

Batteri e biofilm nelle infezioni genito-urinarie

Biofilm and bacterial microorganisms in genito-urinary infections

Sandra Mazzoli

Centro per le Malattie a Trasmissione Sessuale, ASL 10, Firenze, Italy

biofilm consentono la sopravvivenza delle cellule batteriche in un ambiente ostile; la struttura estremamente complessa e l'eterogeneità metabolica e fisiologica che li caratterizzano suggeriscono un'analogia fra queste comunità e i tessuti di organismi superiori. I biofilm batterici, non facilmente eradicabili con le terapie antibiotiche convenzionali, interessano un gran numero di infezioni batteriche croniche.

I biofilm rappresentano una matrice coesiva di microrganismi ed altri costituenti cellulari che

possono essere presenti in qualsiasi ambiente naturale; essi sono inoltre caratterizzati dalla capacità di aderire alle superfici, da una eterogeneità strutturale, da una diversità genetica delle componenti, da interazioni complesse di comunità, anche miste, e da una matrice extracellulare di sostanze polimeriche [1].

Il biofilm prodotto da *Pseudomonas aeruginosa* è la causa della fibrosi cistica, una patologia che interessa oltre 70.000 persone in tutto il mondo. Nei soli Stati Uniti, la spesa sanitaria associata al

Tabella 1 - Patologie nelle quali sono implicati i biofilm batterici, con indicazione dei microrganismi più spesso coinvolti, e i dispositivi medici più spesso colonizzati.

Biofilm ed infezioni umane		Biofilm come contaminanti di presidi medici	
Infezioni o malattia	Biofilm (specie batterica principale)	Dispositivi contaminati	Biofilm (specie batterica principale)
Carie dentali	Cocchi Gram-positivi acidofili (es., <i>Streptococcus</i>)	Lenti a contatto	Cocchi Gram-positivi e <i>P. aeruginosa</i>
Periodontite	Flora batterica anaerobica orale Gram-negativa	Dispositivi per dialisi peritoneale	Flora batterica e fungina mista
Otite media	Ceppi di <i>H. influenzae</i>	Cateteri urinari	<i>E. coli</i> e altri bacilli Gram-negativi
Infezioni muscolo-scheletriche	Cocchi Gram-positivi (es., stafilococchi)	IUD	<i>Actinomyces israelii</i>
Fascite necrotizzante	Streptococchi Gruppo A	Dispositivi endotracheali	Flora batterica e fungina mista
Infezioni del tratto biliare	Batteri enterici (es., <i>Escherichia coli</i>)	Cateteri venosi	<i>S. epidermidis</i>
Osteomielite	Varie specie batteriche e fungine	Valvole cardiache meccaniche	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Endocardite	Streptococchi gruppo <i>viridans</i>	Inneschi vascolari	Cocchi Gram-positivi
		Dispositivi ortopedici	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Polmonite associata a fibrosi cistica	<i>P. aeruginosa</i> e <i>Burkholderia cepacia</i>	Protesi di vari organi	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>

trattamento di queste infezioni è superiore a 1 miliardo di dollari/anno. I biofilm sono implicati nelle infezioni correlate a catetere, responsabili, negli Stati Uniti, di circa 10.000 morti/anno, per un ammontare di spesa superiore a 11 miliardi di dollari/anno. Possono inoltre determinare infezioni delle vie urinarie, con una spesa di 1,6 miliardi/anno.

Di fatto, i biofilm possono colonizzare numerosi presidi medici, dalle lenti a contatto ai dispositivi per dialisi, dai dispositivi endotracheali alle valvole cardiache, e sono coinvolti in diverse patologie umane quali la carie dentaria, l'otite, le infezioni muscolo-scheletriche, ecc. Le ultime, in ordine cronologico, ad essere state associate con la produzione di biofilm sono state le infezioni urinarie e quelle prostatiche. In Tabella 1 sono riepilogate le patologie nelle quali sono implicati i biofilm batterici, con indicazione dei microrganismi più spesso coinvolti, e i dispositivi medici più spesso colonizzati.

Su scala più ampia, i biofilm sono responsabili di notevoli costi anche alle industrie, alle città e agli ospedali, in misura di 500 miliardi di dollari/anno per danni causati alle strutture e alle strumentazioni, per contaminazione dei prodotti, perdita di energia ed infezioni.

Nell'ambito dei microrganismi, si possono distinguere, generalmente, due diverse forme: quelle *free floating*, o planctoniche, in cui singole cellule fluttano o nuotano indipendentemente in un medium liquido, e i biofilm, in cui le cellule sono strettamente impacchettate e fermamente attaccate le une alle altre e solitamente ad una superficie solida. Il cambiamento di stato, tra *free floating* e biofilm, avviene in funzione di molti fattori, anche diversi tra le varie specie, tra cui grande importanza riveste il *quorum sensing*.

La coesione del biofilm, e la sua protezione, sono garantite da una matrice di composti polimerici escreti denominata EPS (esopolisaccaride o *Extracellular Polymeric Substance*) (Figura 1). Tale matrice esocellulare protegge le cellule al suo interno e ne facilita la comunicazione attraverso segnali biochimici. In alcuni biofilm sono stati trovati dei canali d'acqua attraverso i quali avviene la distribuzione di nutrienti e delle molecole di segnale. La forza della matrice è tale da consentire la fossilizzazione dei biofilm. Infatti, la presenza di biofilm è stata riscontrata anche su Marte, come riportato dalla NASA (Figura 2). Biofilm sono stati altresì ritrovati in differenti meteoriti provenienti da Marte e rinvenuti in Antartico, in Egitto (Nakhla) e in India (Shergotty).

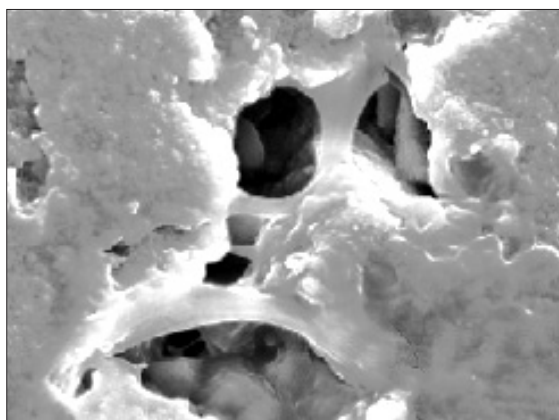


Figura 1 - Matrice esocellulare.

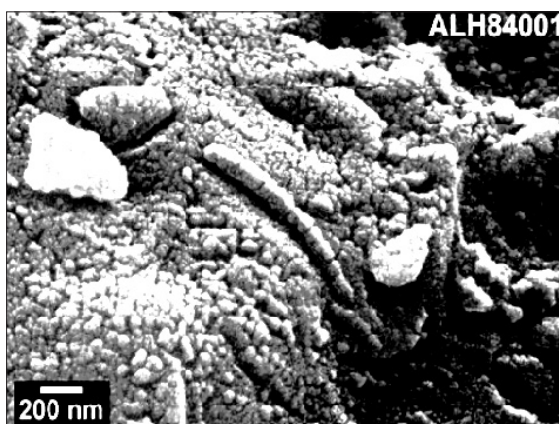


Figura 2 - Biofilm fossili da Marte (Riprodotta dal sito web della NASA).

In campo biomedico, i biofilm sono coinvolti in una vasta gamma di patologie, potendo interessare impianti cocleari, articolari, ortopedici, *pace-maker*, ecc.

Le strutture sessili di cui i biofilm sono dotati, le comunità multispecie di cui sono costituiti e l'influenza che le dinamiche dei flussi dei fluidi in cui sono immersi esercitano su di essi sono i fattori che hanno contribuito al considerare i biofilm come i *core reefs* del mondo microbico. Fasi cruciali della formazione del biofilm sono inizialmente l'attacco di forme planctoniche alla superficie, che avviene indipendentemente dalla natura liscia o rugosa di quest'ultima, cui seguono prima un momento di crescita e replicazione, con formazione di microcolonie, riscontrate anche *in vivo*, e quindi della formazione di biofilm vero e proprio, che va incontro ad un processo di maturazione e poi di distacco e dispersione. I biofilm sono strutture dinamiche, con correnti o addirittura onde presenti al

loro interno, che determinano il distacco di grossi blocchi di biofilm oppure la dispersione di forme planctoniche nuovamente fluttuanti. Dunque, la valutazione delle caratteristiche basilari dei biofilm consente di poterli definire come delle comunità cooperanti di vari tipi di microrganismi: microrganismi organizzati in microcolonie, circondate da matrice protettiva, all'interno delle quali si ritrovano ambienti differenti.

I microrganismi di un biofilm sono dotati di un sistema di comunicazione, ancorché primitivo, ed evidenziano delle peculiarità interessanti, sia da un punto di vista microbiologico che infettivologico, perché sono tendenzialmente resistenti agli antimicrobici e soprattutto alle risposte immunitarie dell'ospite.

Per molto tempo, si è ritenuto che, nell'uomo, uno dei meccanismi sottesi alla resistenza del biofilm all'attacco dei leucociti consistesse nella incapacità di questi ultimi di penetrare il biofilm. In effetti, i leucociti svolgono un ruolo chiave, come dimostrato in uno studio di Leid et al., condotto in un sistema di biofilm di *Staphylococcus aureus* e leucociti nel quale erano simulate condizioni simil-fisiologiche, che ha evidenziato come i leucociti siano in grado di attaccare e penetrare il biofilm, e di produrre citochine [2].

Ovviamente, la multicellularità di cui risulta costituito il biofilm si traduce in una migliore difesa dei microrganismi, contribuendo in maniera sostanziale alla loro sopravvivenza. La deplezione di nutrienti crea delle zone di alterazione dell'attività, gli strati cellulari più esterni del biofilm contribuiscono alla formazione di una sorta di barriera, in grado di assorbire il danno esterno.

I microrganismi più interni hanno il compito, in qualche misura, di elaborare una risposta allo stress intrinseco.

Nel biofilm, la resistenza agli antimicrobici convenzionali è legata principalmente alla loro neutralizzazione, e generalmente alla loro mancata penetrazione e, inoltre, al fatto che all'interno del biofilm sono presenti delle forme attive contro le quali gli antibiotici hanno scarsa attività. È quindi solo sulle forme planctoniche che gli antibiotici possono esplicare una buona attività.

Laddove presenti, i biofilm determinano una difficoltà di eradicazione dell'infezione, per le difficoltà di trattamento delle forme persistenti interne al biofilm stesso. Inoltre, anche l'eradicazione delle forme planctoniche richiede trat-

tamenti prolungati. In ogni caso, vi è la necessità di utilizzare antibiotici dotati di elevata penetrazione intracellulare, con caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche appropriate. Quindi, il trattamento delle infezioni da biofilm si configura particolarmente complesso. I microrganismi tendono ad evadere la terapia ricorrendo, appunto, a meccanismi diversi.

Per trattare le infezioni associate ai biofilm, esistono diverse possibili strategie: sostanze in grado di distruggere la matrice del biofilm (e.g., dispersina B), sostanze capaci di distruggere le cellule *persisters*, enzimi *quorum-quenching* che interferiscono con il fenomeno del *quorum sensing*, sostanze che provocano l'auto-distruzione del biofilm e poi, in particolare, delle strategie per rafforzare l'azione degli antimicrobici (e.g., corrente elettrica) [3, 4].

Il trattamento dei biofilm con antibiotici determina spesso un *killing* solo parziale, consentendo ai batteri sopravvissuti, presenti nella profondità del biofilm, di fungere da vero e proprio nucleo di propulsione per la diffusione dell'infezione dopo l'interruzione della terapia antibiotica.

Tale persistenza nel cuore del biofilm è legata alla presenza di microrganismi detti dormienti a bassa attività e che determinano il fenomeno delle persistenza.

L'attività metabolica in un *cluster* cellulare all'interno di un biofilm è funzione della profondità all'interno del biofilm ed è influenzata dal trasporto di nutrienti. Le cellule che si trovano in prossimità della superficie di una microcolonia sono quelle maggiormente attive. Viceversa, le cellule immerse maggiormente in profondità, all'interno della microcolonia, possono potenzialmente rimanere in uno stato di dormienza, costituendo un nucleo di ricrescita successivamente al trattamento antibiotico [5].

Si è detto che tra le infezioni correlate alla presenza di biofilm, quelle delle vie urinarie occupano una posizione di primo piano. Nell'ambito del tratto urinario, esistono delle difese antibatteriche spontanee dell'ospite, legate di norma al flusso urinario, alla osmolarità e al pH urinario, alla risposta infiammatoria mediata da citochine e polimorfonucleati, agli inibitori dell'adesività batterica, quali i mucopolisaccaridi della parete vescicale e le immunoglobuline secretorie A.

I biofilm prodotti da *Escherichia coli* sono stati tra i primi ad essere studiati.

La patogenesi dell'infezione da *E. coli* è legata alla presenza di pili (pili P) o di adesine, impor-

tanti fattori di virulenza che consentono a questi microrganismi di aderire, colonizzandolo, al tratto urinario e di formare biofilm. Nell'uroepitelio, i batteri possono persistere per lunghi periodi, formando i cosiddetti nidi di persistenza, dando luogo ad infezioni croniche. Una piccola frazione di cellule all'interno dei biofilm prodotti da *E. coli* sono dormienti all'interno del biofilm e pressoché immuni agli effetti degli antibiotici a causa del loro livello estremamente basso di attività metabolica. Allorquando il livello della concentrazione di antibiotico si riduce, le *persistor cells* divengono attive e provvedono alla ripopolazione/ricostituzione del biofilm. Tali cellule persistenti non costituiscono dei mutanti, bensì delle varianti fenotipiche del tipo *wild*. Tale dormienza potrebbe essere responsabile di altri fenomeni che si osservano in microbiologia, quali ad esempio le forme latenti di patogeni infettivi e l'impossibilità di ottenere colture per la maggior parte delle specie batteriche su mezzi sintetici.

Il fenomeno della persistenza riveste un ruolo di primaria importanza nella patogenesi della cistite.

Uno studio di Rosen et al. ha evidenziato con chiarezza che le comunità batteriche intracellulari (IBC) individuate nel modello murino esistono frequentemente anche nelle donne affette da infezioni vescicali, contribuendo alla recidiva di queste infezioni. Questi autori hanno infatti riscontrato nei campioni di urina ottenuti da pazienti con cistite acuta la presenza di batteri filamentosi e di IBC nel 41% e nel 18% dei casi, rispettivamente [6].

Tra gli agenti antimicrobici utilizzabili per il trattamento di queste patologie, i chinoloni rivestono una particolare importanza. La loro possibilità di utilizzo è legata alle caratteristiche delle molecole, anfotere e lipofile, alla possibilità di agire anche sulle cellule quiescenti, e infine alla buona penetrazione intracellulare.

Per il trattamento delle infezioni delle vie urinarie, è stato determinato l'effetto sinergico tra fosfomicina e acetilcisteina nella disaggregazione dei biofilm da *E. coli*.

Uno studio italiano ha infatti valutato l'effetto dell'associazione fosfomicina trometamolo + acetilcisteina, e dei singoli componenti dell'associazione, sui biofilm prodotti da *E. coli*, il batterio maggiormente responsabile delle infezioni delle vie urinarie.

L'acetilcisteina (NAC) ha determinato, ad elevate concentrazioni, una buona riduzione della massa dei biofilm, in misura finanche del 55%.

Analoghi risultati sono stati ottenuti con l'impiego della fosfomicina trometamolo. L'associazione di fosfomicina + acetilcisteina ha dimostrato un effetto sinergico.

La percentuale di disaggregazione del biofilm ha raggiunto un valore pari all'80,1%. Anche l'attività biocida dell'associazione è risultata più elevata rispetto a quella ottenuta con i singoli farmaci [7].

Un'analogha attività di inibizione della formazione di biofilm sembra essere esplicitata anche dalla combinazione fosfomicina-fluorochinoloni. Uno studio in vitro che ha valutato l'effetto combinato di fosfomicina con prulifloxacin, ciprofloxacina e levofloxacina sulla formazione di biofilm prodotti da *P. aeruginosa* ha evidenziato che la bioattività del patogeno formante biofilm che non era stato completamente eradicato dall'antibiotico singolo diminuisce dopo trattamento con le combinazioni [8]. Pertanto, il trattamento con fosfomicina e fluorochinoloni con attività antipseudomonas è risultato sinergico ed efficace nell'eradicare le cellule sessili di *P. aeruginosa* nel biofilm e promette di essere un trattamento ottimale nelle infezioni associate a biofilm.

In uno studio di bioingegneria, alcuni ricercatori hanno indotto, in un batteriofago, l'espressione di un enzima in grado di degradare i biofilm mediante attacco simultaneo alle cellule batteriche e alla matrice del biofilm [9].

Tra i microrganismi responsabili di infezioni delle vie urinarie, un ruolo predominante spetta a *E. coli*, sia in ambito comunitario che nosocomiale. In Figura 3 è visualizzata un'immagine ottenuta mediante microscopio elettronico a

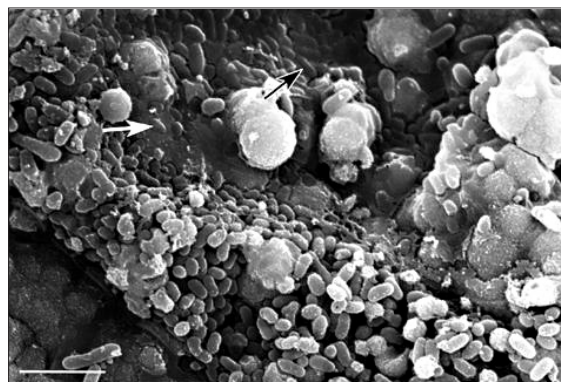


Figura 3 - Biofilm e cateteri. Superficie luminale di un catetere di Foley rimosso da un paziente affetto da infezione delle vie urinarie associata a catetere. (Frecce bianche: cocci; frecce nere: bacilli). Reprinted with permission from Urology (1989; 34: 284-291), Copyright © 1989, Excerpta Medica, Inc.

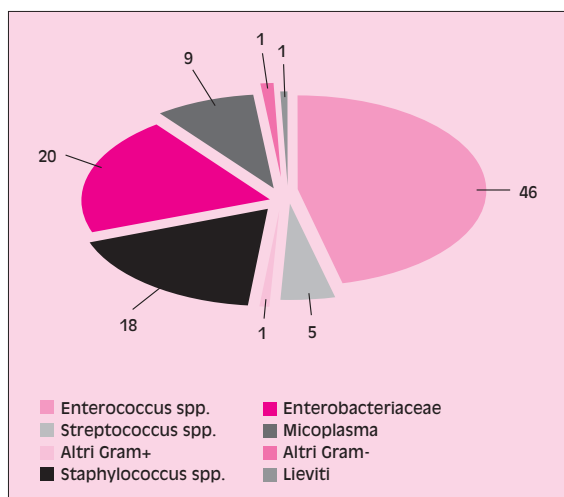


Grafico 1 - Percentuali di prevalenza dei diversi microrganismi (n=2.710) isolati da pazienti affetti da prostatite cronica (n=6.967) nel periodo 2004-2008.

scansione della superficie luminale di un catetere di Foley rimosso da un paziente con infezione delle vie urinarie associata a catetere. Nella figura è ben distinguibile la colonizzazione massiva della superficie del catetere da forme coccoide (frecce bianche) e bacillari (frecce nere) che hanno formato un biofilm aderente e spesso. Dalle infezioni urinarie si può passare, con un meccanismo *ping-pong*, all'infezione prostatica. Questo può verificarsi in conseguenza di meccanismi diversi: infezione uretrale ascendente, reflusso di urina infetta nei dotti prostatici nell'uretra posteriore, invasione di batteri rettali attraverso estensione diretta o per diffusione, per via linfatica o ematogena.

Tabella 2 - Microrganismi isolati da pazienti con prostatite cronica batterica: studio *in vitro* su 150 patogeni.

<i>Enterococcus faecalis</i>	50
<i>Staphylococcus spp.</i>	50
<i>S. aureus</i>	3
<i>S. haemolyticus</i>	23
<i>S. epidermidis</i>	10
<i>S. warneri</i>	5
<i>S. capitis, hominis, ludgenensis, simulans</i>	9
<i>Escherichia coli</i>	30
Gram negativi - miscellanea	20
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8
<i>Citrobacter spp.</i>	3
<i>Enterobacter spp.</i>	4
<i>Pseudomonas spp.</i>	2
<i>Proteus spp.</i>	3

Le risposte dell'ospite sono affidate all'attività dei leucociti polimorfonucleati e ai macrofagi nelle secrezioni prostatiche.

Nell'eziologia delle infezioni prostatiche, sta oggi emergendo il ruolo dei Gram positivi. Tra i microrganismi più spesso implicati si riscontrano, in primis, *Escherichia coli* ma anche altri esponenti della famiglia delle *Enterobacteriaceae* quali *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* e *Serratia spp.*

Sono altresì presenti *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium* gruppo ANF, *Corynebacterium seminale* nonché batteri anaerobi.

In una precedente rassegna personale era già stato posto l'accento sull'emergenza di prevalenza dei Gram positivi nelle prostatiti batteriche [10]. Attualmente, in un altro studio personale, condotto nel periodo 2004-2008 in pazienti con prostatite cronica, si è evidenziata, su un totale di 2.710 isolamenti culturali, una netta prevalenza dei Gram positivi (68,8% [1867/2710], di cui enterococchi nel 46% e stafilococchi nel 18%) rispetto ai Gram negativi (21% [591/2710] di cui enterobatteri = 20%) (Grafico 1).

Sulla base di quanto fin qui esposto, e dei dati osservati nel nostro studio, ha avuto inizio, nel 2008, uno studio in collaborazione con la U.O. di Urologia dell'Università di Firenze rivolto allo studio dei microrganismi implicati nell'eziologia delle prostatiti batteriche croniche.

Sono stati isolati 150 stipiti batterici da pazienti con prostatite cronica batterica/NIH II. I ceppi identificati e caratterizzati (Tabella 2), sono stati studiati con il classico metodo di Cristensen per la produzione di biofilm wild base.

I dati preliminari dello studio *in vitro* sulla produzione del biofilm batterico da parte dei 150 stipiti patogeni di queste prostatiti batteriche croniche sono riportati in Tabella 3.

Complessivamente tutti gli stipiti in studio hanno dimostrato un'ottima capacità di produrre biofilm *in vitro*: in particolare, *E. coli* ha espresso una capacità di produzione di biofilm media e forte nel 30% e nel 63% dei casi, rispettivamente; questo risultato conferma che anche gli stipiti di *E. coli* che si isolano nell'apparato urogenitale alto maschile, e non solo quelli di origine e patogenicità urinaria, hanno fattori di virulenza massivamente espressi (emolisi) e sono forti produttori di biofilm, un dato fino ad oggi non noto.

Comunque, non soltanto *E. coli*, ma anche altri batteri Gram negativi, quali quelli appartenen-

Tabella 3 - Studio su 150 ceppi batterici isolati da pazienti con prostatite cronica batterica: percentuale di produzione di biofilm wild base.

	<i>E. coli</i> (n=30)	<i>Gram negativi</i> (n=20)	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=50)	<i>Staphylococcus spp.</i> (n=50)
Forti produttori	63	75	58	42
Medi produttori	30	15	14	42
Scarsi produttori	0	5	14	18
Non produttori	6	5	14	0

ti al genere *Klebsiella* ed altri, si sono dimostrati ottimi produttori di biofilm: il 75% è risultato forte produttore, ed il 15% medio produttore. Complessivamente, il 90% di questi ceppi Gram negativi ha evidenziato una capacità produttiva di biofilm medio/alta.

Anche i Gram positivi, in particolare *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus spp.*, hanno evidenziato un'ottima capacità di produrre biofilm, anche se in percentuale minore rispetto ai Gram negativi; rispettivamente, si sono espressi come forti produttori nel 58% gli enterococchi e nel 42% gli stafilococchi, confermando ca-

pacità già note, ma prevalentemente per gli stafilococchi.

Considerando che in questi pazienti si isolano prevalentemente stafilococchi coagulasi negativi (CNS, *Coagulase Negative Staphylococci*), quale *Staphylococcus haemolyticus*, questi dati appaiono estremamente importanti nella attribuzione di patogenicità verso organi quali la prostata umana e confermano la necessità di utilizzare antibiotici adeguati in concentrazione, tipo e capacità di penetrazione intracellulare.

Key words: biofilm, genito-urinary infections.

RIASSUNTO

I biofilm rappresentano una "matrice coesiva di microrganismi ed altri costituenti cellulari" che possono essere presenti in qualsiasi ambiente naturale.

I microrganismi capaci di creare biofilm vanno incontro ad una serie di fenomeni caratteristici e tipici come l'adsorbimento sulle superfici cellulari infette, adsorbimento che diviene irreversibile e definisce un cambiamento nella loro fisiologia.

I biofilm giocano inoltre un ruolo fondamentale nel permettere ai microrganismi di sopravvivere e di diffondersi nell'ospite, in quanto la matrice esocel-

lulare protegge i batteri patogeni dagli anticorpi e dalle cellule immunocompetenti deputate alla loro distribuzione, nonché dall'effetto degli antibiotici. Pertanto, l'uso di antibiotici capaci di penetrare attraverso la membrana cellulare e di agire all'interno della cellula, nonché nella matrice esocellulare deve essere considerato rilevante nel trattare infezioni in cui possono essere coinvolti microrganismi "biofilm produttori", visto il loro comportamento aggressivo, virulento e la loro tendenza alla resistenza agli antibiotici.

SUMMARY

Biofilms represent a cohesive matrix of microorganisms and other cellular constituents that might be present in any natural environment. Microorganisms able to produce biofilms undergo a number of distinctive and typical phenomenon, such as adhesiveness on infected cellular surfaces that consequently becomes irreversible, so deeply changing the microorganisms physiological status. In addition, biofilms play a central role in consenting microorganisms to survive and subsequently to spread in the

host, since exocellular matrix protects pathogen bacteria from antibodies and immunocompetent cells devoted to their destruction, and from antimicrobial agents.

So, use of antimicrobials able to penetrate cellular membrane and to act into the cell has to be considered as essential in the treatment of infections that may possibly involve biofilm-producer microorganisms, considering their aggressive and virulent behaviour and their intrinsic bacterial resistance.

■ BIBLIOGRAFIA

- [1] Battin T.J., Sloan W.T., Kjelleberg S., et al. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (1), 76-81, 2007.
- [2] Leid J.G., Shirtliff M.E., Costerton J.W., Stoodley A.P. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect. Immun.* 70 (11), 6339-6345, 2002.
- [3] Donelli G., Francolini I., Romoli D., et al. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (8), 2733-2740, 2007.
- [4] Zhang L.H. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci.* 8 (5), 238-244, 2003.
- [5] Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2 (2), 114-122, 2003.
- [6] Rosen D.A., Hooton T.M., Stamm W.E., Humphrey P.A., Hultgren S.J. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med.* 4 (12), e329, 2007.
- [7] Bozzolasco M., Schito G.C., Marchese A. Effetto di fosfomicina e N-Acetil-cisteina da sole o in associazione sulla fisiologia di biofilm prodotti da *E. coli*. *GIMMOC* 7, 1-14, 2002.
- [8] Mikuniya T, Kato Y, Kariyama R, Monden K, Hikida M, Kumon H. Synergistic effect of fosfomicin and fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *Acta Med. Okayama* 59 (5), 209-216, 2005.
- [9] Lu T.K., Collins J.J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (27), 11197-11202, 2007.
- [10] Mazzoli S. Conventional bacteriology in prostatitis patients: microbiological bias, problems and epidemiology on 1686 microbial isolates. *Arch. Ital. Urol. Androl.* 79 (2), 71-75, 2007.