

DŮKAZ TVORBY BIOFILMU U KLINICKY VÝZNAMNÝCH PATOGENŮV EVIDENCE OF BIOFILM FORMATION IN CLINICALLY IMPORTANT PATHOGENS

KAŠLÍKOVÁ Katarína, KRAJČOVIČOVÁ Zdenka, MELUŠ Vladimír

Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

ABSTRAKT

Úvod: Liečba biofilmových infekcií je v súčasnosti náročnou a komplikovanou výzvou pre mikrobiológov a lekárov. Samotná antibiotická liečba je často nedostatočná na prekonanie biofilmových infekcií, preto je dôležité neustále skúmať komplexnú problematiku mikrobiálnych biofilmov.

Ciel': Hlavným cieľom štúdie bolo analyzovať a vyhodnotiť schopnosť tvorby biofilmu u patogénov izolovaných z klinických vzoriek.

Metodika: Testovanie schopnosti tvorby biofilmu u klinických kmeňov bolo realizované Christensenovou metódou s meraním výslednej optickej denzity buniek pri 590 nm. Do štúdie bolo zaradených 44 klinických kmeňov izolovaných zo vzoriek moču, sterov z rán, spúta, dekubitov, výterov z hrdla a pošvy a hemokultúry.

Výsledky: Z celkového počtu 44 klinických kmeňov sme schopnosť tvorby biofilmu zistili u 86,4 % izolátov. V rámci vyhodnotenia podľa bakteriálnych patogénov schopnosť tvorby biofilmu malo: 71,4 % enterokokov, a to všetky na +++, zo stafylokokov produkovalo biofilm 66,6 % kmeňov. Kmene *Proteus* produkovali všetky biofilm, z klebsiel 66,6 % a z *Escherichia coli* 85,7 % kmeňov. U všetkých kmeňov *Pseudomonas aeruginosa* a *Acinetobacter* spp. bola potvrdená 100% tvorba biofilmu. Kmene netvoriace biofilm predstavovali 13,6 % a zahŕňali *Enterococcus faecium* izolovaný z výteru z pošvy a z moču z permanentného katétra, *Staphylococcus aureus* zachytený v aspiráte spúta a v cievkovanom moči, *Klebsiella pneumoniae* v moči a *Escherichia coli* z výteru z pošvy.

Záver: Naše výsledky poukazujú na veľký podiel klinických kmeňov, ktoré vykazujú schopnosť tvoriť biofilm. Môžeme konštatovať, že diagnostika biofilmových infekcií, ich správna a efektívna liečba v súčasnosti dostupnými antibiotikami sa stáva dôležitou a naliehavou.

Kľúčové slová: Biofilm. Klinické kmene. Chronické infekcie. Liečba. Laboratórna diagnostika. Verejné zdravie.

ABSTRACT

Introduction: The treatment of biofilm infections is currently a difficult and complicated challenge for microbiologists and physicians. Antibiotic treatment alone is often insufficient to overcome biofilm infections, therefore it is important to constantly investigate the complex issue of microbial biofilms.

Objective: The main objective of the study was to analyze and evaluate the biofilm formation ability of pathogens isolated from clinical samples.

Methodology: Testing the ability of biofilm formation in clinical strains was carried out by the Christensen method with measurement of the resulting optical density of cells at 590 nm. 44 clinical strains isolated from urine samples, wound swabs, sputum, pressure sores, throat and vaginal swabs and blood cultures were included in the study.

Results: From the total number of 44 clinical strains, we found the ability to form biofilm in 86.4 % of the isolates. As part of

the evaluation according to bacterial pathogens, the following had the ability to form biofilm: 71.4 % of enterococci, all at +++, 66.6 % of staphylococci strains produced biofilm. All *Proteus* strains produced a biofilm, 66.6 % of the strains and 85.7 % of the *Escherichia coli* strains. In all strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. 100 % biofilm formation was confirmed. Non-biofilm-forming strains accounted for 13.6 % and included *Enterococcus faecium* isolated from vaginal swab and urine from indwelling catheter, *Staphylococcus aureus* collected from sputum aspirate and coiled urine, *Klebsiella pneumoniae* from urine, and *Escherichia coli* from vaginal swab.

Conclusion: Our results show a large proportion of clinical strains that show the ability to form biofilm. We can conclude that the diagnosis of biofilm infections, their correct and effective treatment with currently available antibiotics is becoming important and urgent.

Key words: Biofilm. Clinical strains. Chronic infections. Treatment. Laboratory diagnostics. Public Health.

ÚVOD

Tvorba biofilmu je významným mechanizmom virulencie v patogenéze mnohých medicínsky dôležitých bakteriálnych patogénov spôsobujúcich vážne život ohrozujúce infekcie. Baktérie v biofilme môžu pretrvávajúť, a tým spôsobiť chronické a opakujúce sa infekcie a rozvoj antibakteriálnej a imunologickej rezistencie. Na odolnosť biofilmu voči antimikrobiálnym látkam prispieva viacero mechanizmov, ako je nízka penetrácia antimikrobiálnej látky vďaka matickej biofilmu, bariérová funkcia, prítomnosť perzistentných spiacich buniek a malé, vysoko odolné kolónie variantov [1].

Za hlavným problém súvisiaci s biofilmovými infekciami je považovaná zvýšená tolerancia voči antimikrobiálnym látkam, ktorá sťažuje ich liečbu. Zvýšenie mikrobiálnej rezistencie voči antibiotikám ohrozuje verejné zdravie v celosvetovom meradle, znižuje účinnosť liečby, zvyšuje chorobnosť a úmrtnosť a náklady na zdravotnú starostlivosť [2].

Bežné baktérie podieľajúce sa na závažných infekciách spojených s tvorbou biofilmu zahŕňajú patogény skupiny „ESKAPE“ (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), ktoré

spôsobujú infekcie ako sú napr. infekcie kože a mäkkých tkanív rán, bakteriémie, infekcie močových ciest, meningitídy a pneumónie [3].

Skratka „ESKAPE“ je odvodená od schopnosti týchto patogénov „unikat“ z antimikrobiálnej terapie a obranných mechanizmov imunitného systému. Tieto baktérie sú častou príčinou život ohrozujúcich nozokomiálnych infekcií, najmä u pacientov s cystickou fibrózou, kriticky chorých a imunokompromitovaných jedincov [4, 5].

Tvorba biofilmu je vážnou hrozbou pre verejnú zdravie akejkoľvek populácie, v ktorej sa vyskytne, pretože je príkladom evolučne osvedčeného a úspešného obranného mechanizmu mnohých baktérií. Preto existuje potreba vyvinúť nové, účinné a špecifické antimikrobiálne látky, ktoré možno využiť na zníženie patogenity súvisiacej so vznikom biofilmov nielen v nemocniciach [6].

CIEĽ

Cieľom štúdie bola laboratórne stanovenie, analýza a vyhodnotenie schopnosti tvorby biofilmu u patogénov izolovaných z klinických vzoriek.

METODIKA

Klinické izoláty testované v štúdiu pochádzali z biologických vzoriek pacientov, ktoré boli zaslané na diagnostiku v rámci spádovej oblasti súkromného laboratória mikrobiológie v časovom období r. 2019, kde boli identifikované v súlade so štandardnými pracovnými postupmi laboratória. Testovanie produkcie biofilmov bolo realizované v mikrobiologickom laboratóriu Fakulty zdravotníctva Trenčianskej univerzity Alexandra Dubčeka v Trenčíne. Na stanovenie produkcie biofilmov sme využili štandardnú Christensenu metódu v mikrotitračných platničkách, ktorej princíp spočíval v adherencii baktérií na steny mikrotitračnej platničky, premývaní PBS (z angl. Phosphate-buffered saline), fixovaní, farbení a nakoniec v samotnom meraní optickej denzity buniek pri vlnovej dĺžke 590 nm. Každý kmeň bol testovaný v troch paralelných repitíciách, pričom bola vypočítaná priemerná hodnota absorbancie, ktorej porovnaním s absorbanciou negatívnej kontrolnej vzorky bol získaný výsledok miery schopnosti tvorby biofilmu.

Schopnosť tvorby biofilmu (adherencie buniek) za definovaných podmienok laboratória bola vyhodnotená na základe číselných hodnôt absorbancie negatívnej inkubačnej kontroly dané celkovým súč-

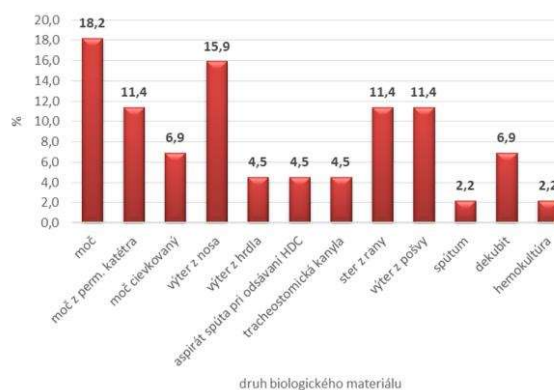
tom aritmetického priemeru a trojnásobku smerodajnej odchýlky (ODC), ktoré slúžili ako kontrolné hodnoty pre zaradenie kmeňov do 4 kategórií podľa miery schopnosti tvorby biofilmu:

- negat → absorbancia vzoriek < ODC;
- + → absorbancia vzoriek > ODC, avšak menšia ako 2xODC;
- ++ → absorbancia vzoriek >2x ODC, avšak menšia ako 4xODC;
- +++ → absorbancia vzoriek > 4x ODC [7].

Schopnosť tvorby biofilmu (adherencie buniek) za definovaných podmienok laboratória sme vyhodnocovali ako negatívnu (kmeň netvoril biofilm) a pozitívnu (kmeň tvoril biofilm). Mieru pozitivity sme stanovili na základe výpočtov miery optickej denzity na tri stupne – kmeň slabo tvoriaci biofilm (+), kmeň stredne tvoriaci biofilm (++) a kmeň silno tvoriaci biofilm (+++).

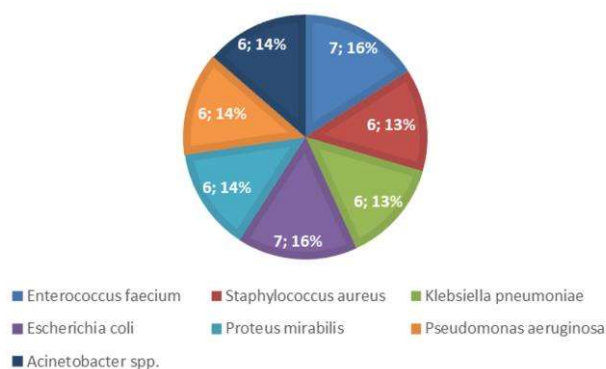
VÝSLEDKY

Do testovania bolo zaradených 44 klinických kmeňov. Z grafu 1 je zrejme, že až 36,5 % vzoriek pochádzalo z moču (z toho – spontánny moč 18,2 % (n = 8), cievkovaný moč 6,9 % (n = 3), moč z permanentného katétra 11,4 % (n = 5), významná hodnota bola zaznamenaná aj u výterov z nosa (15,9 %).



Graf 1 Vyšetrované druhy klinických vzoriek (n = 44)

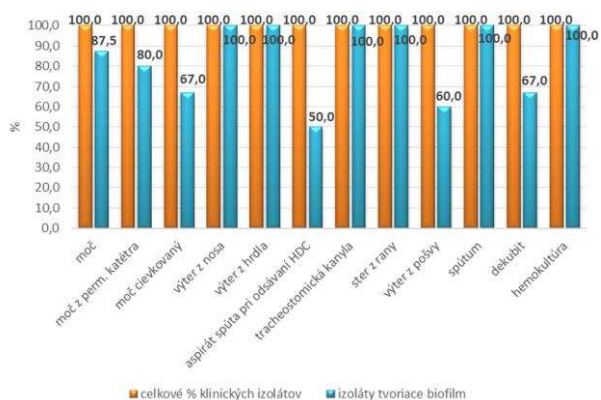
V grafe 2 uvádzame prehľad patogénov diagnostikovaných v nami analyzovaných klinických vzorkách: *Enterococcus faecium* 16,0 % (n = 7), *Staphylococcus aureus* 13,6 % (n = 6), *Klebsiella pneumoniae* 13,6 % (n = 6), *Escherichia coli* 16,0 % (n = 7), *Proteus mirabilis* 13,6 % (n = 6), *Pseudomonas aeruginosa* 13,6 % (n = 6) a *Acinetobacter* spp. 13,6 % (n = 6).



Graf 2 Zastúpenie klinických izolátov (N=44)

Klinických kmeňov podrobených testovaniu na schopnosť tvorby biofilmu bolo 44. Tvorba biofilmu bola zaznamenaná u 86,4 % kmeňov (n = 38). Najvyššia schopnosť tvorby biofilmu bola zaznamenaná pri +++, ktorú tvorilo 36,8% kmeňov (n=14) a to *Enterococcus faecium* (n=5), *Staphylococcus aureus* (n = 1), *Klebsiella pneumoniae* (n = 1), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 3) a *Acinetobacter* spp. (n = 4). Schopnosť tvoriť biofilm zo 7 testovaných kmeňov enterokokov malo 71,4 % a to všetky na +++. Zo 6 kmeňov *Staphylococcus aureus* produkovalo biofilm 66,6 % kmeňov. Z čeľade *Enterobacteriaceae* mali zastúpenie *Klebsiella pneumoniae* (n = 6), *Escherichia coli* (n = 7) a *Proteus mirabilis* (n = 6). Kmene *Proteus* produkovali všetky biofilm, z klebsiel 66,6 % a z *Escherichia coli* 85,7 % kmeňov. U všetkých kmeňov *Pseudomonas aeruginosa* aj *Acinetobacter* spp. bola potvrdená 100% tvorba biofilmu. Z celkového počtu 44 kmeňov netvorilo biofilm 13,6 % (n = 6) kmeňov a to *Enterococcus faecium* izolovaný z výteru z pošvy a z moču z permanentného katétra, *Staphylococcus aureus* zachytený v aspiráte spúta pri odsávaní HDC a v cievkovanom moči, *Klebsiella pneumoniae* v moči a *Escherichia coli* z výteru z pošvy (tab. 1).

V grafe 3 uvádzame schopnosť tvorby biofilmu u klinických kmeňov podľa miesta odberu. Najviac klinických vzoriek bolo zo spontánne odobratého moču (n = 8), z ktorých 87,5 % tvorilo biofilm. Z ostatných klinických vzoriek bol odobratý nižší počet vzoriek, avšak u konkrétnych druhov so 100 % tvorbou biofilmu – výtery z nosa a z hrdla, tracheostomické kanyly, stery z rán, vzorka spúta a z hemokultúry.



Graf 3 Celkový počet klinických izolátov a izolátov tvoriacich biofilm (n = 44)

Tabuľka 1 Vyhodnotenie tvorby biofilmu u klinických kmeňov

identifikovaný kmeň	počet vzoriek N/n	tvorba biofilmu		
		miera pozit.	abs.	%
Gram-pozitívne koky	13	negat.	4	30,7
		+	1	7,7
		++	2	15,4
		+++	6	46,2
<i>Enterococcus faecium</i>	7	negat.	2	28,6
		+++	5	71,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	negat.	2	33,3
		+	1	16,7
		++	2	33,3
		+++	1	16,7
Gram-negatívne tyčinky	31	negat.	2	6,5
		+	12	38,7
		++	9	29,0
		+++	8	25,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	negat.	1	16,7
		+	2	33,3
		++	2	33,3
		+++	1	16,7
<i>Escherichia coli</i>	7	negat.	1	14,3
		+	6	85,7
<i>Proteus mirabilis</i>	6	+	3	50,0
		++	3	50,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	++	3	50,0
		+++	3	50,0
<i>Acinetobacter</i> spp.	6	+	1	16,7
		++	1	16,7
		+++	4	66,6
SPOLU	44	negat.	6	13,6
		+	13	29,5
		++	11	25,0
		+++	14	31,9

DISKUSIA

Vzhľadom na spojitosť tvorby biofilmu s opakujúcimi sa chronickými infekciami u ľudí sa štúdiu biofilmu v posledných desaťročiach venovala značná pozornosť. Biofilm je definovaný ako súbor mikrobiálnych buniek, ktorý je asociovaný s povrchom a uzavretý v extracelulárnej matrici, zloženej hlavne z polysacharidového materiálu. Mikroorganizmy integrované v biofilme sa zásadne odlišujú od populácií suspendovaných buniek. Baktérie v biofilme vykazujú zvýšenú rezistenciu na antibiotiká, dezinfekčné prostriedky, ako aj na mechanizmy imunitného systému hostiteľa. Význam biofilmu je dobre známy v environmentálnom a medicínskom kontexte, kde je nepochybne považovaný za kritický terapeutický problém súčasnej medicíny.

Na detekciu biofilmov sa používajú rôzne metódy ako napríklad tkanivová kultivačná metóda, metóda Tube, metóda kultivácia na Congo Red Agar, Makiho rolovacia metóda, metóda sonikácie a vortexovania, bioluminiscenčný test, piezoelektrické senzory a fluorescenčné mikroskopické vyšetrenie. V našej štúdii sme tvorbu biofilmu u klinických kmeňov stanovovali kvantitatívnu metódou podľa Christensen et al. [8, 9] v mikrotitračných platničkách, ktorá je považovaná za zlatý štandard medzi metódami detekcie biofilmov.

Hlavným cieľom štúdie bolo analyzovať schopnosť tvorby biofilmu u klinických kmeňov, pričom najvyššia schopnosť tvorby biofilmu (klasifikácia „+++“) bola zaznamenaná u 14 kmeňov (36,8 %) a to: *Enterococcus faecium* ($n = 5$), *Staphylococcus aureus* ($n = 1$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 1$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 3$) a *Acinetobacter* spp. ($n = 4$). Nižšia miera adhérencie buniek („++“) bola zistená u 11 kmeňov (29,0 %) a najnižšia miera adhérencie bola stanovená u vzoriek 13 kmeňov (34,2 %).

Treba však zdôrazniť, že v zmysle použitej Christensenovej metódy nebola miera tvorby biofilmu u kmeňov jednotná, pretože hodnotené mikroorganizmy sú podľa nej zatriedené do jednotlivých kategórií miery adhérencie, ktoré boli stanovené na základe intervalov daných ODC. Na rozdiel od primárneho postupu, publikovaného po prvýkrát v roku 1985 sme použili mierne vyššiu vlnovú dĺžku pri stanovení absorbancie vzoriek (590 nm). Tento rozdiel však nepovažujeme za zásadnú nezhodu s pôvodným postupom vzhľadom k faktu, že aj autori vedeckých štúdií, ktoré z uvedeného postupu

metodologicky vychádzali, nepoužívali jednotnú vlnovú dĺžku. Použitá vlnová dĺžka v uvedených štúdiách sa pohybuje v intervale 570 – 620 nm [10]. V našom prípade nebola voľba vlnovej dĺžky 600 nm svojvoľná, ale vychádzala z technických možností prístroja, ktorý sme mali k dispozícii. Ďalším špecifikom našich výsledkov bolo, že vzorky jednotlivých kmeňov boli stanovené jednorazovo v triplikátoch a nie opakovane v kvadruplikátoch, ako je tomu v prípade pôvodného postupu, čo sme následne zohľadnili aj pri výpočte výslednej miery adhérencie buniek jednotlivých kmeňov.

Infekcie močových ciest spojené s katétrom sú najčastejšou nozokomiálnou infekciou, ktorá súvisí s tvorbou mikrobiálneho biofilmu v močovom katétri. Parsek et al. [11] 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. Veľké množstvo infekcií močových ciest a krvného riečiska má priamy súvis s implantovanými zdravotníckymi pomôckami, na ktorých sa môže vytvoriť biofilm [12].

Tento jav je obzvlášť častý a typický pre *Proteus mirabilis* a súvisí s klinickými komplikáciami spôsobenými kryštalizovaným typom biofilmu. Stickler et al. [13] sa vo svojej štúdii venovali schopnosti tvorby biofilmu *in vitro* u kmeňov *Proteus mirabilis* izolovaných z moču katetrizovaných pacientov ako aj z fyziologicky získaného moču. Z 20-tich vzoriek moču bol v 15 potvrdený *Proteus mirabilis*. Katétre, z ktorých sa izolovali kmene *Proteus mirabilis* vykazovali inkrustáciu a blokovanie prietoku moču. Aj iní autori hodnotili *in vitro* tvorbu biofilmu kmeňmi *Proteus mirabilis* izolovanými z moču katetrizovaných pacientov. U všetkých z nich bol pozorovaný biofilm tvorený *Proteus mirabilis* a sprevádzaný inkrustáciou a obštrukciou katétru [13-15].

Naše výsledky testovania tvorby biofilmu u kmeňov *Proteus mirabilis*, ktoré sme izolovali zo vzoriek moču, výteru z nosa, dekubitu, steru z rany a zo spúta, sú v súlade s výsledkami predchádzajúcich publikovaných údajov. Všetky nami testované kmene uvedeného druhu produkovali biofilm [13-15].

Vyššie uvedená závažnosť problematiky viedla k tomu, že vzorky moču mali aj v našej štúdii najvyššie zastúpenie s celkovým počtom $n = 16$ vzoriek, z toho spontánne získaný moč ($n = 8$), moč

z permanentného katétra (n = 5) a cievkovaný moč (n = 3). Okrem izolátov kmeňov *Proteus* (n = 2) sme v nich izolovali *Enterococcus faecium* (n = 4), *Klebsiella pneumoniae* (n = 5), *Escherichia coli* (n = 3), *Staphylococcus aureus* (n = 1) a *Pseudomonas aeruginosa* (n = 1).

Kmene *Escherichia coli* sme izolovali vo vzorke spontánneho moču, cievkovaného moču ako aj z moču z permanentného katétra. Všetky tri izolované kmene tvorili biofilm. V štyroch vzorkách spontánneho moču a v jednej vzorke moču získaného cievkovaním pacienta sme zachytili *Klebsiella pneumoniae*. Okrem jedného kmeňa v spontánnom moči všetky tvorili biofilm. *Staphylococcus aureus* z cievkovaného moču netvoril biofilm. *Enterococcus faecium* tvoril biofilm vo vzorke spontánneho moču a v dvoch vzorkách z troch v moči z permanentného katétra. Biofilm pozitívny kmeň *Pseudomonas aeruginosa* sme mali taktiež v moči z permanentného katétra. Na záver môžeme konštatovať, že z celkového počtu uropatogénnych kmeňov (n = 16) tvorilo biofilm až 81,3 %, z toho bolo 37,5 % kmeňov tvoriacich biofilm od katetrizovaných pacientov a 43,8 % kmeňov bolo izolovaných zo spontánneho moču.

Porovnateľné výsledky uvádzajú vo svojej štúdií autori Abdallah et al. [16], ktorí testovali uropatogénne kmene *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus* a koaguláza-negatívne stafylokoky izolované z moču katetrizovaných pacientov, ktoré vykazovali schopnosť tvoriť biofilm v 43,3 %, zatiaľ čo u ne-katetrizovaných pacientov boli v moči izolované kmene napr. *Enterococcus* spp. a *Pseudomonas* spp., z ktorých tvorilo biofilm 30 % kmeňov. Podobné výsledky tvorby biofilmu u kmeňov *Escherichia coli* (48 %) izolovaných od katetri-zovaných pacientov a zo vzoriek moču tiež získali Watts et al. [17]. V dostupných štúdiách sa nezistili žiadne štatisticky významné rozdiely v získaných výsledkoch u pacientov s katétrom [16, 17].

Podľa National Institutes of Health sú biofilmové infekcie z lekárskeho hľadiska dôležité a predstavujú viac ako 80 % mikrobiálnych infekcií v tele. Baktérie v zrelom biofilme môžu tolerovať antibiotiká v koncentráciách 10 – 1000-krát vyšších, ako sú potrebné na usmrtenie planktonických baktérií [18]. Základ pre biofilmovú špecifickú antibiotickú rezistenciu a toleranciu je multifaktoriálny, pričom mechanizmy rezistencie a tolerancie sa líšia v závislosti od konkrétnej antimikrobiálnej látky,

bakteriálneho kmeňa a druhu, veku a vývojového štádia biofilmu [19].

ZÁVER

Biofilmy sú významné pre svoju schopnosť vykazovať rezistenciu voči antibiotikám a antimykotikám prostredníctvom svojej komplexnej štruktúry mikrobiálnych kolónií, ktorá zvyšuje medzidruhovú a vnútrodruhovú výmenu génov antimikrobiálnej rezistencie (AMR), zabezpečuje ochranu pred antimikrobiálnou penetráciou a zvyšuje perzistenciu. V súčasnosti lekári empiricky liečia infekcie sprostredkované biofilmom predĺženými vysokými dávkami kombinácie antibiotík, čo môže viesť k ďalšiemu nárastu AMR. Aj keď bolo publikovaných niekoľko štúdií o biofilmoch a antimikrobiálnej rezistencii, stále existuje nedostatok informácií týkajúcich sa významnej asociácie týchto faktorov a ich príspevku k zvýšeniu záťažnosti AMR [20].

Antibiotická liečba je v súčasnosti najdôležitejším a najúčinnjším opatrením na kontrolu mikrobiálnych infekcií, avšak je takmer nemožná na eradikáciu biofilmových infekcií. Vzhľadom na dôsledky a prevalenciu nozokomiálnych infekcií sprostredkovaných biofilmom je dôležité presadzovať pokrok a aplikáciu nových liečebných postupov.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] JAMAL T.Y., ALY M.M., JASTANIAH S. Bacterial Biofilm Formation by Clinical Isolates and their Clinical Impacts in Chronic Infections. *J Res Med Dent Sci.* 2022; 10 (6): 219-228.
- [2] McGRATH E.J., ASMAR B.I. Nosocomial Infections and Multidrug-Resistant Bacterial Organisms in the Pediatric Intensive Care Unit. *Indian J Pediatr.* 2011; 78: 176–184.
- [3] VALE DE MACEDO G.H.R., COSTA G.D.E., OLIVEIRA E.R. et al. Interplay between ES-KAPE Pathogens and immunity in skin infections: An overview of the major determinants of virulence and antibiotic resistance. *Pathogens.* 2021; 10: 148.
- [4] MANCUSO G., MIDIRI A., GERACE E., BIONDO C. Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. *Pathogens.* 2021; 10: 1310.
- [5] SIONOV R.V., STEINBERG D. Targeting the Holy Triangle of Quorum Sensing, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance in Pathogenic Bacteria. *Microorganisms.* 2022; 10(6): 1239.
- [6] KAŠLÍKOVÁ K., MELUŠ V., KRAJČOVI-

- ČOVÁ Z., GRABCZAK P. Sledovanie tvorby biofilmu u bakteriálnych kmeňov izolovaných z prostredia nemocníc. *Zdravotnícke listy*. 2022; 10 (2): 93-99.
- [7] CHRISTENSEN G. D., SIMPSON W. A., ANGLE J. O. et al. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Methods for evaluating attached bacteria and biofilms: an overview. 1st Edition. Humana Press, Totowa, N.J. An, Yuehuei H., Friedman, Richard J. 2000; p. 213-234. ISBN 978-1-59259-224-1.
- [8] CHRISTENSEN G. D., SIMPSON W. A., YOUNGER J. A. et al. Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 1995; 22 (6): 996-1006.
- [9] KOREŇOVÁ J., LOPAŠOVSKÁ J., KUČHTA T. Comparison of three microtitre plate-based methods for quantification of biofilm formation ability of bacteria contaminating food technologies. *J Food Nutr Res*. 2008; (47):100-104.
- [10] STEPANOVIC S., VUKOVIC D., HOLA V. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *APMIS*. 2007; 115: 891-899.
- [11] PARSEK M.R., SINGH P.K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*. 2003; (57): 677-701.
- [12] KAŠLÍKOVÁ K., MELUŠ V., KRAJČOVIČOVÁ Z. et al. Tvorba biofilmu ako dôležitý klinický problém. *Zdravotnícke listy*. 2019; 7 (2): 42-47.
- [13] STICKLER D. J., JONES S.M., ADUSEI G. O. et al. A clinical assessment of the performance of a sensor to detect crystalline biofilm formation on indwelling bladder catheters. *BJU Int*. 2006; 98b(6): 1244-1249.
- [14] ALI O.A.U. Prevention of *Proteus mirabilis* Biofilm by Surfactant Solution. *Egypt Acad J of Biol Sci*. 2012; 4 (1): 1-8.
- [15] BALASUBRAMANIAN A., CHAIRMAN K., RANJIT SINGH A.J.A. et al. Isolation and identification of microbes from biofilm of urinary catheters and antimicrobial susceptibility evaluation. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012; 2 (3): S1780-S1783.
- [16] ABDALLAH N.M.A., ELSAYED S.B., YASSIN M.M. et al. Biofilm forming bacteria isolated from urinary tract infection relation to catheterization and susceptibility to antibiotics. *Int J Biotechnol Mol Biol Res*. 2011; 2 (10): 172-178.
- [17] WATTS R.E., HANCOCK V., ONG C-L.Y. et al. *Escherichia coli* isolates causing asymptomatic bacteriuria in catheterized and noncatheterized individuals possess similar virulence properties. *J Clin Microbiol*. 2010; 48 (7): 2449-2458.
- [18] MOHAMED J.A., HUANG D.B. Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*. 2007; 56 (12): 1581-1588.
- [19] HALL C.W., MAH, T.F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017; 41 (3): 276-301.
- [20] DEVANGA RAGUPATHI N.K., VEERARAGHAVAN B., KARUNAKARAN E. et al. Biofilm-mediated nosocomial infections and its association with antimicrobial resistance: Detection, prevention, and management. *Front Med*. 2022; 9: 987011.