

TVORBA BIOFILMU AKO DÔLEŽITÝ KLINICKÝ PROBLÉM *BIOFILM FORMATION AS AN IMPORTANT CLINICAL PROBLEM*

KAŠLÍKOVÁ Katarína^{1,2}, MELUŠ Vladimír¹, KRAJČOVIČOVÁ Zdenka¹,
ČERNICKÝ Miroslav¹, SLOBODNÍKOVÁ Jana¹

¹Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

²Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, Bratislava, študentka doktorandského štúdia

ABSTRAKT

Tvorba biofilmu je veľmi účinnou stratégiou prežitia baktérií a húb, ktorou sa prispôbujú životnému prostrediu, najmä za nepriaznivých okolností. Po vytvorení biofilmu v podobe viacvrstevného spoločenstva mikroorganizmov v polysacharidovej matici sa mikrobiálne bunky, ktoré sa v ňom nachádzajú, stávajú tolerantnými a rezistentnými voči antibiotikám a reakciám imunitného systému, čo zvyšuje ťažkosti pri klinickej liečbe infekcií. Klinické a laboratórne vyšetrenia preukázali na priamu súvislosť medzi výskytom infekcií spôsobených mikroorganizmami tvoriacimi biofilm (biofilmové infekcie) a prítomnosťou lekárskeho implantátu alebo prístrojov. Doterajšie klinické a epidemiologické štúdie jasne preukázali, že na eradikáciu biofilmových infekcií je samotná liečba antibiotikami vo väčšine prípadov nedostatočná.

Kľúčové slová: Biofilm. Biofilmové infekcie. Rezistencia

ABSTRACT

Biofilm formation is a very effective strategy for the survival of bacteria and fungi by which they adapt to the environment, especially in adverse circumstances. Upon formation of a biofilm in the form of a multi layered community of microorganisms in the polysaccharide matrix, the microbial cells found therein become tolerant and resistant to antibiotics and immune system responses, which increases difficulties in the clinical treatment of infections. Clinical and laboratory investigations have shown a direct relationship between the occurrence of biofilm-forming infections (biofilm infections) and medical implants or devices. Previous clinical and epidemiological studies have clearly demonstrated that antibiotic treatment alone is in most cases insufficient to eradicate biofilm infections.

Key words: Biofilm. Biofilm infections. Resistance.

ÚVOD

Biofilmy sú spoločenstvá mikrobiálnych buniek, ktoré rastú na natívnych alebo arteficiálnych a inertných povrchoch. Jednotlivé bunky biofilmu sú zakotvené v extracelulárnej polymérnej matici vytvorenej z exopolysacharidov, nukleových kyselín a proteínov. Biofilmy sú vysoko odolné voči obranným mechanizmom hostiteľa, čiastočne kvôli svojej exopolysacharidovej matici a zníženej rýchlosti metabolizmu buniek. Vďaka zníženému metabolizmu odolávajú imunitným reakciám hostiteľa a vykazujú vyššiu rezistenciu voči antibiotikám.

Štúdie zamerané na mechanizmy ich prežitia potvrdzujú, že sú komplexné a rozmanité. Štrukturálna a fyziologická zložitosť biofilmov viedla k idei, že sú to koordinované a spolupracujúce komunity baktérií, analogické k mnohobunkovým organizmom (Nadell et al., 2009, Costerton et al., 1999; Kašlíková et al., 2018).

Formácia biofilmu sa považuje za adaptáciu mikróbov na nepriateľské prostredie. Typický vývoj biofilmu zahŕňa niekoľko štádií, t.j. pripojenie k povrchu, tvorba mikrokolónii, vývoj mladého biofilmu, diferenciacia štruktúrovaného zrelého biofilmu a disperzia zrelého biofilmu. Experimentálne dôkazy u *Pseudomonas aeruginosa* realizované *in vitro* ako aj *in vivo* jasne ukázali, že biofilmové bakteriálne bunky sú signifikantne viac rezistentné voči antibiotikám a imunitnej obrane hostiteľa ako ich planktónové formy (Yang et al., 2012).

Aj keď je dobre známe, že liečba antibiotikami je v súčasnosti najdôležitejším a najúčinnjším opatrením na kontrolu mikrobiálnych infekcií, liečbou antibiotikami je takmer nemožné eradikovať infekcie spôsobené s biofilmom. Štúdie jednoznačne ukázali, že minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) a minimálna baktericídna koncentrácia (MBC) pre biofilmové bakteriálne bunky boli zvyčajne oveľa vyššie (približne 10-1 000 krát) ako na planktónové bakteriálne bunky (Yang et al., 2012).

Podľa National Institutes of Health je viac ako 65% všetkých mikrobiálnych infekcií spôsobených biofilmami. Tento údaj sa zdá byť realistický z pohľadu zistení, že bežné infekcie ako infekcie močových ciest (spôsobené *Escherichia coli* alebo inými patogénmi), infekcie katétra (spôsobené *Staphylococcus aureus* a inými grampozitívnymi patogénmi), infekcie stredného ucha u detí (spôsobené *Haemophilus influenzae*), tvorba zubného plaku a gingivitída sú spôsobené biofilmami a ťažko sa liečia, resp. často recidivujú (Lewis, 2001).

BIOFILMY – KOMPLIKÁCIA OCHORENÍ

Úloha biofilmov pri vzniku chronických ochoro-

rení (napr. chronické rinosinuitídy, chronické rany, cystické fibrózy, kardiovaskulárne ochorenia, urogenitálne infekcie a iných) sa čoraz viac preukazuje ako veľmi významný rizikový faktor.

Chronická rinosinuitída

Etiológia chronickej rinosinuitídy (CRS) je multifaktoriálna. Existuje stále viac dôkazov, že biofilmy sú rozhodujúce pre patofyziológiu chronických infekcií vrátane chronickej rinosinuitídy. Interakcia medzi mnohými systémovými, lokálnymi hosťiteľmi a environmentálnymi faktormi prispieva k rozvoju sínusitídy. Možné environmentálne faktory vyvolávajúce chronickú sínusitídu zahŕňajú prítomnosť biofilmov a bakteriálnych infekcií, ako aj plesňové infekcie, alergie, znečisťujúce látky v životnom prostredí a fajčenie (Fastenberg et al., 2016). Foreman a kol. vo svojej štúdií preukázali, že biofilm tvorený *Staphylococcus aureus* bol identifikovaný v 50% u pacientov s CRS, *Pseudomonas aeruginosa* a *Haemophilus influenzae* boli identifikovaní v 22% a 28% pacientov (Foreman et al., 2012). Ďalšie bakteriálne druhy vytvárajúce biofilmy u pacientov s CRS boli *Streptococcus viridans*, koaguláza-negatívne stafylokoky a *Enterococcus faecalis* (Zernotti et al., 2010).

Chronické rany

Bakteriálne biofilmy boli jednoznačne identifikované aj v chronických ranách. Včasné dôkazy o bakteriálnych biofilmoch existujúcich v ranách boli odvodené z experimentálne vyvolaných chronických rán u zvierat a následne boli demonštrované na klinických ranách (Lam et al., 1999, Wright et al., 1999). Značná heterogenita existuje v bakteriálnej kolonizácii chronických rán, pričom patogénne baktérie sa stávajú dominantnou mikroflórou na úkor komenzálnych druhov (Thomson, 2011). Typ a relatívny počet prítomných baktérií sa výrazne líši od rany k rane. Štúdia Percival et al. preukázala až 17 rodov baktérií (aeróbných a anaeróbných) na jednu ranu. Cowan et al. preukázali, že typický nález predstavoval 12-20 rôznych druhov mikroorganizmov na ranu, pričom nebol neobvyklý dokonca ani dôkaz 60 rôznych typov (Percival et al., 2012, Cowan 2011).

Obmedzenie koncentrácie kyslíka hlbšie v biofilme podporuje proliferáciu anaeróbov pri chronických ranách. Okrem celkovej bakteriálnej záťaže rany je tiež dôležité zvaženie prítomných druhov a ich vzájomnej interakcie v rane (Thomson, 2011).

Biofilmy obsahujú bunky vo všetkých štádiách rastového cyklu. V hlbších vrstvách biofilmu sa nachádzajú mikroorganizmy so zníženou rýchlosťou rastu. Konkrétna rýchlosť rastu baktérií závisí od všeobecnej stresovej reakcie, ktorá chráni baktérie pred negatívnymi environmentálnymi faktormi. Sú nimi najmä účinky zmien pH, koncentrácia chemických látok, osmolalita a účinok chemikálií, ktoré ovplyvňujú aktívny rast baktérií. Okrem toho biofilmy obsahujú mnoho koncentračných gradientov, ktoré vytvárajú mikroprostredie, majúce negatívny vplyv na antibiotiká a antiseptiká, pričom v niektorých prípadoch podporujú rast jednotlivých mikrobiálnych druhov. Tieto mikroprostredia môžu zahŕňať aeróbne a anaeróbne podmienky (Percival et al., 2011). Niektorí autori potvrdzujú, že väčšina biofilmových buniek sa zdá byť zničená antibiotikami, ale pri chronických ranách po liečbe dochádza k rýchlej regenerácii biofilmu. Toto svedčí o prítomnosti perzistujúcich buniek. Odhaduje sa, že perzistujúce bunky tvoria 0,1 % až 10 % biofilmu a existujú aj v kultúrach planktónu (Singh et al., 2009).

Cystická fibróza

Pľúca pacientov s cystickou fibrózou (CF) sú kolonizované a infikované baktériami už od útleho veku. Tieto baktérie prosperujú v zmenenom hliene, ktorý sa zhromažďuje v pľúcach. Postupom času sa u osôb s CF menia typy baktérií a aj ich individuálne charakteristiky. V počiatočnom štádiu kolonizujú a infikujú pľúca bežné baktérie ako *Staphylococcus aureus* a *Hemophilus influenzae*. Neskôr dominuje gram-negatívna flóra (najčastejšie *Pseudomonas aeruginosa* alebo *Burkholderia cepacia*), ktorá kolonizuje cystické fibrózne dýchacie cesty a vyvoláva pretrvávajúce infekcie sprevádzané tvorbou biofilmu. *Pseudomonas aeruginosa* je často hlavnou príčinou morbidity a mortality u pacientov s cystickou fibrózou. Keď sa tieto baktérie nachádzajú v pľúcach, prispôbujú sa prostrediu a vyvíjajú rezistenciu na bežne používané antibiotiká (Elkin, 2003, Hengzhuang et al., 2012).

Kardiovaskulárne ochorenia

Štúdia Ott et al. (2006) potvrdila rôzne skupiny bakteriálnych druhov v aterosklerotických léziách pacientov s koronárnym srdcovým ochorením. Katz a Shannon (2006) potvrdili štúdiu Ott et al. (2006) a dospeli k záveru, že aterosklerotické plaky sa skladajú z plne funkčného biofilmu. Vlastnosti zrelej ar-

teriálnej steny ju robia vhodnou na tvorbu biofilmu, a práca poukazuje neúčinnosť antibiotík, ako sú makrolidy alebo fluorochinolóny.

Napriek nedávnomu pokroku v diagnostike a liečbe je infekčná endokarditída (IE) stále spojená s vysokou chorobnosťou a úmrtnosťou. Dokonca aj predĺžené cykly podávania širokospektrálnych antimikrobiálnych látok často nedokážu odstrániť infekciu, čo v mnohých prípadoch vyžaduje chirurgický zákrok (Elgharably et al., 2016). Mikroby spôsobujúce IE majú schopnosť kolonizovať srdcové štruktúry a v nich vyvíjať biofilmy, čím sa chránia pred antibiotikami a obranyschopnosťou hostiteľa, uľahčujú inváziu a deštrukciu tkaniva a vedú k pretrvávajúcim a recidivujúcim infekciám (Cahill et al., 2017).

Urogenitálne infekcie

Infekcie močových ciest spojené s katétrom sú najčastejšou nozokomiálnou infekciou, ktorá súvisí s tvorbou mikrobiálneho biofilmu v močovom katétre (UC). Okrem intermitentných infekcií močových ciest s identickým patogénom môže viesť aj k urosepsii. Výmena infikovaného UC nie je zložitá, dôležité je však načasovanie. Odporúča sa vymeniť infikovaný UC po 48 hodinách primeranej liečby citlivými antibiotikami, aby sa minimalizovala koncentrácia baktérií v močovom mechúre a močovom trakte. V opačnom prípade by nové UC boli rýchlo kolonizované baktériami za vzniku nového biofilmu (Raad, 2002).

Parseka et al. uvádza, že biofilmy sa podieľajú aj na tvorbe obličkových kameňov. Kamene vyvolávajú príznaky ochorenia tým, že bránia prietoku moču, spôsobujú zápal a opakovanú infekciu, ktorá môže viesť k zlyhaniu obličiek. Približne 15-20 % obličkových kameňov sa vyskytuje pri infekcii močových ciest. Vznik obličkových kameňov je súhra medzi infikujúcimi baktériami a minerálnymi substrátmi nachádzajúcimi sa v moči. Výsledkom tejto interakcie je komplexný biofilm zložený z baktérií, bakteriálnych exoproduktov a mineralizovaného kamenného materiálu (Parsek, 2003).

Biofilmy na arteficiálnych povrchoch

Endokarditickí pacienti s protetickými srdcovými chlopňami alebo kardiostimulátormi sú vystavení riziku intermitentnej sepsy, srdcovej insuficencie a infekčných embolických komplikácií. Preto pri potvrdení infekcie je potrebná výmena infikovaných protetických srdcových chlopní alebo

kardiostimulátorov v kombinácii s agresívnou a citlivou antibiotickou liečbou (Nataloni et al., 2010).

Častým problémom bývajú infekcie centrálného venózneho katétra (CVC) alebo dialyzačného katétra. Keď baktérie vytvoria biofilm na CVC alebo dialyzačnom katétri, možno u pacientov očakávať prerušovanú bakteriémiu s identickým bakteriálnym druhom. Okrem toho miera pozitivity krvných kultúr odobratých z infikovaného katétra je zvyčajne vyššia ako z periférnych žíl a čas do pozitivity je najmenej o dve hodiny kratší, ak sa krv odoberá s pomocou CVC obsahujúceho biofilm v porovnaní s paralelným odberom krvi (Mermel et al., 2009).

Na vyliečenie týchto biofilmovo-katétrových infekcií je dôležitá výmena infikovaného katétra. Po nej nasleduje liečba intravenóznymi antibiotikami, slúžiaca na elimináciu baktérií uvoľnených do krvného obehu z infikovaného katétra (Mermel et al., 2009).

V mnohých prípadoch recidivujúce ochorenie nie je spôsobené opätovnou infekciou, ako sa pôvodne predpokladalo, ale pochádza z perzistentného biofilmu. Výskumy potvrdzujú, že akonáhle sa vytvoria biofilmy, planktónové baktérie môžu periodicky opúšťať biofilm sami. Keď tak urobia, môžu sa rýchlo množiť a rozptýliť. Existuje prirodzený vzor programovaného oddeľovania planktónových buniek od biofilmov. Ak sa planktónové baktérie periodicky uvoľňujú z biofilmov, zakaždým, keď sa do tkanív dostanú jednotlivé bakteriálne formy, imunitný systém sa náhle dozvie o ich prítomnosti. Môže pokračovať v zápalovej odpovedi, ktorá vedie k zvýšeným symptómom ochorenia. Pravidelné uvoľňovanie planktónových baktérií z niektorých biofilmov môže byť príčinou mnohých chronických recidivujúcich infekcií (Parsek, 2003).

Klinické príznaky biofilmových infekcií

Zrelé biofilmy sú významne rezistentné voči antibiotikám a sú permanentným zdrojom planktónových buniek, ktoré sa uvoľňujú a rozptýľujú do prostredia. Typická infekcia spojená s biofilmom je zvyčajne chronická infekcia s prerušovanými exacerbáciami. Liečba antibiotikami by mohla byť nápomocná pri kontrole akútnych exacerbácií, ale je ťažké eradikovať infekciu. Všeobecne môže byť podozrenie na infekciu biofilmom, ak pacient má jeden z klinických prejavov uvedených v tabuľke 1 (Wu et al., 2015).

Tabuľka 1 Klinické príznaky pri podozrení na biofilmové infekcie (Wu et al., 2015; Omar et al., 2017; Tan et al., 2014)

Možná biofilmová infekcia	Klinické prejavy a paraklinické zmeny	Bežné patogény
Endokarditída	<ul style="list-style-type: none"> • pacienti, ktorí majú alebo nemajú protetické srdcové chlopne alebo kardiostimulátor • pacienti s prerušovanou horúčkou a bakteriémiou s identickým patogénom a bez zrejmeho zamerania • zvýšenie hodnoty CRP / alebo rýchlosť sedimentácie erytrocytov s leukocytózou alebo bez leukocytózy 	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus</i> species koaguláza negatívne stafylokoky <i>Enterococcus</i> spp.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm u pacientov s CF/COPD	<ul style="list-style-type: none"> • prítomnosť mukoidnej formy <i>Pseudomonas aeruginosa</i> v spúte u pacientov s CF alebo CHOCHP 	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Intravenózný katéter	<ul style="list-style-type: none"> • pacienti s centrálnym venóznym katétrom alebo hemodialyzačným katétrom, ktorí majú opakovanú bakteriémiu s identickým patogénom 	koaguláza negatívne stafylokoky
Močový katéter	<ul style="list-style-type: none"> • pacienti s močovým katétrom, ktorí majú opakované infekcie močového traktu s rovnakým patogénom 	Gram-negatívne rody <i>Candida</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp.
Ortopedické implantáty	<ul style="list-style-type: none"> • pacienti s kĺbovými protézami alebo ortopedickými fixačnými prostriedkami, ktorí majú lokálnu chronickú bolesť a príznaky uvoľňovania protézy 	<i>Staphylococcus aureus</i> koaguláza negatívne stafylokoky
Chronické rany	<ul style="list-style-type: none"> • pacienti s chronickými ranami a opakovanými infekciami rán 	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Legenda: CF - cystická fibróza; CHOCHP - chronické obštrukčné pľúcne ochorenia.

Štandardné mikrobiologické vyšetrenie zahŕňa odber vzoriek, kultiváciu, identifikáciu a testovanie citlivosti na antibiotiká. U pacientov, ktorých existuje podozrenie na infekcie súvisiace s biofilmom spojeným s cudzími telesami je potrebných najmenej 4-5 kusov biopsie tkaniva z rôznych miest vedľa endoprotézy, aby sa zabránilo falošne negatívne výsledku. Protézy, katétre alebo stenty a iné cudzie telesá, ktoré boli odobraté pacientom z dôvodu podozrenia z biofilmových infekcií, by mali byť odoslané na mikrobiologické vyšetrenia. Pokiaľ ide o mikroskopické a kultivačne negatívne vzorky, ak sú pacienti vysoko podozriví z klinického nálezu biofilmov, ďalšie mikrobiologické techniky môžu byť užitočné pri diagnostike biofilmových infekcií. Ukázalo sa, že hybridizácia *in situ* s fluorescenčnou značenou nukleovou kyselinou je užitočná na identifikáciu infekcií biofilmu pri cystickej fibróze a chronických ranách (Rickerts et al., 2011).

DISKUSIA A ZÁVER

Infekcie súvisiace s biofilmami sa ťažko eradikujú a za posledných 30 rokov boli predmetom intenzívneho vedeckého výskumu. Mikroorganizmy

musia byť schopné vnímať svoje prostredie a modifikovať svoje fyziologické procesy, aby sa lepšie prispôbili a tým prežili. S pokrokom lekárskeho vied sa stále viac zdravotníckych pomôcok a implantátov používa pri liečbe ľudských ochorení. V dôsledku toho sa bakteriálne biofilmové infekcie stávajú častými. Príklady infekcií spojených s biofilmami zahŕňajú kolonizáciu implantovaných zdravotníckych pomôcok ako sú centrálné venózne katétre, kĺbové protézy, močové katétre, kardiostimulátory a mechanické srdcové chlopne, zubný kaz, pľúcne infekcie u pacientov s cystickou fibrózou a chronické rany.

Liečba infekcií biofilmom je v súčasnosti zložitou výzvou pre mikrobiológov ako aj klinikov. Samotná liečba antibiotikami je často na prekonanie biofilmových infekcií nedostatočná. Pokroky vo výskume nám však poskytujú podrobnejšie vedomosti, ktoré prinášajú prospech a budú naďalej podporovať naše úsilie v boji proti infekciám spôsobeným biofilmom. V súčasnosti vyžaduje liečba biofilmových infekcií spoluprácu v klinickej mikrobiológii, chirurgii, internom lekárstve, farmakológii

a základných vedách, t.j. multidisciplinárnej spolupráci.

Pod'akovanie

Tento príspevok vyšiel s podporou nasledovných projektov: A) „Dobudovanie technickej infraštruktúry pre rozvoj vedy a výskumu na Trenčianskej univerzite Alexandra Dubčeka prostredníctvom hyperbarickej oxygenoterapie“ ITMS kód 26210120019 Operačného programu Výskum a vývoj a B) „Vzťah medzi zložením, štruktúrou a vlastnosťami anorganicko-organických nanokompozitných vrstiev pre ochranu materiálov“. Grantová agentúra: VEGA, č. 1/0431/18.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- CAHILL T.J., BADDOUR L.M., HABIB G. et al. Challenges in infective endocarditis. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 69 (3): 325-344.
- COSTERTON J.W., STEWART P.S., GREENBERG E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1318-1322.
- COWAN T. Biofilms and their management: From concept to clinical reality. *J Wound Care.* 2011; 20: 222-226.
- ELGHARABLY H., HUSSAIN S.T., SHRESTHA N.K. et al. Current Hypotheses in Cardiac Surgery: Biofilm in Infective Endocarditis. *Semin Thorac Cardiovasc Surg. Spring.* 2016; 28 (1): 56-59.
- ELKIN S., GEDDES D. Pseudomonal infection in cystic fibrosis: the battle continues. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2003; 1 (4): 609-1818.
- FASTENBERG J.H., HSUEH W.D., MUSTAFA A. et al. Biofilms in chronic rhinosinusitis: Pathophysiology and therapeutic strategies. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2016; 2 (4): 219-229.
- FOREMAN A., BOASE S., PSALTIS A. et al. Role of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2012; 12: 127-135.
- HENGZHUANG W., WU H., CIOFU O. et al. In vivo pharmacokinetics / pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (5): 2683-2690.
- KAŠLÍKOVÁ K., SLOBODNÍKOVÁ J., MELUŠ V. et al. Mikrobiálne biofilmy: vznik, štruktúra a selekčná výhodnosť. *Zdravotnícke listy.* 2018; 6 (3): 23-28.
- KATZ J.T., SHANNON R.P. Bacteria and coronary atheroma: more fingerprints but no smoking gun. *Circulation.* 2006; 113 (7): 920-922.
- LAM K., OLSON M.E., BURRELL R.E. et al. Development of a porcine model for examining the influence of wound contamination/infection on wound healing. *Wound Rep Reg.* 1999; 7: A305.
- LEWIS K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (4): 999-1007.
- MERMEL L.A., ALLON M., BOUZA E. et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009; 49 (1): 1-45.
- NADELL C.D., XAVIER J.B., FOSTER K.R. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33 (1): 206-224.
- OTT S.J., EL MOKHTARI N.E., MUSFELDT M. et al. Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation.* 2006; 113 (7): 929-937.
- NATALONI M., PERGOLINI M., RESCIGNO G. et al. Prosthetic valve endocarditis. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2010; 11 (12): 869-883.
- OMAR A., BARRY WRIGHT J., SCHULTZ G. et al. Microbial Biofilms and Chronic Wounds. *Microorganisms.* 2017; 5 (1): 9.
- PARSEK M.R., SINGH P.K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57: 677-701.
- PERCIVAL S.L., EMANUEL C., CUTTING K.F. et al. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int. Wound J.* 2012; 9: 14-32.
- PERCIVAL S.L., HILL K.E., MALIC S. et al. Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms. *Wound Repair Regen.* 2011; 19: 1-9.
- RAAD I.I., HANNA H.A. Intravascular catheter-related infections: new horizons and recent advances. *Arch Intern Med.* 2002; 162 (8): 871-878.
- RICKERTS V., KHOT P.D., MYERSON D. et al. Comparison of quantitative real time PCR with Sequencing and ribosomal RNA-FISH for the identification of fungi in formalin fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 202.
- SINGH R., RAY P., DAS A. et al. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance

- of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: An *in vitro* study. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58: 1067-1073.
- TAN M., LAU J., GUGLIELMO B.J. Ethanol locks in the prevention and treatment of catheter-related bloodstream infections. *Ann Pharmacother.* 2014; 48 (5): 607-615.
- THOMSON, C.H. Biofilms: Do they affect wound healing? *Int. Wound J.* 2011; 8: 63-67.
- WRIGHT J.B., OLSON M.E., LAM K. et al. Use of a porcine model to examine the impact of a silver-coated dressing on the rate of wound healing in contaminated full-thickness wounds. *Wound Rep Reg.* 1999; 7: A326.
- WU H., MOSER C., WANG H.Z. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci.* 2015; 7 (1): 1-7.
- YANG L., LIU Y., WU H. et al. Combating biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012; 65 (2): 146-157.
- ZERNOTTI M.E., ANGEL VILLEGAS N., ROQUES REVOL M. Evidence of bacterial biofilms in nasal polyposis. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2010; 20: 380-385