

7° Congresso Nazionale gruppo italiano per lo studio della malattia di Lyme

“Ruolo del biofilm di *Borrelia* nella malattia di Lyme”

Ilaria Cavallo

Clinical Pathology and Microbiology,
San Gallicano Institute
Rome

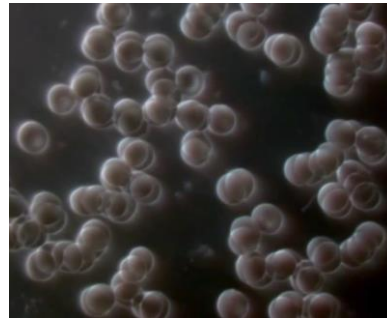
- *Borrelia burgdorferi* in sensu stricto → Stati Uniti
- *Borrelia burgdorferi* in sensu lato → Europa

***Borrelia burgdorferi*: forme pleomorfe**

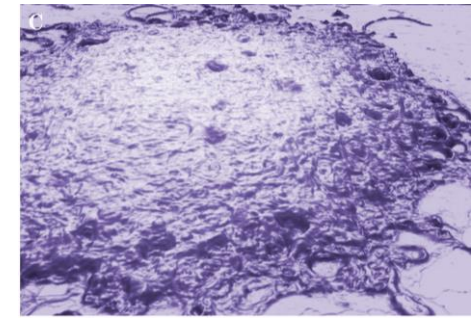
Forma spirale
(mobile invasiva)



Forma cistica
(ridotta attività metabolica)



Aggregati simili al biofilm
(infezioni croniche)



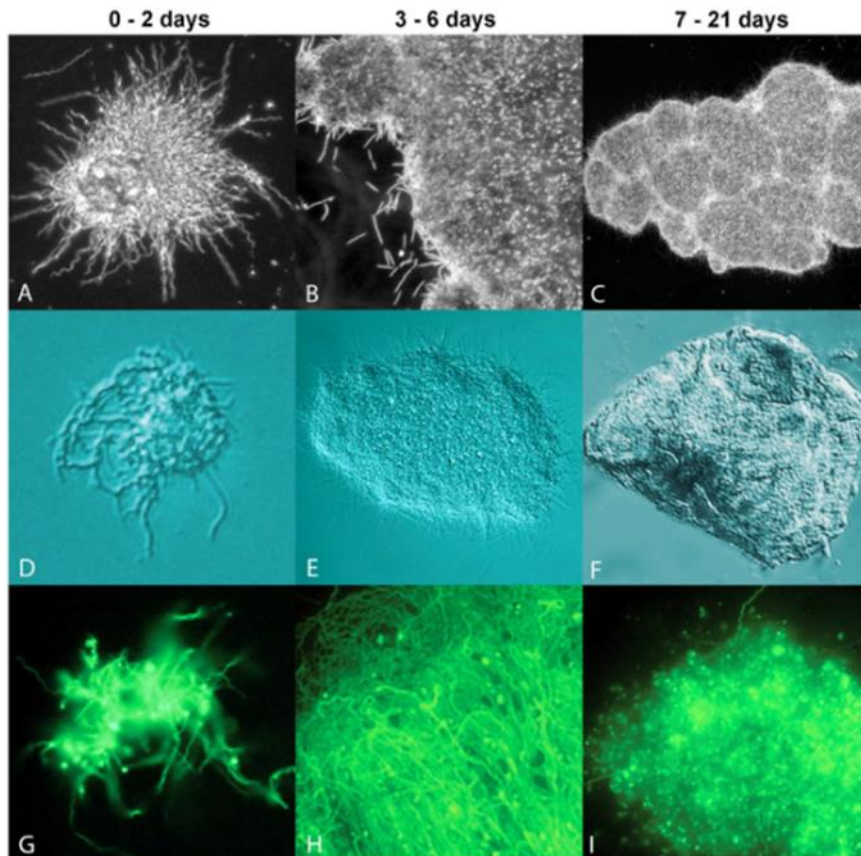
**ESCMID* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections
2014**

General features of clinical and laboratory indications for diagnosis of biofilm infections

- Clinical signs of infection e.g. the classical but frequently low-grade inflammatory reactions
- Medical history of biofilm-predisposing condition (e.g. implanted medical device, cystic fibrosis)
- Persisting infection lasting > 7 days
- Failure of antibiotic treatment and recurrence of the infection
- Microscopic evidence from fluid/tissue samples obtained from the focus of the suspected infection
- Positive culture/non-culture-based techniques (PCR) of fluid or tissue sample

[Høiby et al. 2015, *Clin Microbiol Infect.*, 21 1:S1-25]

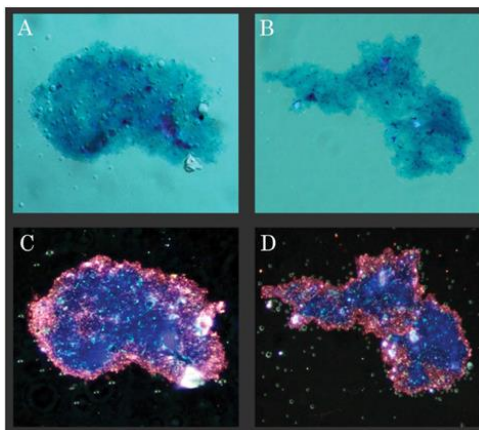
Borrelia Biofilm *in vitro*



IPOTESI: *B. burgdorferi* produce biofilm in vivo e in vitro per sopravvivere a condizioni ambientali avverse

(Sapi et al., 2012)

Borrelia Biofilm *in vitro*

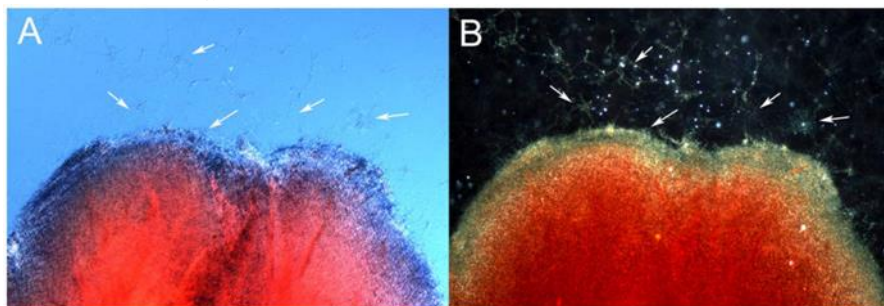


Esopolisaccaridi extracellulari

Colorazione The Spicer & Meyer del ceppo B31

(A, B) Microscopio DIC

(C, D) Microscopia in campo oscuro

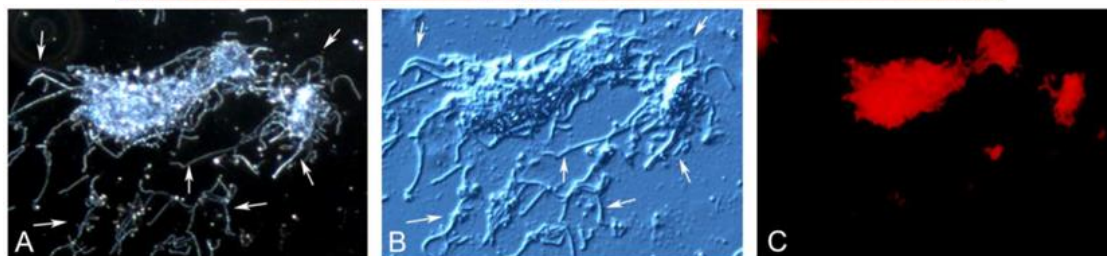


Calcio

Colorazione di Alizarin Red-S

A) Microscopio DIC

B) Microscopia in campo oscuro



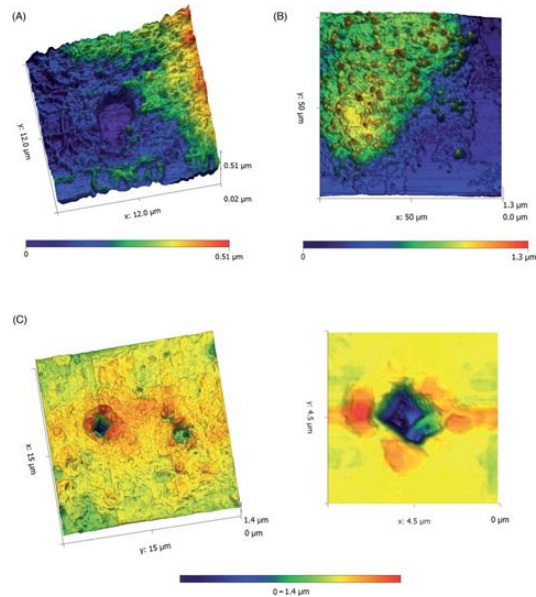
DNA extracellulare

A) Microscopia in campo oscuro

B) Microscopio DIC

C) Colorazione fluorescente DDAO

IPOTESI: *B. afzelii* e *B. garinii* sono capaci di formare biofilm come i ceppi di *B. burgdorferi* in senso stretto



Microscopia a forza atomica

(A e B) Micrografie dei bordi del biofilm formato da *B. afzelii* e *B. garinii*

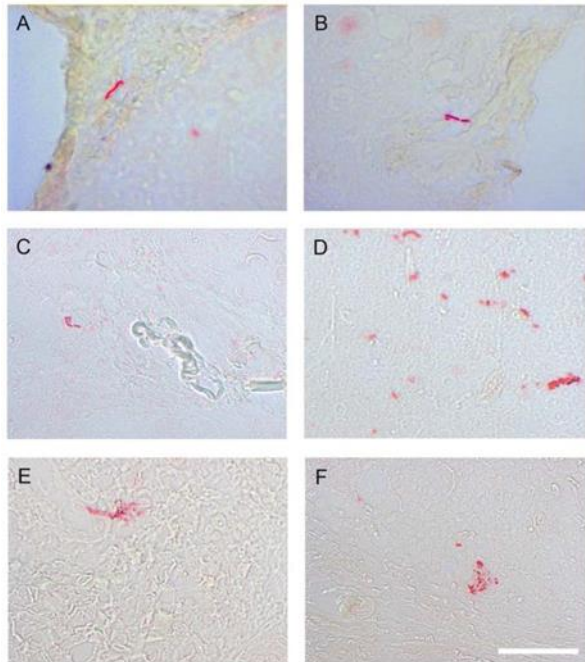
C) Alta risoluzione di un'invaginazione profonda nel biofilm di *B. afzelii*

RISULTATO: Il biofilm prodotto dalle specie di *Borrelia* in sensu lato è simile a quello prodotto da *B. burgdorferi* in senso stretto

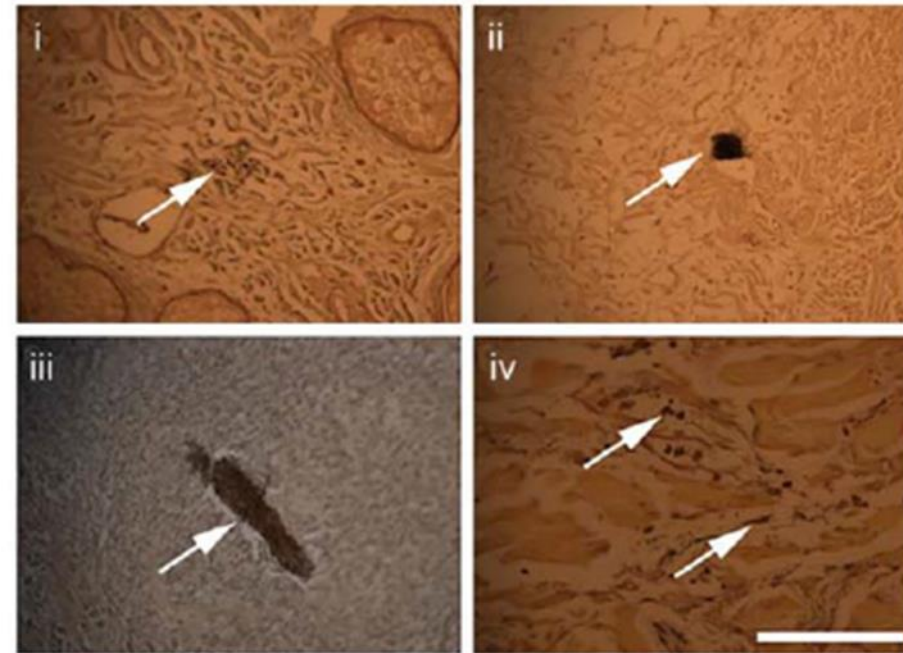
(Balasubramanian et al., 2015)

Evidenza *in vivo* dell'esistenza del Biofilm di Borrelia

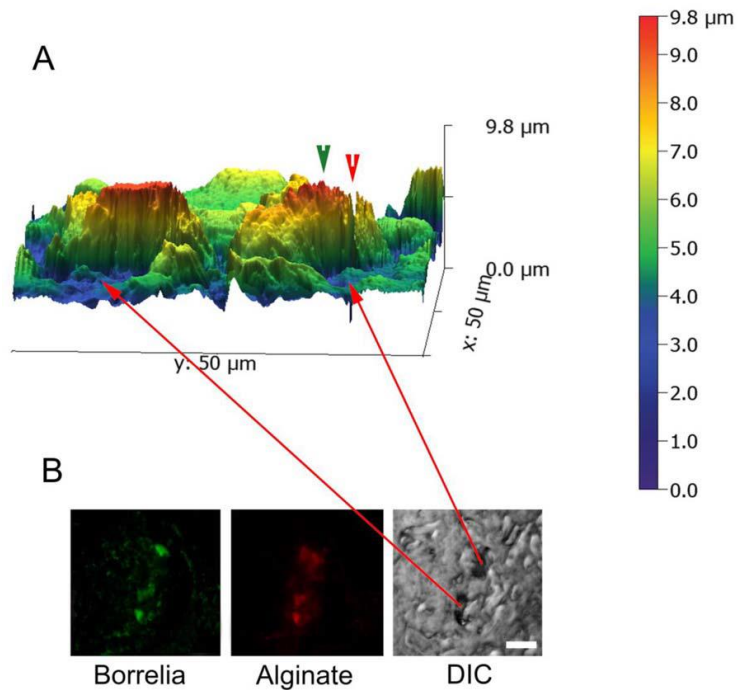
IPOTESI: presenza del biofilm *in vivo* di *B. burgdorferi* nel linfocitoma borreliale



Immunoistochimica anti-Borrelia



Immunoistochimica con Dieterle Silver modificato



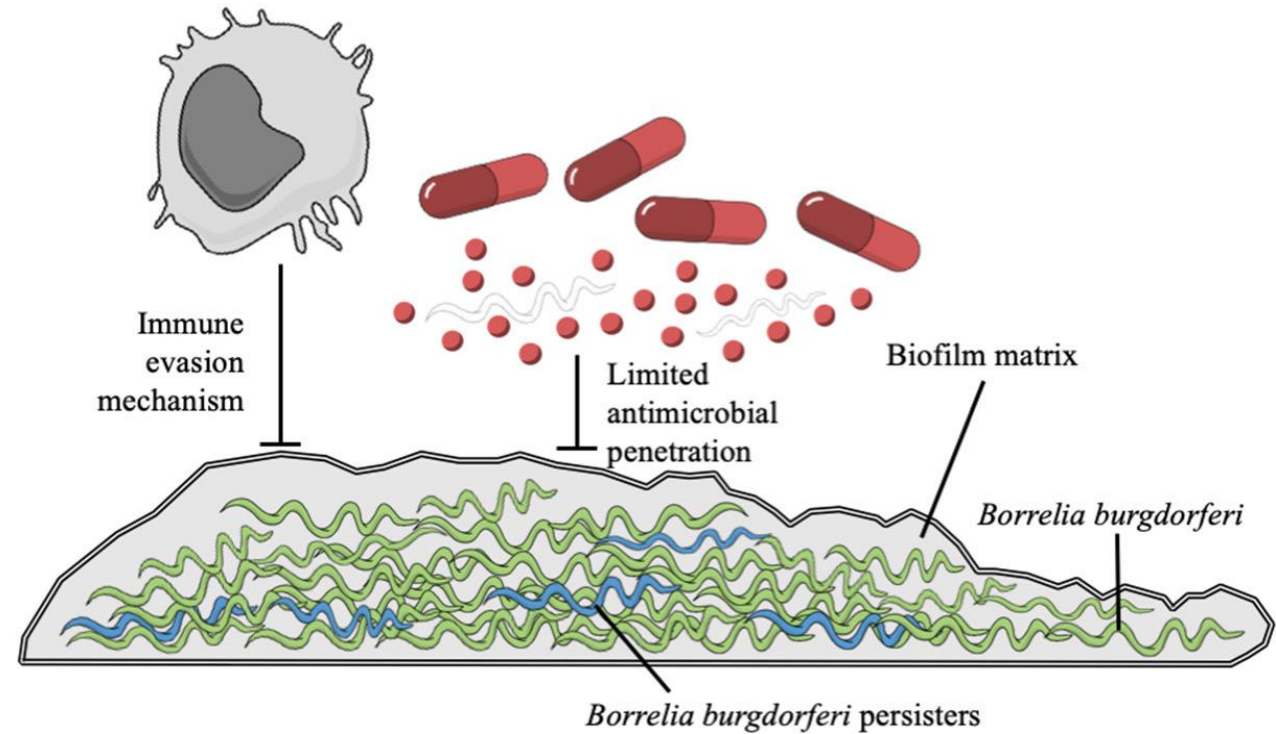
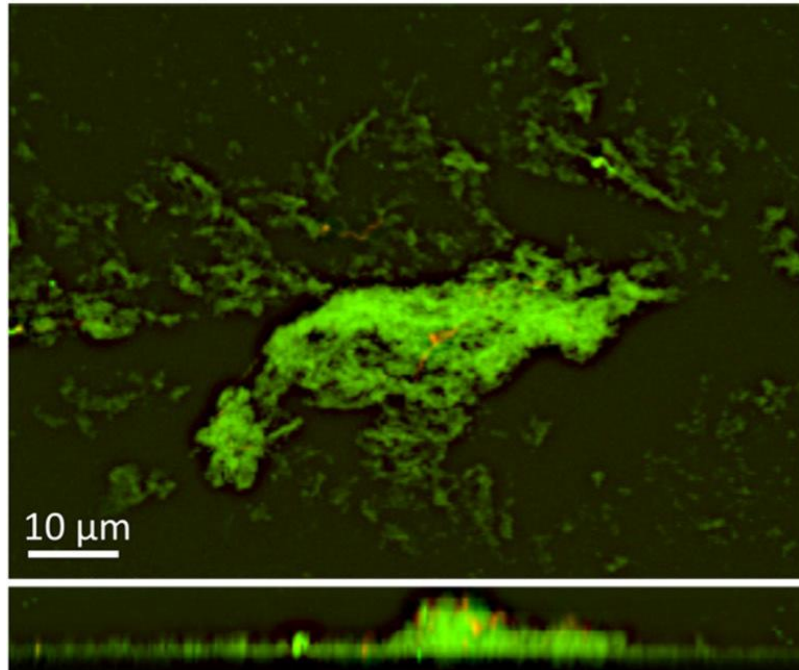
Pannello A) biofilm tridimensionale di *B. burgdorferi*
Pannello B) Immunoistochimica

RISULTATO: Gli aggregati di *Borrelia* trovati nei sei campioni di tessuto linfomatoso borrelico erano positivi ai markers del biofilm, come la positività ai differenti mucopolisaccaridi, in particolare l'alginato

(Sapi et al., 2015)

The Emerging Role of Microbial Biofilm in Lyme Neuroborreliosis

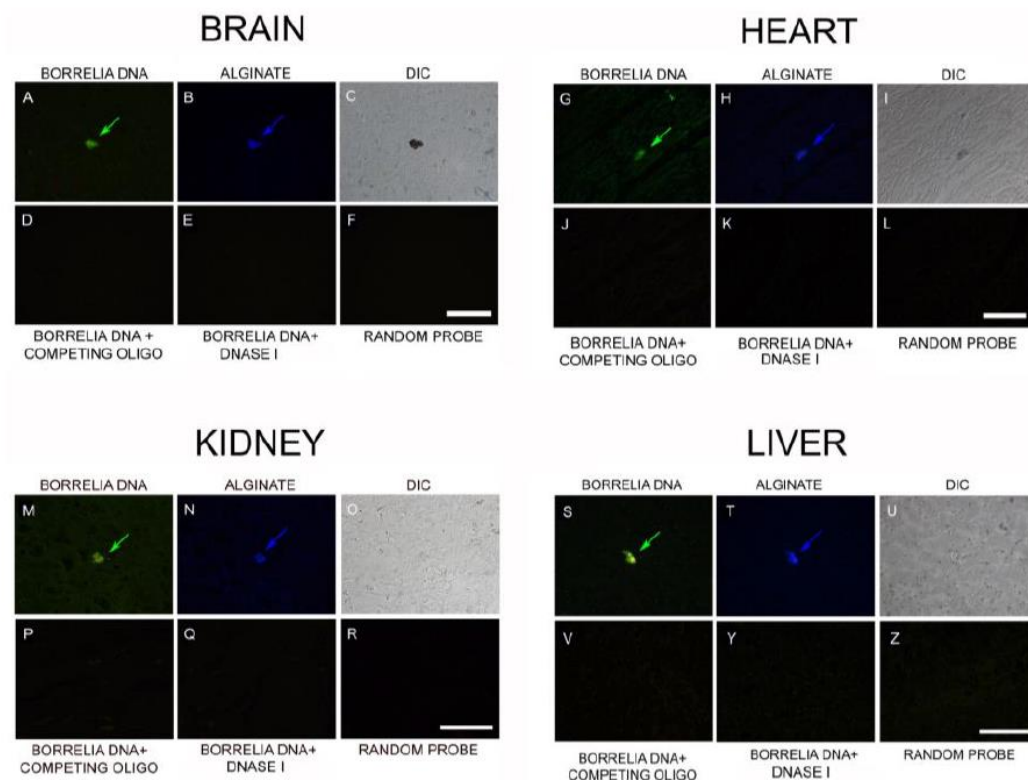
Enea Gino Di Domenico^{1*}, Ilaria Cavallo¹, Valentina Bordinon¹, Giovanna D'Agosto¹,
 Martina Pontone¹, Elisabetta Trento¹, Maria Teresa Gallo¹, Grazia Prignano¹,
 Fulvia Pimpinelli¹, Luigi Toma² and Fabrizio Ensoli¹



(Di Domenico et. al., 2018)

The Long-Term Persistence of *Borrelia burgdorferi* Antigens and DNA in the Tissues of a Patient with Lyme Disease

Eva Sapi ^{1,*}, Rumanah S. Kasliwala ¹, Hebo Ismail ¹, Jason P. Torres ¹, Michael Oldakowski ¹, Sarah Markland ¹, Gauri Gaur ¹, Anthony Melillo ¹, Klaus Eisendle ², Kenneth B. Liegner ^{3,4,5}, Jenny Libien ⁶ and James E. Goldman ⁷



Ipotesi: Presenza di *Borrelia burgdorferi* in pazienti con borreliosi di Lyme dopo un lungo periodo di trattamento antibiotico

Risultato: *Borrelia burgdorferi* può persistere nell'ospite in forma di biofilm, resistente agli antibiotici, anche dopo un lungo periodo di trattamento antibiotico

Fluorescent in situ hybridation combinato con alginato IHC

(Sapi et. Al., 2019)

L'identificazione dei ceppi produttori di biofilm può supportare la clinica?

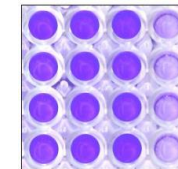
La rilevazione precoce della forza di formazione del biofilm potrebbe aiutare ad identificare **infezioni ad alto rischio** di e di conseguenza **individui ad alto rischio**



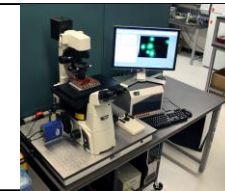
Metodi di studio del biofilm

Tempi lunghi di lavoro, intenso lavoro, alta variabilità, bassa accuratezza e bassa efficacia dei costi

Colorazione Crystal violet (CV)(Christensen et al 1985) o saggio XTT (Pettit et al 2005)



Metodi microscopici (Benoit et al 2010)



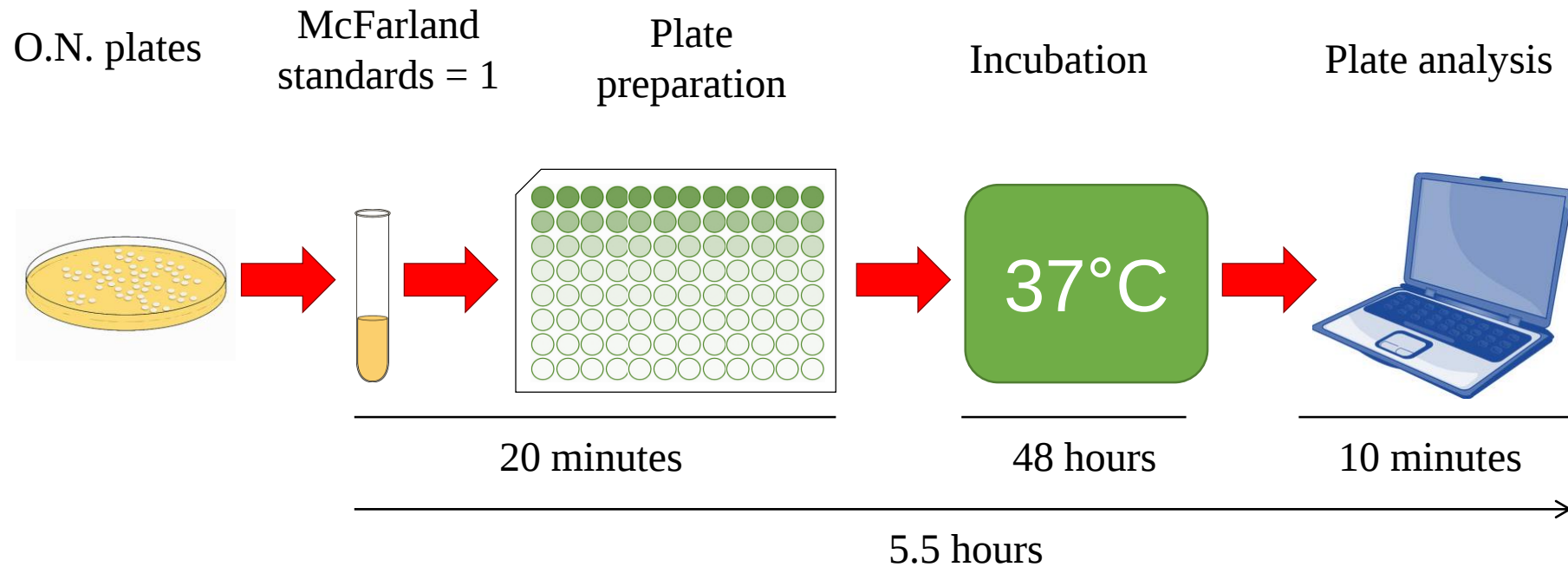
Clinical Biofilm Ring Test (cBRT)



Development of an *in vitro* Assay, Based on the BioFilm Ring Test[®], for Rapid Profiling of Biofilm-Growing Bacteria

Enea G. Di Domenico^{1*}, Luigi Toma², Christian Provot³, Fiorentina Ascenzioni⁴,
Isabella Sperduti⁵, Grazia Prignano¹, Maria T. Gallo¹, Fulvia Pimpinelli¹,
Valentina Bordinon¹, Thierry Bernardi³ and Fabrizio Ensoli¹

Protocollo del saggio clinico BRT (cBRT)

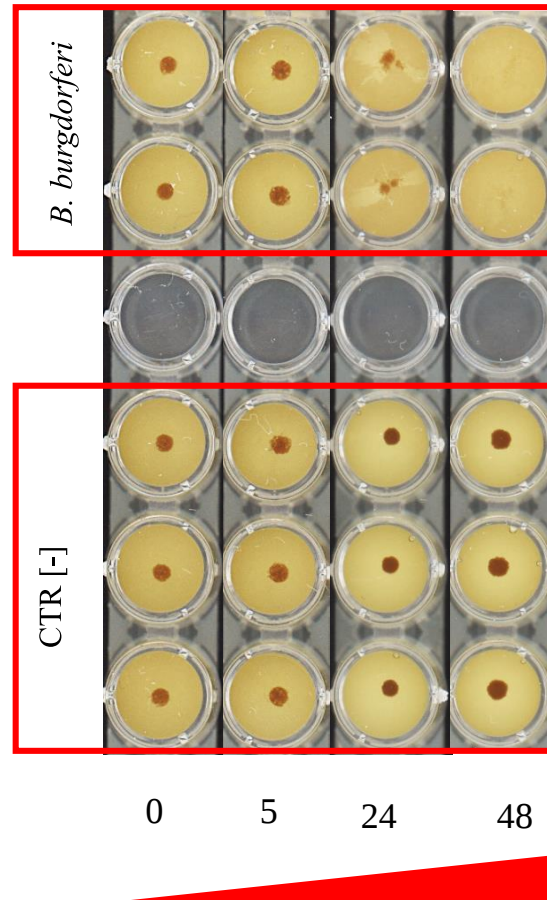


B. burgdorferi biofilm formation

Biofilm Ring Test

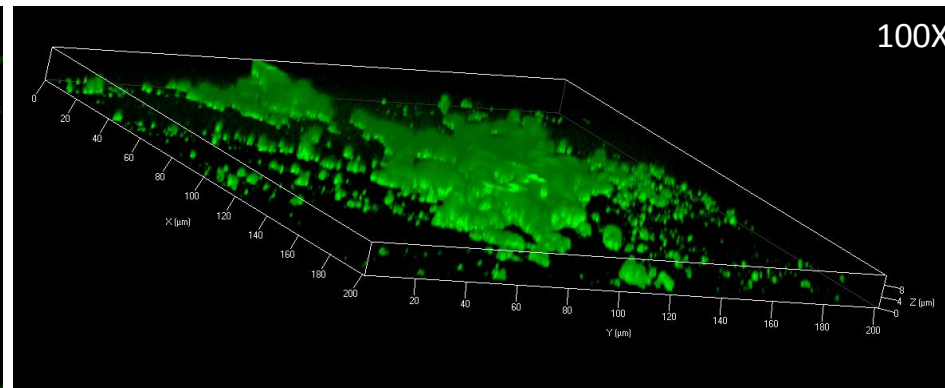
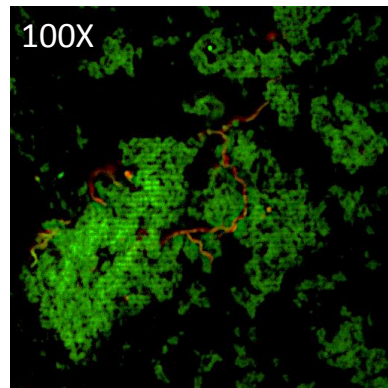
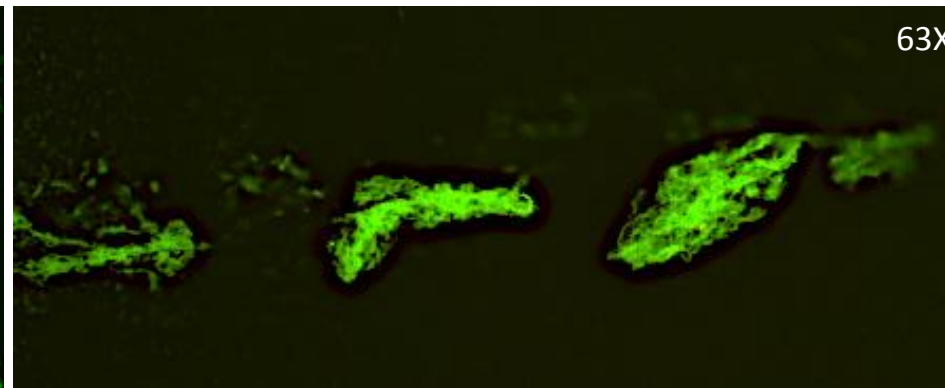
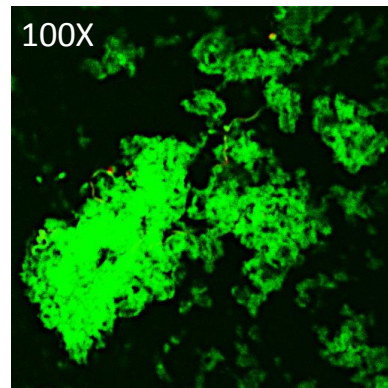
BSK-Medium
 +
 1 x 10⁶ CFU/mL B31 *B. burgdorferi*

BSK-Medium



Time (hours)

Immagine in microscopia confocale del biofilm di *B. burgorferi*



Il cBRT è in grado di identificare e quantificare il biofilm di *B. burgdorferi* in tempi rapidi

cBRT è sensibile, facile da utilizzare e altamente riproducibile

Metodo veloce (48h) e può essere utilizzato in combinazione con altre procedure cliniche microbiologiche

Costi contenuti

- Aumentare il campionamento e standardizzare il test
- Associare i dati ottenuti con cBRT con l'outcome clinico
- Sviluppare l'anti-biofilm test specifico per *Borrelia*
- Valutare l'efficacia di nuovi composti contro il biofilm di *B. burgorferi*

Thank you for your attention

