico, *Pseudomonas* sembra preferire titanio e PEEK, leggermente meno idrossiapatite e poco la resina acrilica. Laddove per le prove di inoculo il titanio è sicuramente il materiale peggiore, seguito

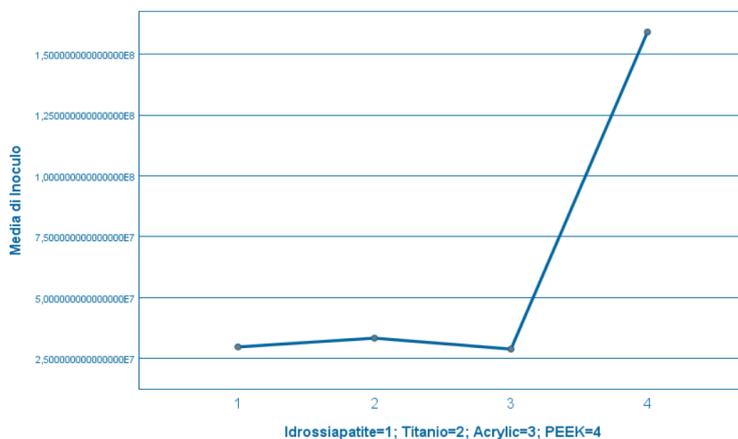
da idrossiapatite, al sub-inoculo è il PEEK a prevalere, distanziando anche se non significativamente il titanio. Allo stesso modo, nelle prove in falcon device è il titanio ad infettarsi di più, seguito dal PEEK. Dal punto di vista clinico, in caso di necessità di sostituzione immediata di una cranioplastica, il materiale più adatto da selezionare sembrerebbe dunque la resina acrilica, quello da escludere in modo assoluto il titanio. Sebbene l'idrossiapatite possa sembrare una buona alternativa, l'impossibilità di averla a disposizione in caso di bisogno immediato finirebbe per escluderla. Per questo germe, la struttura di superficie non sembra avere alcuna significativa importanza, emergendo solo una minima prevalenza di adesione per i materiali a struttura meno regolare, comunque non significativa. La risposta di *Pseudomonas* alla terapia antibiotica è nettamente maggiore nelle prove di sub-inoculo, in alcuni casi con riduzione dell'esponente di carica fino ad una potenza di 4. Nonostante ciò il materiale meno responsivo è sicuramente l'idrossiapatite, il più responsivo il titanio. La stessa evidenza, con idrossiapatite peggior responder e titanio migliore è osservabile nelle prove in falcon device antiobiotico. Ancora una volta, tradotto in termini clinici, sembrerebbe che dopo sostituzione di una precedente plastica infetta con idrossiapatite, in caso di reinfezione della stessa, comunque fra le più probabili, l'infezione sembrerebbe non dare scampo alla cranioplastica. Nel caso di uso del titanio, la risposta alla terapia sarebbe migliore, gravata comunque dalla tendenza globale del germe ad infettarlo di più rispetto agli altri materiali. Curiosamente, laddove in assenza di terapia antibiotica non emerge per *Pseudomonas* una propensione in relazione alla struttura di superficie dei materiali, intraprendere la terapia antibiotica fa spostare il germe verso quelli a superficie irregolare. Questo fa presupporre un'organizzazione spaziale dei biofilm di *pseudomonas* più adatta a nascondersi in strutture anfrattuose, pertanto meno abituata a formare colonie di superficie estese. Considerata la buona risposta della resina acrilica alla terapia antibiotica, la resina stessa sarebbe da considerare un buon sostituto in caso di rimozione immediata di una plastica infetta e sua sostituzione: infatti, da quanto detto sopra, emerge come il posizionarla avrebbe un ridotto rischio di reinfezione e contemporaneamente, in caso della stessa, una buona risposta alla terapia antibiotica.

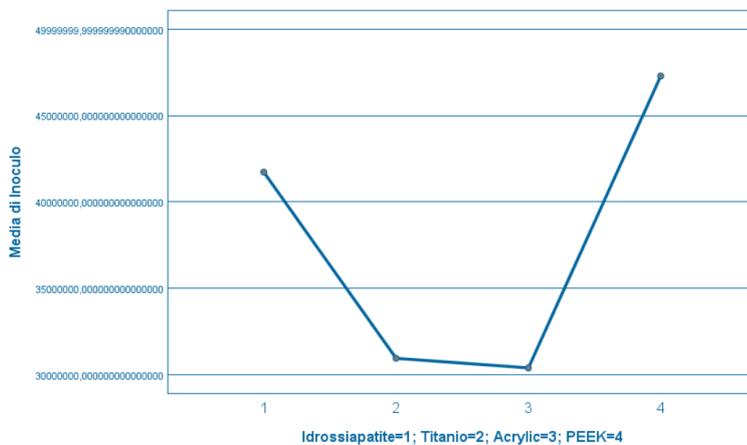
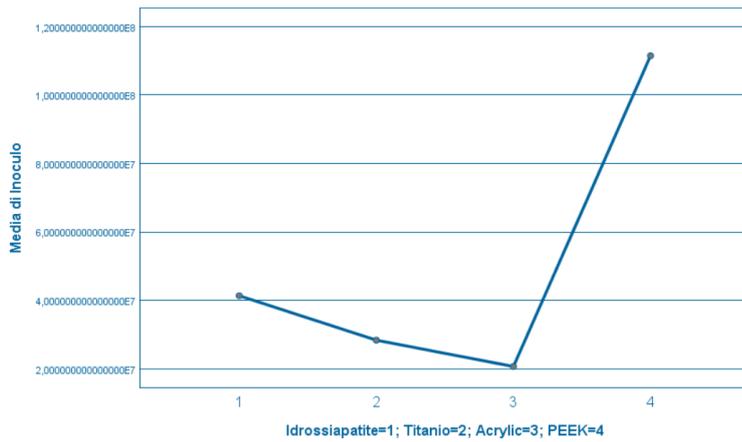
## *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* è stato probabilmente il primo fra i germi multiresistenti ad emergere dalle rianimazioni. Germe respiratorio, non ha trovato difficoltà nell'interessare altri distretti, fra cui quello intracranico, dimostrando la sua incredibile aggressività.

Negli esperimenti di inoculo *Klebsiella* ha presentato un comportamento ben identificabile in relazione alla propensione per materiale.

Per il ceppo 700603, il materiale peggiore è risultato il PEEK (1,59E+08), seguito pressochè a pari merito da titanio (3,33E+07), idrossiapatite (2,97E+07) e resina acrilica (2,88E+07). Anche per il ceppo 8107 il PEEK resta il materiale peggiore (4,73E+07), sebbene di poco, rispetto a idrossiapatite (4,17E+07), titanio (3,09E+07) e resina acrilica (3,04E+07). Da ultimo, anche per il ceppo 8104 il PEEK resta il materiale più adatto alla colonizzazione (1,11E+08), seguito a grande distanza da idrossiapatite (4,13E+07), titanio (2,83E+07) e resina acrilica (2,07E+07). Dividendo i materiali per tipologia il PEEK restava ovviamente il peggiore (1,06E+08), l'acrilico il meno colonizzato (2,66E+07), l'idrossiapatite il secondo materiale più colonizzato (3,76E+07), seguito dal titanio (3,09E+07). Andando a considerare i materiali per caratteristiche di superficie, non si osservavano significative differenze fra i materiali, con PEEK e resina acrilica che mostravano una UFC media di 6,63E+07 rispetto al 3,42E+07 di titanio e idrossiapatite.

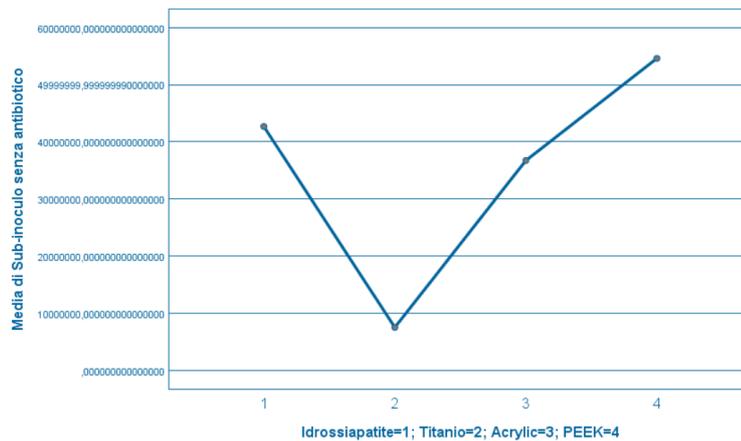
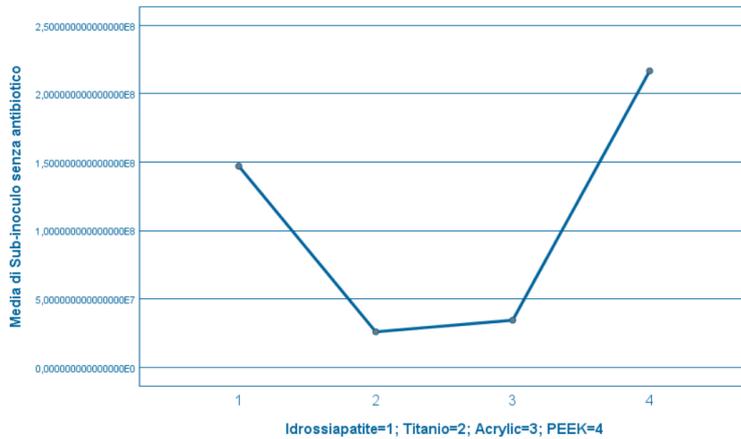




**Fase di inoculo in Klebsiella, specie incluse ATCC, 8107 ed 8104. Peek è evidentemente il materiale preferito da questo germe, che mostra però anche propensione verso l'idrossiapatite.**

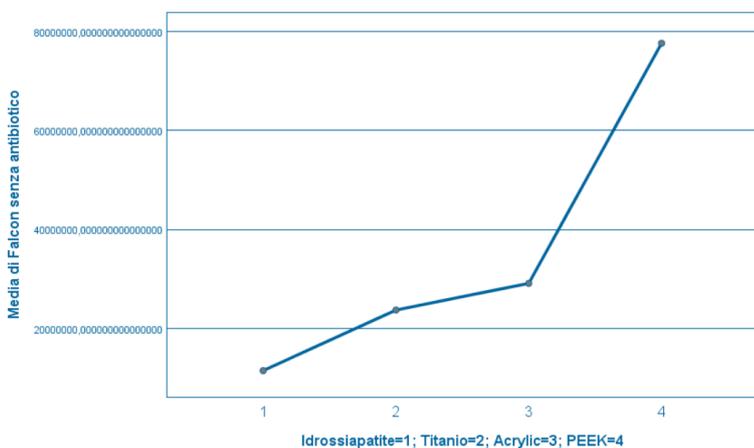
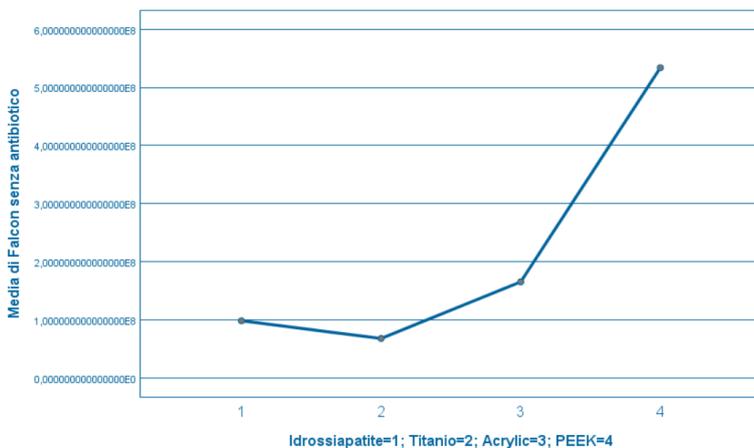
Nella serie subinoculo in assenza di somministrazione antibiotica, K.pn.700603 mostrava ancora una volta una predilezione per il PEEK (2,17E+08), sebbene in questo caso emergesse una simile tendenza alla crescita anche su idrossiapatite (1,47E+08), con resina acrilica (3,44E+07) e titanio (2,59E+07) più distanziati. Per K.pn. 8104, si osservava una tendenza, sebbene minima, a preferire ancora una volta il PEEK (5,46E+07), seguito da idrossiapatite (4,27E+07), resina acrilica (3,67E+07) e titanio (7,51E+06), quest'ultimo nettamente meno colonizzato. Anche per K.pn. 8107 PEEK è il materiale di scelta (1,13E+08), seguito da idrossiapatite (6,60E+07), resina acrilica (2,14E+07) e titanio (1,70E+07). Osservando i materiali per tipologia, la media della UFC per il PEEK nei tre ceppi restava elevata rispetto agli altri materiali (1,28E+08), seguita dall'idrossiapatite (8,52E+07), dalla resina acrilica (3,08E+07) e dal titanio (1,68E+07). Dividendo i materiali per

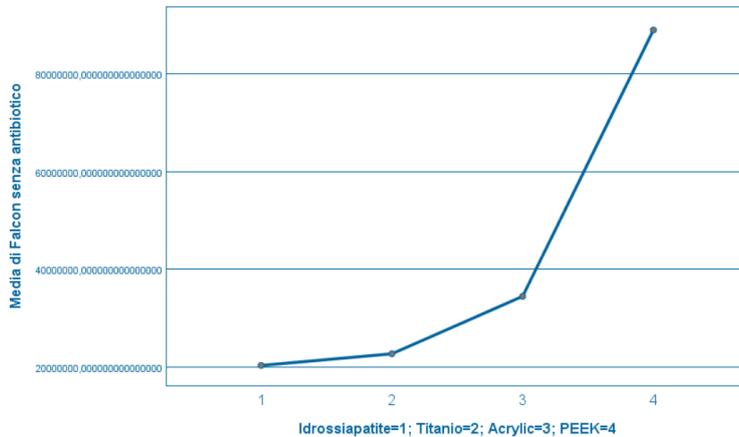
struttura, idrossiapatite e titanio risultavano meno prони alla colonizzazione ( $5,10E+07$ ) rispetto alle loro controparti plastiche ( $7,95E+07$ ), sebbene con una differenza non significativa.



In sub-inoculo senza antibiotico *Klebsiella* sembra preferire in modo assoluto il PEEK, seguito dall'idrossiapatite

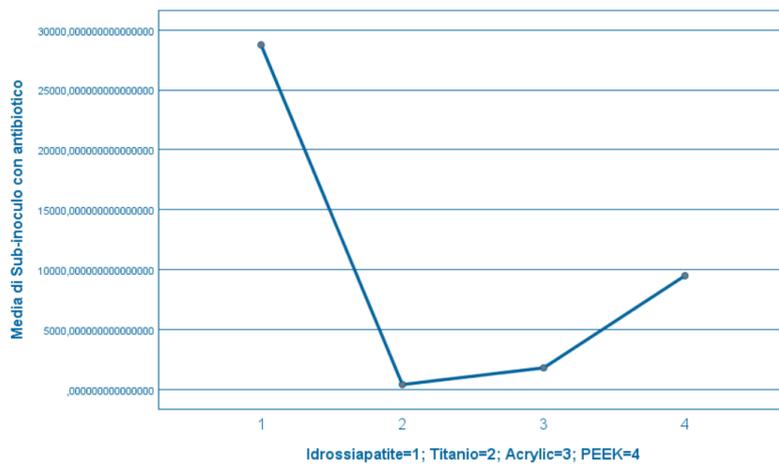
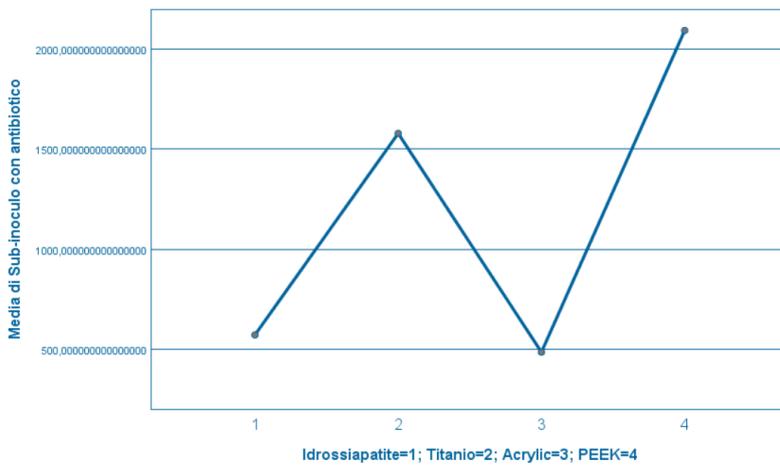
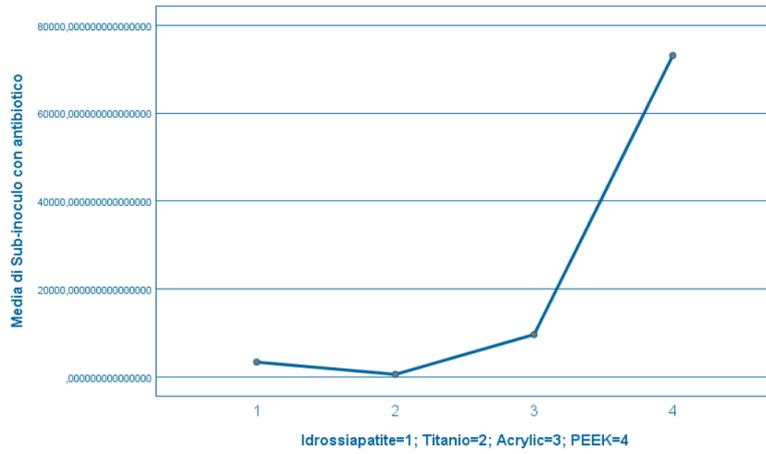
Per quanto attinente alla serie falcon device senza antibiotico, per K. Pn. 700603, PEEK risulta ancora il materiale più predisposto alla colonizzazione ( $5,34E+08$ ), seguito dalla resina acrilica ( $1,65E+08$ ), a brevissima distanza dall'idrossiapatite ( $9,82E+07$ ) ed infine dal titanio ( $6,78E+07$ ). Per K.pn. 8104, il PEEK continua a presentare una tendenza alla maggior colonizzazione ( $8,91E+07$ ), con poco scarto da resina acrilica ( $3,45E+07$ ), titanio ( $2,27E+07$ ) e praticamente a pari merito con idrossiapatite ( $2,03E+07$ ). Andamento similare mostrava K.pn. 8107, con PEEK peggior materiale ( $7,76E+07$ ), seguito però stavolta da resina acrilica ( $2,91E+07$ ), titanio ( $2,37E+07$ ) e idrossiapatite ( $1,15E+07$ ), ben distaccata. In termini di tipologia di materiali, il PEEK resta il peggiore ( $2,34E+08$ ), seguito da resina acrilica ( $7,63E+07$ ), idrossiapatite ( $4,33E+07$ ) e titanio ( $3,81E+07$ ), con valori molto vicini fra loro. Suddividendo i materiali per superficie, PEEK e resina acrilica sono i peggiori, con una UFC media complessiva di  $1,55E+08$ , rispetto al  $4,07E+07$  di titanio e idrossiapatite.





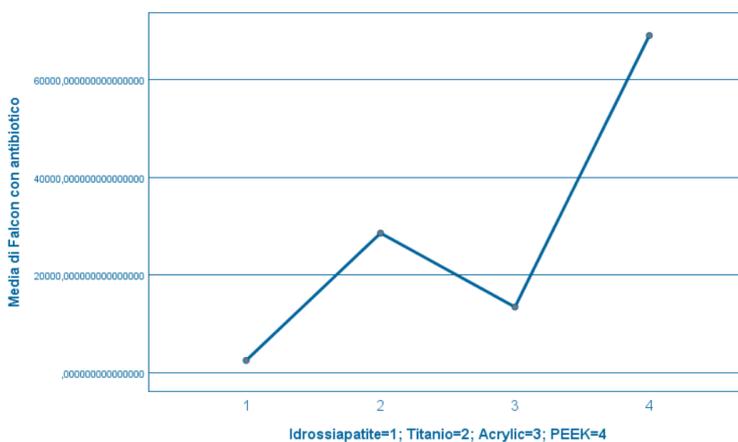
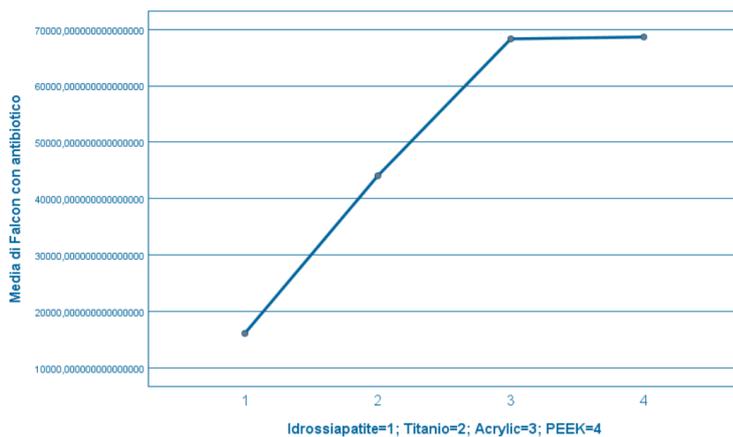
**In falcon device senza antibiotico Klebsiella continua a preferire il PEEK, sebbene in questo caso vi sia una maggiore tendenza colonizzante sulla resina acrilica**

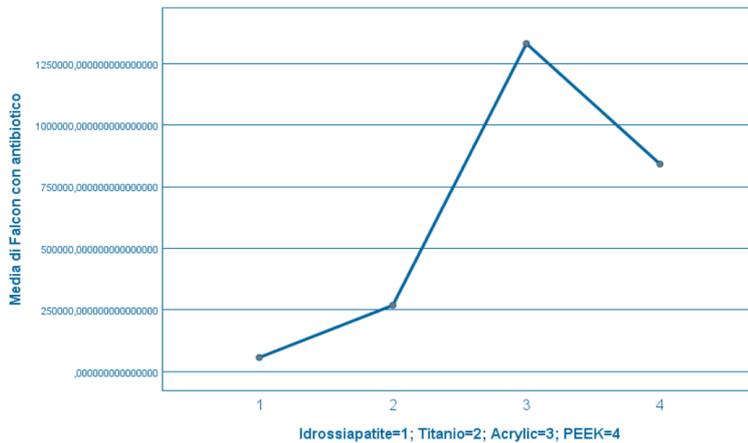
Per la serie sub-inoculo con somministrazione di antibiotici, per K.pn.700603 il materiale peggiore resta il PEEK ( $7,31E+04$ ), seguito dalla resina acrilica ( $9,61E+03$ ), dall'idrossiapatite ( $3,33E+03$ ) e dal titanio ( $5,43E+02$ ), nettamente distanziato. Per K.pn. 8104, il materiale peggiore è l'idrossiapatite ( $2,88E+04$ ), seguita però da vicino dal PEEK ( $9,49E+03$ ), dalla resina acrilica ( $1,80E+03$ ) ed infine dal titanio ( $4,00E+02$ ). Per K.pn. 8107, il materiale più colonizzabile è ancora una volta il PEEK ( $2,09E+03$ ), seguito stavolta dal titanio ( $1,58E+03$ ) e solo dopo da idrossiapatite ( $5,73E+02$ ) e resina acrilica ( $4,87E+02$ ), sostanzialmente identici. Esaminando i materiali per tipologia, il PEEK si conferma peggior materiale ( $2,82E+04$ ), seguito però dall'idrossiapatite ( $1,09E+04$ ), dalla resina acrilica ( $3,96E+03$ ) e dal titanio ( $8,41E+02$ ), miglior materiale. Suddividendo i materiali per struttura, i materiali plastici a superficie liscia e compatta sembrano più adatti alla crescita di Klebsiella ( $1,61E+04$ ), rispetto a quelli a superficie irregolare o cava ( $5,86E+03$ ).



**In sub-inoculo con antibiotico il PEEK si conferma il materiale peggiore, sebbene in K.pn.8104 emerge una preferenza per idrossiapatite (potenzialmente legata a motivi di laboratorio).**

Per la serie falcon device con antibiotico, per K.pn.700603, PEEK e resina acrilica si equivalgono (rispettivamente  $6,87E+04$  e  $6,83E+04$ ), seguiti da titanio ( $4,41E+04$ ) ed idrossiapatite ( $1,61E+04$ ), sebbene in questo campione le differenze siano da considerarsi davvero minimali. Per K.pn.8104 è la resina acrilica il peggior materiale ( $1,33E+06$ ), seguita dal PEEK ( $8,42E+05$ ), dal titanio ( $2,69E+05$ ) e dall'idrossiapatite ( $5,69E+04$ ). Infine, per K.pn. 8107, il PEEK resta il materiale più colonizzabile ( $6,91E+04$ ), inusualmente seguito dal titanio ( $2,86E+04$ ), dalla resina ( $1,34E+04$ ) e dall'idrossiapatite ( $2,49E+03$ ). Considerando i materiali per tipologia, è la resina acrilica a dominare, seppure di poco, in questa serie ( $4,71E+05$ ), seguita sempre e comunque dal PEEK ( $3,27E+05$ ), dal titanio ( $1,14E+05$ ) e dall'idrossiapatite ( $2,52E+04$ ). Infine, considerando i materiali per superficie, PEEK e resina acrilica ( $3,99E+05$ ) distaccano ancora una volta idrossiapatite e titanio ( $6,95E+04$ ).





**In falcon device, K.pn conferma di preferire i materiali plastici, in particolare il PEEK. Ancora una volta 8104 mostra una variazione rispetto agli altri ceppi, ma la differenza in termini di colonie fra PEEK e resina acrilica resta minima.**

Dall'analisi dei dati riportati emerge chiaramente la propensione di *Klebsiella* per il PEEK, tanto significativa quanto quella di *Aureus* per l'idrossiapatite, sia nella prova di inoculo che in quella di sub-inoculo a falcon senza antibiotico. Sebbene il secondo peggior materiale sia l'idrossiapatite, la distanza di quest'ultima dagli altri materiali è insufficiente a far emergere una differenza significativa. Riportando il dato alla clinica, sembrerebbe pertanto che in caso di sostituzione immediata di una cranioplastica ed infezione accertata da *Pseudomonas*, sarebbe opportuno escludere l'uso del PEEK ed eventualmente di idrossiapatite. Nonostante con percentuali di poco inferiori di sviluppo, titanio e resina acrilica sembrerebbero dunque i migliori sostituti potenziali, ma il titanio resterebbe il miglior sostituto potenziale. Non abbiamo riscontrato una vera specificità di adesione di *Pseudomonas* a substrati irregolari piuttosto che a quelli regolari, sebbene la maggiore aderenza al PEEK faccia pensare ad un maggior peso di questi ultimi, il che giustificherebbe a sua volta l'uso del titanio.

Dal punto di vista delle prove eseguite con antibiotico, sia al sub-inoculo che al falcon device la risposta in termini di riduzione di UFC è nettissima su tutti i materiali, con calo fino ad una potenza di 5. Non si identifica un materiale evidentemente meno responsivo degli altri, lo stesso PEEK risponde al trattamento con efficacia. Dovendo interpretare questo dato si potrebbe dire che in caso di re-infezione di una qualunque cranioplastica posizionata al posto di un precedente sostituto cranico

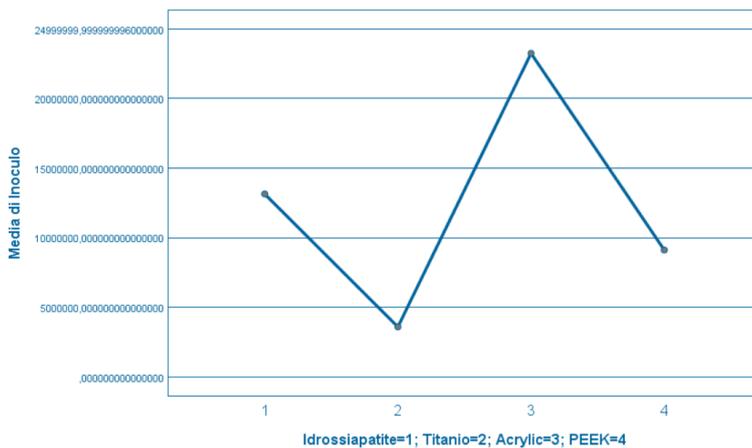
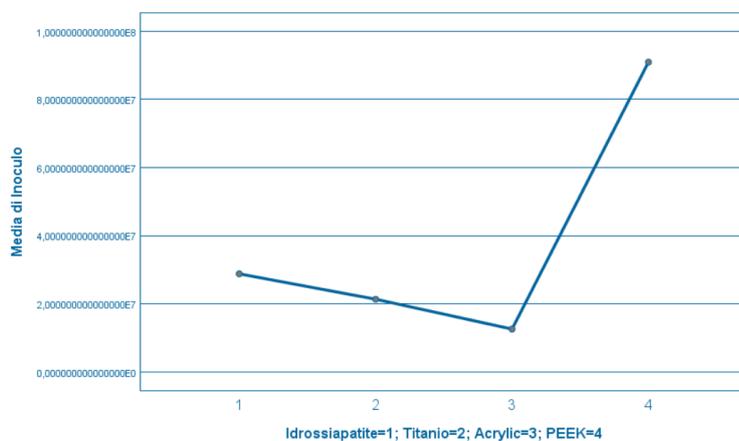
infetto, la terapia antibiotica avrebbe sostanzialmente la stessa probabilità di impatto su tutti i possibili sostituti. In considerazione di quanto detto finora, idrossiapatite e titanio resterebbero però i potenziali migliori sostituti. Per quanto attinente alle caratteristiche di superficie dei materiali, se in assenza di terapia antibiotica *Klebsiella* si comporta in modo equivalente su superfici sia lisce che irregolari, la terapia antibiotica fa emergere una maggiore tendenza alla crescita sulle superfici lisce, in entrambe le serie sub-inoculo e falcon device. Se aggiungiamo questo dato a quanto sopra, dovendo scegliere fra idrossiapatite e titanio per una plastica cranica, potremmo decidere di propendere per quest'ultimo, data la indisponibilità di quest'ultima in caso di bisogno di una sostituzione immediata. La crescita preferenziale su superfici regolari farebbe infine pensare che il biofilm prodotto dalle specie di *Klebsiella* abbia una struttura tridimensionale più adatta alla crescita estesa e compatta.

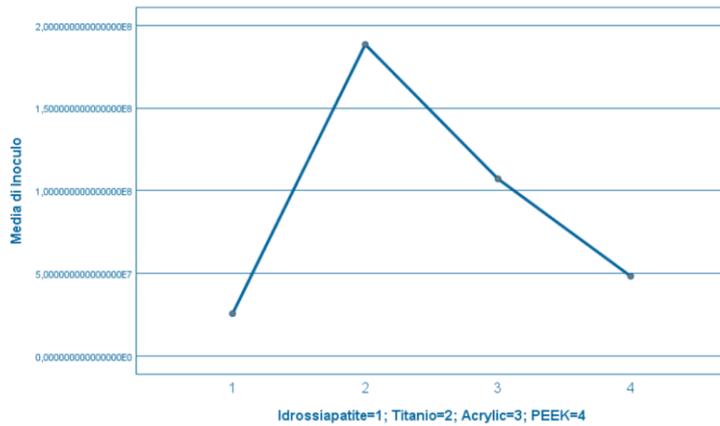
### ***Acinetobacter Baumanii***

*Acinetobacter Baumanii* è un comune commensale umano, una sorta di saprofita cutaneo, per lo più inoffensivo. Nonostante questo negli ultimi 15 anni, a causa dell'uso (a volte sconsiderato) di terapie antibiotiche ad ampio spettro, si è trasformato in un germe multiresistente ad altissima aggressività, un vero e proprio killer. Sebbene incontrarlo in un'infezione di cranioplastica sia raro, allo stesso tempo un evento del genere è da considerare "drammatico".

Per quanto concernente il ceppo ATCC 19606, la prova di inoculo ha mostrato esclusivamente una minima tendenza alla maggior formazione di colonie sul PEEK ( $8.12 \times 10^7$ ), seguito da idrossiapatite ( $4.25 \times 10^7$ ), titanio ( $3.14 \times 10^7$ ) e resina acrilica ( $2.31 \times 10^7$ ). Per il ceppo successivo, Ab. 3714, il materiale peggiore è la resina acrilica ( $1.76 \times 10^7$ ) a minima distanza dall'idrossiapatite ( $1.50 \times 10^7$ ), seguiti dal PEEK ( $9.67 \times 10^6$ ) e dal titanio ( $4.10 \times 10^6$ ). Per il ceppo A.b. 3832, il titanio risultava il materiale peggiore, con UFC  $2.05 \times 10^8$ , seguito dalla resina acrilica ( $1.07 \times 10^8$ ), dal PEEK

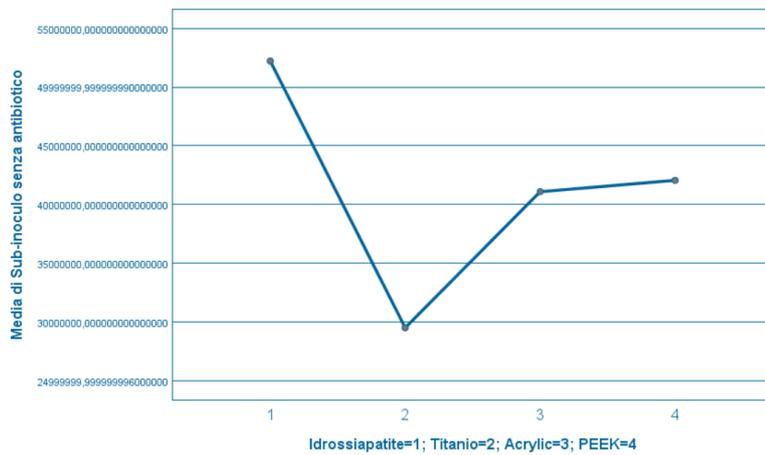
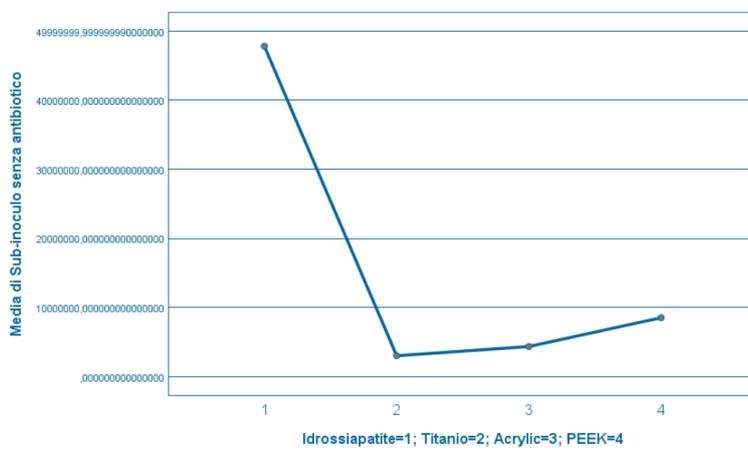
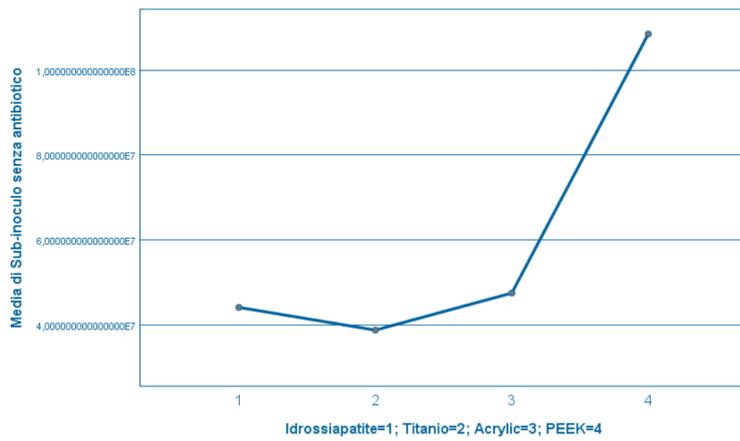
(4,24E+07) ed infine dall'idrossiapatite (2,54E+07). Andando a valutare i materiali nelle tre specie in relazione alla tipologia, la capacità di formazione colonie risultava estremamente simile fra i materiali, con una leggera prevalenza del titanio (8,02+07), seguito dalla resina acrilica (4,93E+07), dall'idrossiapatite (2,76E+07) e dal PEEK (2,60E+07). Come si può vedere questi ultimi due materiali sono praticamente sovrapponibili. Unendo i materiali per struttura fisica, si conferma una sostanziale assenza di divergenze fra idrossiapatite + titanio (5,39E+07) e resina acrilica + PEEK (2,60E+07).





**In fase di inoculo, per Acinetobacter Baumannii ATCC 19606 il materiale peggiore è il PEEK, per 3714 la resina acrilica, per 3832 il titanio**

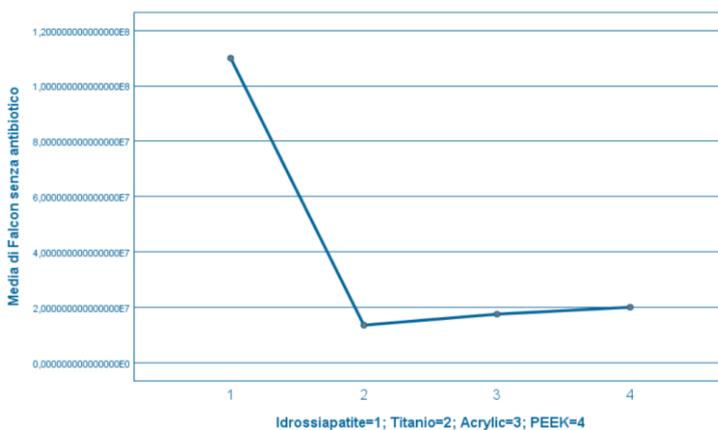
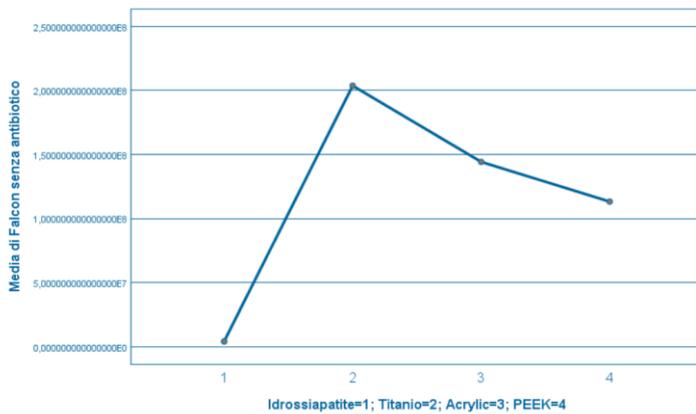
Andando alle prove in sub-inoculo eseguite senza la somministrazione di antibiotico, per ATCC 19606 il PEEK resta il materiale peggiore ( $1,09E+08$ ), seguito dalla resina acrilica ( $4,75E+07$ ), dall'idrossiapatite ( $4,41E+07$ ) e dal titanio ( $3,88E+07$ ), ma fra questi ultimi la differenza di conte è pressochè nulla. Per il ceppo seguente, A.b. 3714, l'idrossiapatite è il peggior materiale ( $6,14E+07$ ), insieme con il PEEK ( $1,16E+07$ ), seguiti dalla resina ( $4,33E+06$ ) e dal titanio ( $2,79E+06$ ), pressochè sovrapponibili. Per A.b. 3832, è ancora l'idrossiapatite a presentare il maggior numero di UFC ( $5,22E+07$ ), seguita dal PEEK ( $3,78E+07$ ), dalla resina acrilica ( $3,73E+07$ ) e dal titanio ( $2,36E+07$ ), sebbene le differenze possano essere considerate come non sostanziali. Andando a considerare i 4 materiali nelle tre specie sulla base delle loro caratteristiche, idrossiapatite e PEEK presentavano lo stesso valore ( $5,26E+07$ ), seguiti dalla resina acrilica ( $2,97E+07$ ) e dal titanio ( $2,17E+07$ ), dunque senza significative differenze. Allo stesso modo, considerando i materiali per struttura, non comparivano differenze significative con idrossiapatite e titanio che presentavano una UFC di  $3,71E+07$  rispetto al  $4,12E+07$  di PEEK e resina acrilica.

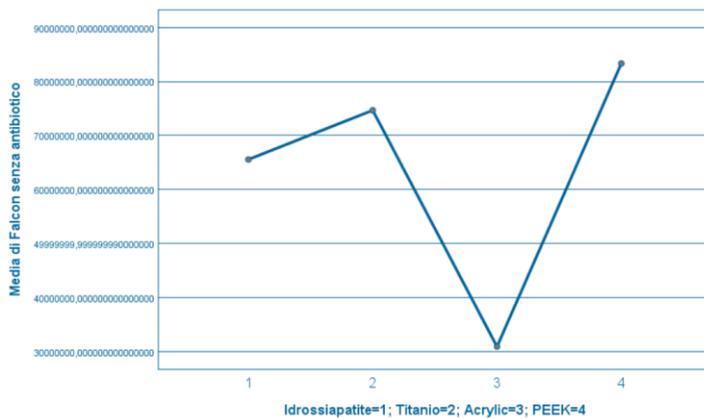


**In sub-inoculo senza antibiotici, ancora una volta ATCC 19606 e 3714 mantengono PEEK ed idrossiapatite come materiali di scelta, 3832 si sviluppa prevalentemente su idrossiapatite**

Per quanto concerne le prove in falcon device senza antibiotico, per ATCC 19606, il titanio con un UFC di  $1,66E+08$  e la resina acrilica con un UFC di  $1,56E+08$  erano i materiali peggiori, seguiti dal PEEK ( $6,31E+07$ ) e dall'idrossiapatite ( $3,54E+06$ ). Per A.b. 3714 era l'idrossiapatite il peggior materiale ( $1,55E+08$ ), seguita da PEEK ( $2,00E+07$ ), titanio ( $1,56E+07$ ) e resina acrilica ( $1,22E+07$ ). Infine, per il ceppo A.b. 3832, i quattro materiali erano molto vicini in termini di conta batterica, con una minima prevalenza del PEEK ( $9,83E+07$ ), seguito dal titanio ( $8,43E+07$ ), dall'idrossiapatite ( $6,56E+07$ ) e dalla resina acrilica ( $2,63E+07$ ).

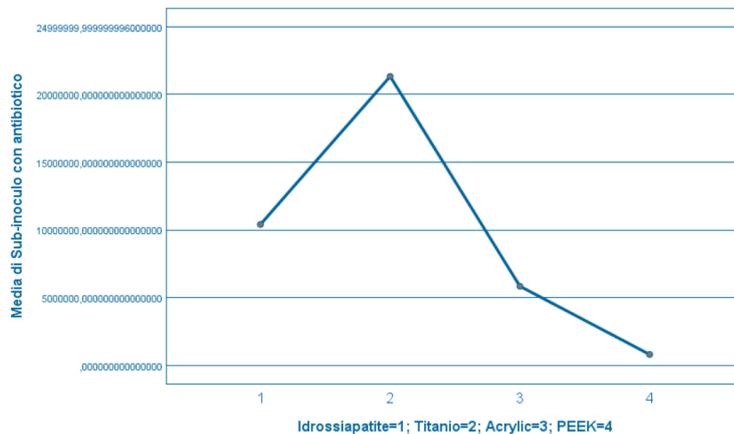
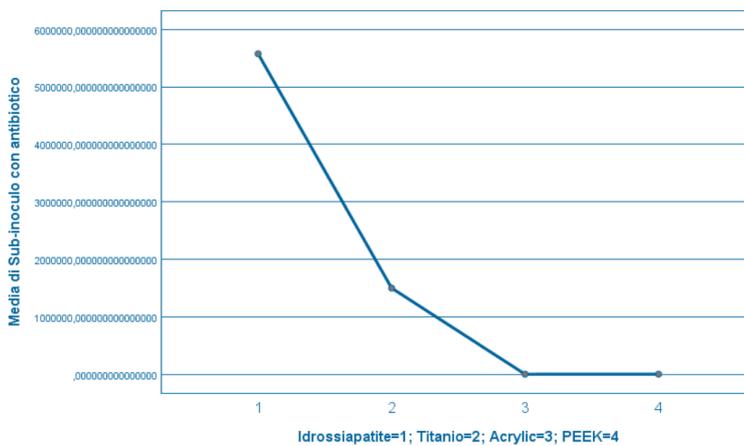
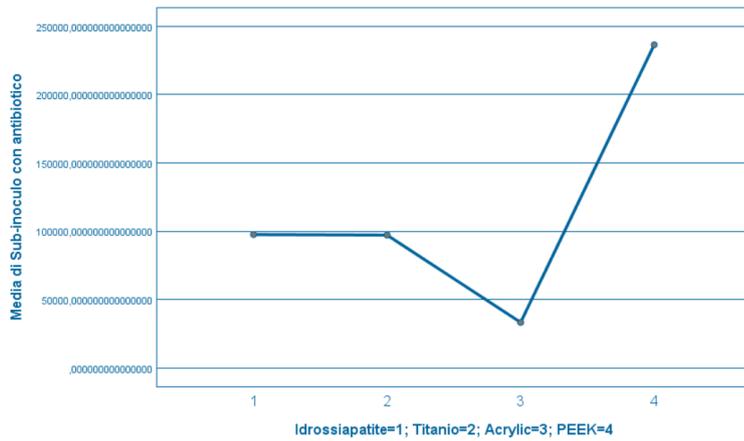
Considerando la media delle specie sui materiali, si osservava una minima prevalenza, non significativa, del titanio ( $8,86E+07$ ), seguito dalla idrossiapatite ( $7,47E+07$ ), dalla resina acrilica ( $6,48E+07$ ) ed infine dal PEEK ( $6,05E+07$ ). Infine, per struttura, idrossiapatite e titanio presentavano una UFC cumulativa di  $8,17E+07$ , rispetto a PEEK e resina acrilica ( $6,27E+07$ ), pertanto senza alcuna valida differenza.





**In falcon device senza antibiotico, ATCC 19606 ripropone il tropismo per il titanio, 8714 conferma la migliore capacità colonizzante nei confronti di idrossiapatite, 3832 per PEEK**

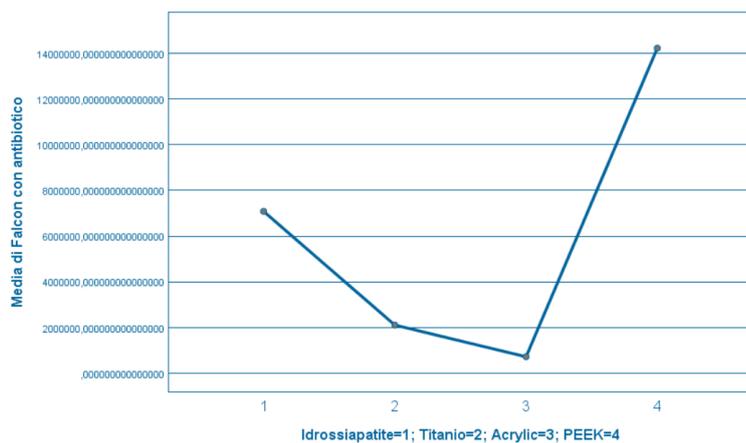
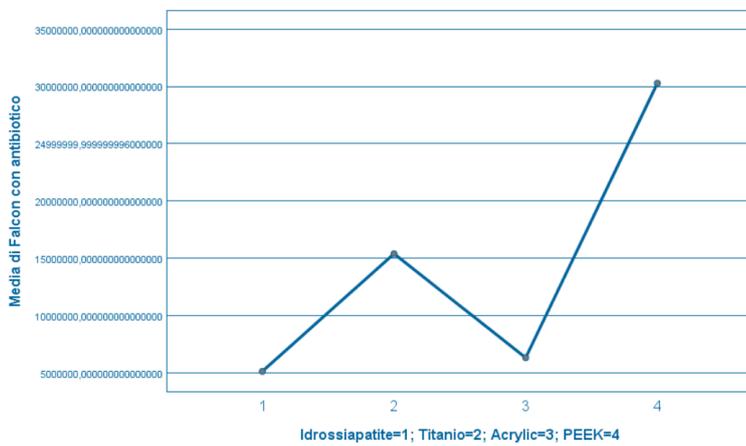
Andando ad esaminare i risultati delle prove con antibiotico in sub-inoculo, per ATCC 19606 il peggior materiale era il PEEK ( $2,36E+05$ ), seguito da idrossiapatite ( $9,76E+04$ ) e titanio ( $9,72E+04$ ) praticamente appaiati ed infine dalla resina acrilica ( $3,33E+04$ ), comunque con minima differenza rispetto ai precedenti. Per A.b. 3714, l'idrossiapatite presentava il maggior valore di UFC ( $7.17+06$ ), insieme con il titanio ( $1,50E+06$ ), seguita a grande distanza da PEEK ( $4,10E+03$ ) e resina ( $2,21E+03$ ): Per A.b. 3832, il titanio restava il materiale più colonizzato ( $2,13E+07$ ), seguito da idrossiapatite ( $1,04E+07$ ), resina acrilica ( $5,84E+06$ ) e PEEK ( $8,00E+05$ ). In relazione alla tipologia di materiali, il titanio presentava la performance peggiore ( $7,64E+06$ ), seguito dall'idrossiapatite ( $5,36E+06$ ), dalla resina acrilica ( $1,96E+06$ ) ed infine dal PEEK ( $3,46E+05$ ). In rapporto alla struttura fisica dei materiali, titanio ed idrossiapatite avevano una capacità di ospitare UFC solo lievemente maggiore ( $6,50E+06$ ) rispetto a quella di resina e PEEK ( $1,15E+06$ ).

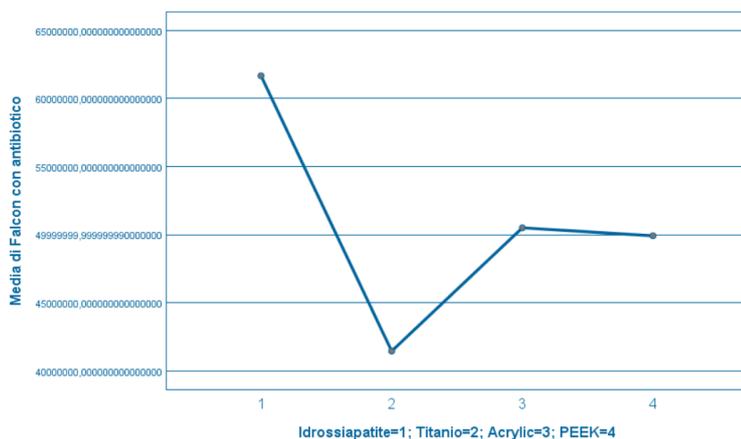


**In sub-inoculo con antibiotico si conferma una totale assenza di simmetria fra i 3 ceppi ed anche degli stessi in confronto con le prove precedenti**

Per le prove in falcon device con antibiotico, su ATCC 19606, il PEEK era il materiale peggiore ( $2,43E+07$ ), seguito dal titanio ( $1,79E+07$ ), dalla resina acrilica ( $5,57E+06$ ) e dall'idrossiapatite ( $5,40E+06$ ). Per A.b. 3714, il materiale peggiore era il PEEK ( $1,89E+07$ ), seguito da idrossiapatite

(8,07E+06), titanio (2,69E+06) e resina acrilica (1,05E+06). Infine, per A.b.3832, non si notava nessuna vera differenza, con 5,88E+07 per l'idrossiapatite, 4,45E+07 per la resina acrilica, 3,99E+07 per il PEEK e 3,18E+07 per il titanio. Per quanto riguardante i singoli materiali sui tre ceppi, la peggior performance era del PEEK (2,77E+07), seguito dall'idrossiapatite (2,40E+07), dalla resina e dal titanio (con valori pressochè sovrapponibili, 1,70E+07), pertanto senza vere differenze. Infine, andando ad esaminare il comportamento dei materiali in relazione alla loro struttura, idrossiapatite e titanio si comportavano minimamente meglio (2,03E+07) rispetto a resina acrilica e PEEK (2,24E+07), anche in questo caso senza vere differenze.





**In falcon device con antibiotico, è il PEEK a prevalere come materiale peggiore, seguito dall' idrossiapatite**

Trarre delle conclusioni dal comportamento di *Acinetobacter* è pressochè impossibile. Come abbiamo visto, non esiste per questo germe un materiale peggiore e sembra quasi che questo batterio abbia la capacità di aderire a qualunque substrato indipendentemente dalla tipologia di materiale e dalle caratteristiche di superficie. Nonostante si possa rilevare una tendenza ad infettare più frequentemente PEEK ed idrossiapatite, questa tendenza non è significativa. Inoltre, *Acinetobacter* risponde scarsamente alla terapia antibiotica sia alle prove sub-inoculo che al falcon device. In questo caso, si osserva anche se solo marginalmente una tendenza di idrossiapatite a presentare una minore riduzione di UFC rispetto agli altri materiali. Come interpretare questi risultati? Considerata la oggettiva difficoltà di trattamento di *Acinetobacter* nella pratica clinica, legata da un lato all'efficacia (peraltro limitata) ormai di un solo antibiotico (la Colimicina) e dall'altro alla estrema tossicità dello stesso a livello del sistema renale e di quello emopoietico, si potrebbe dedurre che in caso di infezione di una plastica cranica, non importa di quale materiale, una volta rimosso quest'ultimo il tentativo di sostituzione immediata sarebbe presumibilmente associato ad un rapido fallimento. L'assenza di differenze fra prove con antibiotico in sub-inoculo e falcon device ci dice anche che sia i batteri nel biofilm stabile adeso alla cranioplastica e alle superfici immediatamente sottostanti e soprastanti ad essa sia il biofilm circostante e presumibilmente le stesse cellule fluttuanti persisterebbero in grado

di risvegliare l'infezione, avendo semplicemente bisogno di un qualunque territorio facente da "pabulum" per riorganizzarsi. Pertanto, l'unica alternativa possibile sarebbe limitarsi alla rimozione della copertura cranica ed attendere un tempo "congruo" come quello definito in letteratura, fra 6 e 12 mesi, prima di programmare una ricostruzione.

### **Valutazione Statistica**

I test statistici sono stati eseguiti utilizzando SPSS versione 11. Abbiamo preso in considerazione per ogni ceppo batterico tutte le fasi dal semplice inoculo alla risposta dei materiali alla somministrazione di antibiotico in sub-inoculo e falcon device. I batteri sono stati dapprima studiati singolarmente, poi in considerazione della diversità fra Gram positivi e negativi, raggruppando i tre ceppi studiati in un unico gruppo, alla ricerca di eventuali affinità legate ai comuni meccanismi di adesione, pur con la ovvia differenza genomica. Abbiamo utilizzato Anova e test t di Student. Anova è stato utilizzato per valutare le differenze fra i materiali considerati, il t di Student per confrontare il materiale identificato come peggiore all'inoculo verso gli altri materiali. All'analisi delle singole specie di *Aureus*, per ATCC 43300 in Anova non si osservava significatività, che compariva però al test di Student, in forma di tendenza per l'inoculo ( $p = 0,06$ , peggior materiale idrossiapatite) e per la prova falcon device con antibiotico ( $p = 0,000$ , peggior materiale PEEK). Per il ceppo 3503 Anova risultava significativa per entrambe le prove in falcon, sia senza che con antibiotico ( $p = 0,000$ , peggior materiale idrossiapatite senza antibiotico, peggior materiale PEEK on antibiotico). Per 3508 infine, in Anova era significativa la prova inoculo ( $p = 0,012$ , peggior materiale idrossiapatite), la prova inoculo senza ( $p = 0,017$ , idrossiapatite peggior materiale) e con antibiotico ( $p = 0,007$ , peggior materiale PEEK). Il t di Student confermava la significatività dell'inoculo ( $p = 0,000$ , idrossiapatite peggior materiale), del sub-inoculo senza antibiotico ( $p = 0,001$ , idrossiapatite peggior materiale) e del falcon device senza antibiotico ( $p = 0,034$ , peggior materiale idrossiapatite). Dando uno sguardo complessivo alle 3

specie, si confermava in Anova la significatività per falcon device senza ( $p = 0,018$ , idrossiapatite peggior materiale) e con antibiotico ( $p = 0,020$ , peggior materiale PEEK).

In merito a *Pseudomonas*, per il ceppo ATCC Anova mostrava significatività sia per la prova falcon device senza (PEEK peggior materiale,  $p = 0.006$ ) che con antibiotico (idrossiapatite peggior materiale  $p = 0.047$ ), confermata al t di Student per falcon device con antibiotico ( $p = 0.003$ ). Per P.a. 778 Anova non mostrava significatività, che si mostrava invece alla prova in sub-inoculo senza antibiotico al test t ( $p = 0.027$ , PEEK peggior materiale). Per P.a. 780 Anova risultava significativa al sub-inoculo senza antibiotico ( $p = 0.014$ , PEEK peggior materiale), confermato al test t ( $p = 0.007$ ). Ad una valutazione complessiva dei tre batteri selezionati, Anova non mostrava significatività, al contrario del test t, che risultava significativo per sub-inoculo con antibiotico ( $p = 0.022$ , idrossiapatite peggior materiale), che al falcon device con antibiotico ( $p = 0.010$ ).

In relazione a *Klebsiella*, per ATCC 700603 Anova risultava significativa per l'inoculo ( $p = 0.005$ , peggior materiale PEEK), per la prova sub-inoculo senza ( $p = 0.004$ , peggior materiale PEEK) e con antibiotico ( $p = 0.002$ , ancora una volta PEEK peggior materiale). Per K.pn. 8104, Anova era significativa per sub-inoculo senza antibiotico ( $p = 0.029$ , PEEK peggior materiale), mostrando una tendenza alla significatività ( $p = 0.06$ , resina acrilica peggior materiale) per la prova falcon con antibiotico. Nessuna significatività emergeva al test t. Per K.pn. 8107, Anova era significativa per inoculo ( $p = 0.034$ , PEEK peggior materiale) e falcon senza antibiotico ( $p = 0.012$ , PEEK peggior materiale). Non emergeva però significatività al test t. Considerando insieme i 3 ceppi batterici, Anova risultava significativa per inoculo ( $p = 0.000$ , PEEK peggior materiale), sub-inoculo ( $p = 0.002$ , come sopra) e in tendenza significativa per sub-inoculo con antibiotico ( $p = 0.051$ , idrossiapatite peggior materiale). Al test t non emergeva nessuna significatività.

Per quanto attinente *Acinetobacter*, per ATCC 19606, Anova risultava negativa, al t di Student compariva significatività per falcon device senza antibiotico ( $p = 0,019$ , titanio peggior materiale). Per 3714 ancora una volta Anova era negativa, si osservava una tendenza alla significatività per il

sub-inoculo senza antibiotico ( $p = 0,043$ , peggior materiale idrossiapatite). Per il ceppo 3832, sia Anova che t risultavano negativi. Ad una visione complessiva delle tre specie, come largamente atteso sulla base dei dati sperimentali, non si osservava alcuna significatività sia in Anova che al t.

In sostanza, dalle prove effettuate si confermava come significativo il maggior tropismo di *Stafilococco Aureo* per l'idrossiapatite, di *Pseudomonas* e *Klebsiella* per il PEEK, nonché la completa assenza di regole per *Acinetobacter*. Tendeva inoltre a confermarsi il repentino cambio di peggior materiale per lo Stafilococco (da idrossiapatite a PEEK) e per *Pseudomonas* (da PEEK peggior materiale ad idrossiapatite).

## **Capitolo IX: dalla sperimentazione di laboratorio all'analisi dei risultati clinici**

Come correlare i dati di laboratorio a quanto osservato nella pratica clinica? Esistono due limiti fondamentali che impediscono un paragone diretto. Il primo è intuitivo. La condizione di laboratorio è quella di una crescita forzata del germe, in un ambiente arricchito di nutrienti e dove non esistono nemici naturali, non essendo in alcun modo riproducibile efficacemente l'attività del sistema immune dell'ospite. Il secondo limite è dato dai tempi di evoluzione e stabilizzazione del biofilm, anche in questo caso legati direttamente alle proprietà dell'ambiente in cui il batterio si sviluppa. Si può infatti immaginare che, in una prima fase, qualunque batterio sia in grado di persistere su una cranioplastica senza essere identificato dal sistema immune, il che lo porta a crearsi una nicchia di invulnerabilità. Ma una volta raggiunta la massa critica, il biofilm creatosi avrà necessità di ridurre il numero dei suoi individui spontaneamente (come spiegato precedentemente) e solo a questo punto il sistema immune verrà chiamato in causa. Pertanto, a limitare la crescita nella prima fase sarà solo la regolarità dell'afflusso dei nutrienti, in un ambiente in condizioni del tutto stabili. Riprodurre questo fenomeno e pertanto mimare esattamente i tempi di crescita del biofilm con esperimenti in vitro è ancora più complesso che creare qualcosa che assomigli alla risposta immune.

Per questi motivi, l'osservazione di quanto avviene nella pratica clinica assume un ruolo di fondamentale importanza. L'esperienza del nostro Istituto con le infezioni di cranioplastica può essere divisa in due fasi, la prima dal 2002 al 2012, la seconda dal 2013 ad oggi. Come già detto in precedenza, nel tempo abbiamo proceduto ad una serie di modifiche nel trattamento di questa condizione, modifiche dettate da particolari situazioni cliniche. Nel primo decennio citato, la maggior parte dei pazienti affetti da infezione del sito chirurgico di una cranioplastica sono stati sottoposti alla rimozione dell'impianto, attendendo abitualmente 12 mesi per il riposizionamento. A partire dal 2005 abbiamo cominciato a registrare i primi casi di somministrazione di terapia antibiotica ad ampio spettro della durata di 2 settimane, seguita, nei casi di risposta alla terapia stessa, da rimozione della cranioplastica infetta, toilette aggressiva dei circostanti tessuti tegumentari ed ossei, toilette del panno

infettivo-infiammatorio epidurale e posizionamento immediato di una nuova plastica. I pazienti trattati erano primariamente tumorali, (glioblastoma 6 casi, meningioma di grado II in meningiomatosi 2 casi), con soli 3 casi affetti da infezione recidivante di cranioplastica. L'età media in questo gruppo era di 57 anni. Al contempo, 9 pazienti craniectomizzati per trauma, 2 affetti da glioblastoma e 1 da esiti di emorragia subaracnoidea e clipping di aneurisma di ACM, hanno subito la procedura di rimozione con ricostruzione tardiva, fallita in 2 casi (entrambi provenienti dal gruppo dei traumi). A questi pazienti vanno aggiunti i 3 trattati con semplice rimozione fra il 2002 ed il 2004 (tutti operati di decompressione per trauma). In termini di distribuzione per sesso, la maggior parte dei pazienti erano maschi (19/26), dato certamente legato all'importanza della componente trauma nella casistica. Data l'assenza di reinfezioni, abbiamo deciso di considerare la ricostruzione immediata come una possibile alternativa da proporre a pazienti selezionati, con un solo criterio di esclusione assoluta: pazienti che giungessero in ospedale con una compromissione del sensorio avrebbero ricevuto intervento immediato di rimozione della plastica infetta e pulizia del cavo chirurgico, a causa degli evidenti rischi *quoad vitam*.

Nell'intervallo di tempo 2013-2022 abbiamo sottoposto alla procedura di cranioplastica immediata altri 19 pazienti. In questa seconda serie hanno prevalso i soggetti affetti da infezione di opercolo autologo o impianto artificiale posizionati dopo craniectomia decompressiva (12 casi, di cui 9 per trauma, 1 per ESA, 1 per emorragia cerebrale, 1 su precedente infezione), seguiti da 3 casi di glioblastoma, un meningioma, una evacuazione di emorragia intraparenchiale, due di linfoma. In questa serie abbiamo registrato il primo fallimento per ricomparsa di infezione, in una giovane donna operata per secondarietà cerebrale da linfoma sistemico. L'infezione si manifestava precocemente, causata dalla comparsa di una fistola liquorale, trattata con ritardo. Per tale motivo la paziente veniva dapprima sottoposta a derivazione spino-peritoneale, poi dopo 6 mesi a nuova cranioplastica (in precedenza resina acrilica, in seguito PEEK custom made), con risoluzione permanente del quadro.

L'età media dei pazienti in questo gruppo era di 45 anni, dato che riteniamo collegato all'aumento del trattamento dei pazienti sottoposti a craniectomia decompressiva.

Complessivamente, pertanto, sono stati trattati con cranioplastica immediata, un totale di 31 pazienti. In questo gruppo abbiamo osservato una leggera prevalenza del sesso maschile (18 Vs 12), con un'età media di circa 48 anni. In 20 casi l'agente patogeno apparteneva alla famiglia dei cocchi gram positivi (*Staphylococcus Epidermidis* 4 casi, *Staphylococcus Aureus* Met-resistente 16 casi), costituenti complessivamente il 64.5% del totale dei casi di infezione. Nei restanti 11 casi si osservavano 3 infezioni da *Pseudomonas*, 3 da *Klebsiella*, 2 da *Acinetobacter*, 3 casi non identificati (di cui uno presento da enterococco per sepsi ematogena). Nei casi di infezione da *Stafilocco* il sostituto utilizzato al momento della rimozione della cranioplastica infetta era sempre la resina acrilica il materiale infetto era rappresentato da opercolo osseo autologo in 16 casi, cranioplastica in idrossiapatite in 4. Nel già citato caso di fistola liquorale l'acrilico falliva e veniva sostituito a 6 mesi con PEEK. Per *Pseudomonas*, in un caso il materiale infetto da rimuovere era l'idrossiapatite, in 1 la resina acrilica, nel rimanente il PEEK. La sostituzione immediata aveva luogo con titanio nel primo caso, resina acrilica nel secondo, nel terzo il PEEK veniva rimosso intraoperatoriamente, il paziente sottoposto ad una procedura di ricostruzione del cuoio capelluto mediante lembo libero da coscia (a causa delle pregresse numerose incisioni per ripetute asportazioni di un meningioma di grado II recidivante in meningiomatosi), il PEEK veniva risterilizzato durante la procedura e riposizionato una volta completata la procedura di innesto vascolare del lembo e la sua sopravvivenza. Per *Klebsiella*, l'infezione interessava un opercolo autologo ed una cranioplastica in PEEK, entrambi sostituiti con resina acrilica. Per *Acinetobacter*, l'infezione colpiva un opercolo autologo ed una cranioplastica in idrossiapatite, sostituiti con resina acrilica. La resina acrilica era il materiale di scelta in due dei tre casi in cui il germe non veniva identificato, il titanio nel terzo. Dal punto di vista del risultato, non si osservavano fallimenti nella serie degli *Stafilococchi*, falliva invece il caso di ricostruzione con titanio, che veniva dapprima sottoposto ad un tentativo di bonifica, poi rimosso

permanentemente. Non si osservavano fallimenti per *Klebsiella*, falliva invece un caso di ricostruzione per *Acinetobacter*, che portava a rimozione e successivo riposizionamento a 6 mesi di un PEEK preformato, stavolta con successo. Si registrava inoltre un fallimento sui tre pazienti con batterio non identificato (in paziente con glioblastoma, infezione post-radioterapia e cedimento del lembo cutaneo), ma la paziente, portatrice di una resina acrilica, decedeva a breve distanza dal ripresentarsi dell'infezione per progressione della malattia tumorale.

Con un totale di fallimenti dell'impianto immediato in 3 casi su 31, pari al 9.6% del totale della nostra serie, valore tutt'altro che trascurabile, alcune considerazioni sono essenziali. In primo luogo, si conferma, in termini di carico infettivo, lo strapotere dei cocchi gram positivi, sebbene nella nostra serie si registri un 65%, ben inferiore all'oltre 80% dei dati riportati in letteratura. In secondo luogo, il materiale da noi utilizzato in prevalenza è stata la resina acrilica, la cui percentuale di risultato è estremamente elevata (22 casi su 24, pari al 91.6%). L'idrossiapatite non veniva mai utilizzata per ricostruzioni immediate (come già spiegato precedentemente a causa dei lunghi tempi di produzione). Falliva una delle ricostruzioni in titanio e soprattutto falliva in un caso su due quella per *Acinetobacter*, confermando la estrema aggressività di questo germe.

Nonostante la sproporzione evidente di casi fra Gram positivi e Gram negativi, appare comunque chiaro come nel caso di questi ultimi le situazioni cliniche siano spesso più complesse. In particolare va ricordato come considerando la nostra casistica globale di infezioni, la maggior parte dei pazienti affetti da Gram negativi giungeva in ospedale in condizioni di deterioramento neurologico e delle condizioni globali, il che rendeva preferibile, come detto sopra, la rimozione della cranioplastica infetta (indipendentemente dal materiale) allo scopo di tentare di ottenere un rapido controllo dell'infezione.

## **Considerazioni conclusive**

Molti passi avanti sono stati fatti, in particolare nell'ultimo decennio, nella nostra conoscenza del fenomeno dell'infezione delle cranioplastiche, siano esse opercoli autologhi o materiali sostitutivi. Nonostante ciò, la flora batterica con cui ci confrontiamo ha modificato molte delle sue caratteristiche ed i fallimenti accumulati nel passato, con la tecnica del cosiddetto "remove and wait", considerata in passato la più sicura anche per la mancanza di materiali da ricostruzione ottimizzati, hanno portato ad una profonda riflessione su questo tema. I lavori di letteratura sulla ricostruzione cranica immediata in caso di infezione, rarissimo fino a qualche anno fa, stanno cominciando ad accumularsi, registrando buoni risultati complessivi. Questo rappresenta un decisivo passo in avanti rispetto alla vecchia idea che mantenere il paziente al sicuro poteva voler dire lasciarlo senza un'adeguata copertura cranica per molti mesi. Oggigiorno un simile presupposto non è più accettabile "a priori", soprattutto in un mondo in cui il paziente, informato della sua patologia, chiede metodi alternativi di trattamento per poter tornare a vivere appieno la sua vita. Ed è proprio la partecipazione del paziente alla scelta terapeutica che ha portato a questa nostra esperienza.

Molto resta da comprendere sui meccanismi che permettono alle specie batteriche di continuare a proliferare danneggiando l'osso autologo o qualunque materiale sostitutivo anche quando l'agente causale sia stato chiaramente identificato. Il biofilm è diventato un nemico comune ed è fondamentale comprenderne il comportamento, diverso per le singole specie studiate, per poter affrontare un nemico così astuto. Da questo punto di vista solo le tecniche di microscopia avanzata confocale ed elettronica potranno aiutarci.

Come concludere questa lunga discussione? L'unico argomento che ci sentiamo di sostenere è che non esiste al momento un sostituto cranico ottimale, a basso rischio infettivo e perfettamente performante per il paziente nella sua vita di tutti i giorni ed è proprio per questo che lo studio dei materiali va perfezionato, in particolare nelle loro varianti capaci di rilasciare molecole antibiotiche protettive e di mimare quanto più possibile i meccanismi biologici che conducono alla riossificazione.

Solo l'ottimizzazione della ricostruzione potrà portare ad una riduzione del drammatico fenomeno delle infezioni, che, non dimentichiamolo, stravolge non solo la vita di pazienti spesso già molto provati dalla loro condizione, ma anche quella di intere famiglie, che ruotano loro attorno.