

IL BIOFILM E LA PATOLOGIA UMANA.

Per molto tempo le conoscenze acquisite sui biofilm sono state attribuite solo alla crescita dei batteri nell'ambiente, probabilmente anche in virtù di una inconscia ma comprensibilmente radicata convinzione dei microbiologi che negli organismi superiori i batteri possano vivere solo nel fenotipo planctonico; questa forma di buona educazione da parte dei batteri per gli ospiti (quasi una manifestazione di rispetto dei procarioti nei confronti degli organismi superiori suggerita da una visione antropocentrica del mondo biologico!) è risultata assolutamente inesistente quando sono state segnalate le prime osservazioni di presenza di biofilm sulle superfici di strumenti artificiali introdotti nell'organismo umano. Le manifestazioni cliniche delle infezioni insorgenti in questi pazienti hanno disorientato i clinici ed i microbiologi per molto tempo. Per anni, infatti, sono state attribuite all'antibiotico-resistenza dei ceppi batterici la scarsità, l'aspecificità e l'indolenza dei quadri sintomatologici, la refrattarietà alle terapie somministrate anche per tempi lunghi e ad alto dosaggio, e -in alcuni casi- il repentino peggioramento fino all'*exitus*. In molti di questi casi, infatti, la terapia antibiotica somministrata ai dosaggi raccomandati fornisce un temporaneo miglioramento dei sintomi, ma dopo la sospensione del farmaco l'infezione invariabilmente "recidiva" con caratteristiche di indolenza, fin quando il dispositivo medico artificiale (protesi, pace-maker, catetere, ecc.) non venga rimosso.

L'osservazione microscopica diretta delle infezioni batteriche croniche resistenti alle terapie ha dimostrato inequivocabilmente che esse crescono come colonizzazioni delle superfici artificiali sotto forma di biofilm. La prima descrizione della colonizzazione batterica di un dispositivo medico artificiale al microscopio elettronico fu fatta da J.W. Costerton nel 1982 (Marrie 1982), sul pace-maker artificiale prelevato da un paziente affetto da episodi infettivi "recidivanti" e refrattari alle terapie antibiotiche. Da allora innumerevoli conferme sono state date a questa osservazione, dallo stesso autore e da altri centri altamente qualificati di microbiologia.

Da osservazioni molto recenti risulta che gli stessi biofilm batterici che si formano sulle superfici di dispositivi protesici artificiali possono crescere anche sulle superfici di tessuti od organi di cui sia compromessa l'integrità. Ne deriva che le stesse leggi che regolano la crescita preferenziale dei batteri sulle superfici, valgono in tutti gli ecosistemi, compreso quello dell'organismo umano. In altri termini gli stessi strumenti di difesa che proteggono i batteri nei laghi e nelle correnti dai loro predatori naturali, come l'ameba, sono utilizzati anche per sfuggire dalla fagocitosi da parte dei globuli bianchi, e gli stessi meccanismi che proteggono i biofilm ambientali dall'aggressione dei batteriofagi e degli antagonisti chimici presenti nei laghi, funzionano anche per proteggerli dagli anticorpi, dai mediatori del sistema infiammatorio e dai farmaci.

La resistenza batterica alle terapie antibiotiche è un fenomeno noto da tempo, e fino a pochi anni fa veniva spiegato con vari meccanismi, i principali dei quali sono le pompe di efflusso, gli enzimi inattivanti, e le mutazioni genetiche. Questi meccanismi non sembrano essere responsabili della protezione dei batteri nel biofilm. Test di suscettibilità con modelli di biofilm hanno mostrato la sopravvivenza dei batteri dopo il trattamento con antibiotici a concentrazioni a centinaia e perfino migliaia di volte superiori alla minima concentrazione inibente efficace sugli stessi batteri mantenuti in una coltura in sospensione. In vivo, probabilmente gli antibiotici sopprimono i

sintomi dell'infezione grazie all'eliminazione dei batteri planctonici che lentamente si staccano dalla superficie esterna del biofilm; infatti è noto che quando i batteri si staccano dal biofilm in genere diventano rapidamente sensibili agli antibiotici (Anwar H et al, 1989; Williams I et al, 1997), ma quando la terapia viene sospesa, il biofilm può agire come un focolaio per la recidiva dell'infezione. Le infezioni da biofilm, infatti, persistono fin quando la superficie colonizzata non venga rimossa chirurgicamente. Queste osservazioni suggeriscono che le mutazioni o il trasferimento di informazioni genetiche mobili (plasmidi, trasposoni, ecc.) non possono essere i principali meccanismi di chemioresistenza dei biofilm; in alcuni studi è stato indagato il possibile coinvolgimento di geni codificanti per multidrug efflux pump, come il locus *mar*, ma non è stata dimostrato alcun ruolo di questo gene nella resistenza dei biofilm (Aleksun MN et al, 1999, Maira-Litran T 2000). Ciò non esclude, comunque, che anche meccanismi convenzionali di chemioresistenza (resistenza genotipica) possano essere espressi nei biofilm (forme di resistenza fenotipica), e possano contribuire a determinare la resistenza totale della popolazione microbica responsabile di un'infezione indebellabile con le terapie convenzionali.

Sono state proposte alcune possibili spiegazioni ai meccanismi di chemioresistenza dei biofilm. Attualmente tre sono i meccanismi presi in considerazione.

- Il primo prevede che la matrice esopolisaccaridica del biofilm costituisca una barriera meccanica alla penetrazione delle molecole farmacologiche, che risulterebbe lenta od incompleta; nel caso di alcune classi di farmaci, gli aminoglicosidi esempio, l'effetto di barriera potrebbe essere esercitato anche dalla reazione sterica tra le cariche negative dei polimeri extracellulari e le cariche positive dei farmaci (Kumon H et al. 1994 Shigeta M et al. 1997 Gordon CA et al. 1988, Nichols WW et al. 1988); questi, una volta assorbiti sulla superficie esterna della matrice, non solo vi sarebbero trattenuti, ma verrebbero lentamente inattivati.

- Il secondo ipotizza un possibile effetto esercitato da alterazioni fisico chimiche del microambiente interno al biofilm per la presenza di nicchie di anaerobiosi situate in profondità (De Beer D et al, 1994) o per la carenza di metaboliti, o per la creazione di gradienti di pH dovuti ad accumulo di radicali acidi (Zhang TC et al. 1996); queste condizioni renderebbero gli antibiotici inefficaci a causa della condizione di quiescenza metabolica dei microrganismi bersaglio (Eng RHK, 1991).

- Il terzo possibile meccanismo prevede che una subpopolazione di microrganismi dei biofilm si esprima in un fenotipo altamente protetto, di tipo simil-sporale; questo meccanismo è stato proposto in seguito all'osservazione della resistenza di biofilm neoformati, ancora troppo sottili per poter opporre un meccanismo di resistenza da barriera meccanica (Cochran WL et al 2000, Das JR et al. 1998).

Fino ad oggi sono state descritte varie patologie umane correlate alla presenza di biofilm nell'organismo umano. A puro scopo classificativo possono essere distinte patologie legate all'inserimento di materiali artificiali nell'organismo umano e patologie legate alla crescita di biofilm su tessuti umani.

BIOFILM SU MATERIALI ARTIFICIALI

Tutti i tipi di dispositivi medici impiantabili sono potenzialmente sede di infezione da biofilm, in qualsiasi sede dell'organismo vengano posti ed a prescindere dal biomateriale usato.

Ma l'agente eziologico responsabile della maggior parte delle colonizzazioni appartiene alla specie *Stafilococco* (70-80% dei casi), in particolare agli stafilococchi coagulasi-negativi (90%). Per questo motivo molti studi sono rivolti alla comprensione dei meccanismi che regolano la fisiologia delle forme sessili di questi microrganismi.

Protesi vascolari

I primi interventi di sostituzione di vasi arteriosi con protesi artificiali risalgono all'inizio degli anni settanta. Furono immediate le prime descrizioni del rischio di infezione legate alla presenza degli impianti artificiali. Fino al 1982 le infezioni venivano correlate ai normali rischi di sepsi operatoria. Nel 1982 WJ Costerton descrisse colonie batteriche tenacemente adese ad un pace-maker di una paziente che veniva ricoverata per episodi febbrili ricorrenti, e correlò la refrattarietà alle terapie antibiotiche con la presenza di queste forme batteriche sul dispositivo artificiale.

Tuttavia i dati pubblicati fin'ora sulla prevalenza delle infezioni protesiche sono gravemente inficiati da limiti dell'organizzazione sanitaria, ed errori metodologici nell'arruolamento dei pazienti: la maggior parte degli studi sono trasversali e non prospettici per la mancanza di un follow-up rigoroso nei Centri di riferimento; molte diagnosi d'infezione sono misconosciute e confuse con una, non meglio definita, problematica di "rigetto" della protesi; in molti pazienti l'exitus impedisce che un corretto iter diagnostico permetta il riconoscimento dell'infezione.

Per alcuni tipi di protesi vascolari è stata valutata la prevalenza di infezione, anche sulla base di osservazioni effettuate su ampie casistiche cliniche.

Per quanto riguarda le protesi aorto femorali, la prevalenza di infezione calcolata in una serie di studi pubblicati dal 1972 al 1996 varia dallo 0,5 al 3 % dei casi osservati (Liekweg et al. 1977, Lorentzen 1985, O'Hara 1986, Edwards 1987, Al-Khaffaf 1996). Queste prevalenze aumentano per le protesi vascolari extra-anatomiche, impiantate quasi sempre in sostituzione di protesi aortiche infette. In questo caso (Fann 1993, Yeager 1992) i dati di prevalenza dell'infezione dovuta alla crescita di biofilm sul materiale protesico oscillano mediamente intorno al 6-8%, come si può evincere dal confronto dei dati ottenuti da una serie di studi pubblicati tra il 1974 ed il 1992. La principale ragione della alta prevalenza di infezione registrata in questo caso è legata al decorso extra-anatomico di questo tipo di by-pass vascolari. Tra i vari studi la review di Yeager e coll. Pubblicata nel 1992 mostra dati particolarmente allarmanti: gli studi esaminati per questa analisi della letteratura tenevano conto dei casi di reinfezione dopo sostituzione di protesi infette. Tenendo conto anche di questi casi, in cui il rischio di infezione era presumibilmente maggiore, la prevalenza sale al 18-23 %.

In linea di massima, quindi si può affermare che la prevalenza di infezione su protesi vascolari varia in ragione della sede di impianto. I dati di prevalenza variano notevolmente (Leschi 1998), dallo 0,2% per le protesi impiantate in sede cervicale, al 2-4 % per quelle femoro-femorali, fino al 5-8 % per le axillo-femorali. Se si esclude il dato relativo alle protesi axillo-femorali -dato influenzato dal decorso extra-anatomico- una simile variabilità è stata messa in relazione con la vicinanza della protesi al tratto gastro-intestinale e con il grado di vascolarizzazione dei tessuti circostanti. La sede

cervicale, secondo questa interpretazione, sarebbe gravata da un minor rischio di infezione per l'alta vascolarizzazione del collo e della base del cranio, e per la lontananza dalla zona perineale. Come già accennato la veridicità di questi dati è fortemente inficiata dalle carenze organizzative nel follow-up di questi pazienti. Ma ad ulteriore conferma della possibile sottostima del rischio infettivo, Seabrook (xxxxxxxxxxx1990) ha pubblicato i dati ottenuti dalle colture del materiale biologico raccolto da pseudoaneurismi periprotetici dopo intervento chirurgico. Dall'analisi dei dati è risultato un 60% di positività per Stafilococchi coagulasi negativi; Questo dato risulta particolarmente allarmante se si tiene conto della completa assenza di sintomi locali e/o sistemici di infezione nei pazienti analizzati.

Valvole cardiache

Non sono stati pubblicati fino ad oggi studi scientifici rigorosi sulla prevalenza delle infezioni batteriche su protesi valvolari artificiali. In questo tipo di protesi la diagnosi clinica è particolarmente difficile ed elusiva, perché il paziente muore per scompenso cardiaco da erosione del tessuto miocardico periprotetico, prima che compaiano i primi segni di infezione. I dati di letteratura indicano una mortalità pari al 75% dei casi di infezione.

Molti sforzi sono stati fatti per ridurre al minimo il rischio di questa grave complicanza: affinamento delle tecniche chirurgiche, miglioramento della profilassi antibiotica e ricerca industriale per la messa a punto di biomateriali innovativi. Recentemente un'industria americana (St. Jude Medical, Inc, St. Paul, Minnesota) ha introdotto sul mercato un tipo di valvola cardiaca ricoperta di sali d'argento per prevenire le infezioni da stafilococco. Nonostante la pubblicazione di dati confortanti in vitro ed in vivo circa l'efficacia di questo dispositivo medico (Illingworth 1998, Illingworth 2000), dopo un anno venivano pubblicati i primi dati che documentavano la colonizzazione sperimentale in vitro di queste valvole da parte di *Staphylococcus epidermis* (Cook 2000).

Da informazioni confidenziali risulta che su circa trentamila pazienti portatori di queste protesi, circa un terzo dei pazienti mostra segni di infezione. Mille sono deceduti. L'industria produttrice di questi dispositivi ha già ricevuto un grande numero di azioni legali.

Pace-makers cardiaci

La diagnosi di infezione sui pacemakers cardiaci viene posta raramente. Come per le valvole cardiache, anche in questo caso la sintomatologia infettiva compare tardivamente, viene spesso misconosciuta o confusa con il quadro clinico dell'endocardite.

Dai dati attualmente disponibili l'agente etiologico più comune appartiene alle specie degli Stafilococchi coagulasi negativi (92%). Questa osservazione ha suggerito l'ipotesi che per questo tipo di protesi la porta d'entrata dell'agente infettivo sia quasi sempre la sede d'ingresso del pacemaker attraverso il cavo ascellare.

Protesi ortopediche e impianti endossei

I primi impianti di protesi ortopediche artificiali risalgono alla fine degli anni trenta. Fino a pochi anni fa tutti i casi di infezione sono stati attribuiti al normale rischio infettivo perioperatorio

dovuto a scarsa asepsi. Fino alla fine degli anni novanta i casi di loosening del segmento protesico (mobilità dell'impianto nella sede operatoria associato a rarefazione ossea radiologicamente dimostrabile) sono stati attribuiti a rigetto della protesi.

Con grande sorpresa, in seguito alle prime osservazioni pubblicate da W. Costerton e A. Gristina (Gristina 1984) anche gli impianti ortopedici sono risultati sede di infezione da biofilm. In particolare è stata osservata la presenza di biofilm nelle protesi ortopediche rimosse per loosening ed avviate alla microscopia elettronica a scansione. Fino ad oggi non sono stati pubblicati studi di prevalenza di questa sede di infezione, ma sono state pubblicate osservazioni di casi sporadici di infezioni refrattarie alle terapie antibiotiche convenzionali.(Drancourt 1997)

Impianti odontoiatrici

Recentemente alcuni lavori hanno dimostrato che anche negli impianti odontoiatrici il cosiddetto rigetto (spesso attribuito ad una bassa biocompatibilità del materiale protesico) (Passariello et al 1993, Torelli 2001), è dovuto alla presenza di biofilm sul perno impiantato.

La presenza di biofilm impedisce la corretta osteointegrazione dell'impianto, ed impedisce le procedure ulteriori di caricamento del dente artificiale (O'Mahony 1999). Inoltre sono stati descritti casi di osteomieliti mandibolari conseguenti al posizionamento di impianti odontoiatrici endossei (perimplantite)

Cateteri venosi centrali : Numerosi studi hanno dimostrato la presenza di biofilms in un'altissima percentuale di cateteri venosi centrali (quasi il 100%), tuttavia in molti casi questa colonizzazione è silente (Anaissie E,1995). D'altra parte questi cateteri vengono usati in pazienti terminali o affetti da patologie gravi, nei quali il biofilm può essere un "reservoir" di infezione potenzialmente pericoloso negli immunocompromessi.(Passerini L 1992).

Cateteri urinari

Da molti anni è noto il fenomeno della resistenza alle terapie antibiotiche in pazienti portatori di cateteri urinari; per molto tempo i ricercatori hanno attribuito tale fenomeno alla capacità dei batteri che colonizzano il tratto urinario di aderire tenacemente alle cellule della mucosa uretrale e di invaderle. Solo recentemente è stato compreso che la principale causa della inefficacia delle terapie è dovuta alla colonizzazione dei cateteri urinari da parte di biofilms (Morris 1999)

TERAPIA E PREVENZIONE

Dalle prime descrizioni di biofilm adeso a dispositivi medici impiantabili artificiali sono stati effettuati molti tentativi per prevenire le infezioni da biofilm o per eradicare quelle già iniziate. E' necessario ricordare in questa sede che per quanto riguarda i manufatti protesici le infezioni sono state classificate da almeno dieci anni come perioperatorie (dal primo giorno dell'impianto fino ai successivi trenta giorni) "middle distance" (dopo uno o due anni dall'impianto) "long distance" (anche dopo dieci anni dal primo impianto protesico). Le infezioni perioperatorie possono essere paragonate ad una normale infezione settica all'atto operatorio, mentre le altre due vengono

contratte per via ematica da batteriemia transiente e quindi non possono essere prevenute a livello di profilassi antibiotica all'atto operatorio. Molti tentativi sono stati effettuati per prevenire o curare queste infezioni:

- profilassi antibiotica perioperatoria
- terapia antibiotica protratta nel tempo
- uso di molecole antibiotiche con scarso ingombro sterico potenzialmente capaci di permeare la matrice del biofilm
- protesi impregnate di antibiotico (valvole cardiache, cateteri urinari etc.)
- uso di terapie combinate fra vari tipi di antibiotici
- protesi impregnate di sostanze antibiofilm (sali d'argento)

Fino ad oggi nessuno di questi tentativi ha raggiunto l'obiettivo; infatti tutte queste strategie preventive e terapeutiche sono valse a contenere le infezioni da biofilm senza mai riuscire ad eradicarle, e senza ridurre la prevalenza dei casi fatali.

Poiché la resistenza del biofilm dipende dall'aggregazione dei batteri in comunità multicellulari una possibile strategia terapeutica potrebbe derivare dal disegno di molecole che disgregano la complessa impalcatura del biofilm; una volta ottenuto questo obiettivo le difese dell'ospite potrebbero essere capaci di eliminare il biofilm e l'efficacia degli antibiotici potrebbe essere recuperata. Farmaci potenzialmente utili a questo scopo potrebbero essere enzimi capaci di sciogliere i polimeri della matrice del biofilm (Selan et al 1993), reazioni chimiche che bloccano la sintesi della matrice (Yasuda H 1993), analoghi delle molecole coinvolte nel signalling microbico capaci di intervenire nelle comunicazioni intercellulari, terapie immunomodulanti.

3.2.a Riferimenti bibliografici

Alekshun MN et al. The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. Trends Microbiol. 1999; 7: 410-13

Anaissie E. et al. Role of catheter colonization and infrequent hematogenous seeding in catheter related infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1995; 14: 134-7.

Anwar H et al, 1989. Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostar system. Antimicrob Agents Chemoter. 1989; 33: 1824-26.

Barrett JF et al. Two component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42: 1529-1536.

Bollinger N et al. Gene expression in Pseudomonas aeruginosa: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilm-specific gene regulation. J Bacteriol. 2001; 183: 1990-96.

Cochran WL et al. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J. Appl Microbiol.* 2000; 88: 22-30.

Cook G. Direct confocal microscopy studies of the bacterial colonization in vitro of silver-coated heart valve sewing cuff. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 13: 169-73.

Costerton JW et al. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995; 49: 711-45.

Costerton JW et al. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1318-22.

Drancourt M. et al. Oral treatment of *Staphylococcus* spp. infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin. *J. Antimicrob Chemother.* 1997; 39:235-40.

Das JR et al. Changes in the biocide susceptibility of *staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* cells associated with rapid attachment to plastic surfaces. *J appl microbiol.* 1998; 84: 852-58.

De Beer D et al. Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng.* 1994; 43: 1131-38.

Edwards W.H. et al. Primary graft infections. *J.Vasc.Surg.* 1987; 6: 235-39.

Eng RHK et al. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35: 1824-28

Fann J.I. et al. Pontages extra-anatomiques. *Ann. Chir. Vasc.* 1993; 7: 378-83.

Gordon CA et al. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemoter.* 1988; 22: 667-74.

Gristina AG et al. Bacterial adherence and the glycocalyx and their role in musculoskeletal infection. *Orthop Clin North Am.* 1984; 15: 517-35.

Gristina AG et al. Biomaterial-centered sepsis and the total artificial heart: microbial adhesion versus tissue integration. *J Am Med Assoc.* 1988; 259: 870-77.

Hasset DJ et al. Genetics of quorum sensing circuitry in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for control of pathogenesis, biofilm formation and antibiotic biocide resistance. In U. Streips and R. Yasbin (ed). *Modern molecular genetics.* 2001. Wiley-Liss. New York. N.Y.

Illingworth BL et al. In vivo efficacy of silver coated (Silzone) infection resistant polyester fabric against a biofilm-producing bacteria, *Staphylococcus epidermidis*. *J Heart Valve Dis.* 1998; 8: 346-48.

Illingworth BL et al. In vivo efficacy of silver coated fabric against *Staphylococcus epidermidis*. *J Heart Valve Dis.* 2000; 9: 135-41.

Kumon H et al. A sandwich cup method for the penetration assay of antimicrobial agents through *Pseudomonas exopolysaccharides*. *Microbiol Immunol.* 1994; 38: 615-19.

Leschi J.P. et al. Epidémiologie des infections de prothèse artérielle. *Act. Chir.Vasc.* 1998; 14: 55-71

Liekweg W.G. et al. Vascular prosthetic infections: collected experience and result of treatment. *Surgery.* 1977; 81:335-42.

Lorentzen J.E. et al. Vascular graft infection: an analysis of sixty -two graft infections in 2411 consecutively implanted synthetic vascular grafts. *Surgery.* 1985; 98: 81-86.

Maira-Litran T. Expression of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. *J Appl Microbiol.* 2000; 88: 243-47.

Marrie TJ et al. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation.* 1982. 66: 1339-41.

Morris NS et al. Development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. *World J Urol.* 199; 17: 345- 50.

Nichols WW et al. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1988; 32: 518-23.

Novick RP et al. Synthesis of *Staphylococcal* virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 1993.; 3967-75.

O'Hara J.P. et al. Surgical management of infected abdominal aortic graft: review of a 25-year experience. *J. Vasc. Surg.* 1986; 3: 725-31.

O'Mahony A. et al. Osseointegrated implant failures. *J Ir Dent Assoc.* 1999; 45: 44-51.

Ophir T et al. A role for exopolysaccharides in the protection of the microorganisms from desiccation. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60: 740-45.

Passariello C. et al. Microbiological and morphological analysis of dental implants removed for incomplete osseointegration. *Microb Ecol Health Dis.* 1993; 6: 203-7.

Passerini L. et al. Biofilms on indwelling vascular catheters. *Crit Care Med.* 1992; 20: 665-73.

Roseby R. et al. Pseudomonas infection in CF (cystic fibrosis). *Thorax.* 2000; 55:1070-1

Seabrook G.R. et al. Anastomotic femoral pseudoaneurysm: an investigation of occult infection as an etiologic factor. *J.Vasc.Surg.* 1990; 11:629-34

Selan L. et al. Proteolytic enzymes: a new treatment strategy for prosthetic infections? *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37: 2618-21.

Shigeta M et al. Permeation of antimicrobial agents through Pseudomonas aeruginosa biofilms: a simple method. *Chemotherapy.* 1997; 43: 340-45.

Stoodley P et al. Liquid flow in biofilm systems. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60: 2711-16.

Torelli S. et al. Incidence and primary prevention of complications related to the placement of dental implants. *Rev Belge Med Dent* 2001; 56:35-61

Williams I et al. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in Staphylococcus aureus. *Microbiology.* 1997; 143: 2407-13

Yasuda H. et al. Interaction between biofilms formed by Pseudomonas aeruginosa and clarythromycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37: 1749-55.

Yeager R.A. et al. Infections artérielles et prosthétiques. *Ann. Chir. Vasc.* 1992; 6: 485-91.

Zhang TC et al. Evaluation of substrates and pH effects in a nitrifying biofilm. *Wat Environ Res.* 1996; 68: 1107-15.