

## MEHANIZMI POVEĆANE OTPORNOSTI BAKTERIJA U BIOFILMU NA ANTIBIOTIKE

Dubravka Milanov<sup>\*1</sup>, Nataša Čubrak<sup>2</sup>, Jelena Petrović<sup>1</sup>, Sava Lazić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad

<sup>2</sup>Veterinarska stanica “Av lave”, Kruševac

### Kratak sadržaj

Jedna od glavnih prednosti života bakterija u biofilmu je povećana otpornost na biocide, uključujući i antibiotike i dezinficijense. Dok su biocidi 100% efikasni u destrukciji suspendovanih ćelija, oni nisu efektivni u uništavanju bakterijskih ćelija u biofilmu. Mehanizmi povećane rezistencije bakterija u biofilmu na antibiotike nisu razjašnjeni u potpunosti. Neki od sledećih faktora, sami ili u kombinaciji, razmatraju se kao odgovorni: smanjen prodor antibiotika u biofilm; smanjena brzina (vrednost) rasta bakterija u biofilmu; ekspresija mogućih gena rezistencije i povećana vrednost genetskog transfera. Standardni dilucionni test za određivanje minimalne baktericidne i minimalne inhibitorne koncentracije, nije aplikativan za biofilm rastuće bakterije. U novije vreme razvijene su različite aparature za određivanje minimalne biofilm eradikacione koncentracije (MBEC – *Minimal Biofilm Eradication Concentration*). Određivanje MBEC ima za cilj izbor efikasnih antibiotika za lečenje, identifikaciju meta u biofilmu za nove antibiotike i praćenje mogućeg budućeg razvoja rezistencije biofilma na antibiotike.

**Ključne reči:** biofilm, antibiotici, rezistencija.

## MECHANISMS OF INCREASED RESISTANCE OF BACTERIA TO ANTIMICROBIALS IN BIOFILM

Dubravka Milanov, Nataša Čubrak, Jelena Petrović, Sava Lazić

### Abstract

The most striking advantage of bacteria residing in biofilm is enhanced resistance to biocide including antibiotics and disinfectants. Biocides

<sup>\*</sup> E mail: dubravka@niv.ns.ac.rs

are 100% efficient in killing cells in suspension but there are not efficient in destroying bacteria from biofilm community. Mechanisms of increased resistance of bacteria in biofilm to antibiotics is not understood. Some factors alone or in combination are considered to be responsible such as restricted penetration of antibiotics into a biofilm, slow growth rate of biofilm cells, possible expression of certain resistance genes, increased rate of genetic transfer. The standard test for estimating the minimum bactericidal and minimum inhibitory concentration is not applicable for bacteria grown in biofilm. Nowadays, the apparatus for determination of Minimal Biofilm Eradication Concentration (MBEC) has been developed. Determining MBEC helps to select appropriate antibiotics for patient treatment, to identify new antimicrobials targeting biofilm and to track the possible future development of antibiotic resistance against biofilm drugs.

**Key words:** biofilm, antibiotics, resistance

Biofilm je strukturno i dinamički kompleksan biološki sistem koji prokariotski organizmi formiraju u prirodnom okruženju. U odnosu na planktonske ili slobodno suspendovane dvojnike, bakterije u biofilmu stiču niz prednosti. U biofilmovima su dostupne hranljive materije, a time se smanjuje potreba za pokretljivošću, štedi energija i produžava život bakterijama. Ekstracelularna polimerična supstancija (matriks, glikokaliks) usidrava za površinu vezane bakterije i kao trodimenzionalno polje okružuje bakterijske ćelije, sprečava isušivanje i obezbeđuje zaštitu stanovnika biofilma od pretnji kao što su biocidi, antibiotici, antitela, deterdženti, bakteriofagi ili predatori kao što su slobodno-živeće amebe i bela krvna zrnca. Kao integralni deo života prokariota, biofilm predstavlja i strategiju preživljavanja bakterija u organizmu ljudi i životinja. Sa stanovišta humane i veterinarske medicine, najvažnija prednost života u biofilmu je povećana otpornost bakterija na biocide, uključujući i antibiotike i dezinficijense. Bakterije u biofilmu pokazuju za 10-1000 puta veću rezistenciju na efekat antibiotika. Na primer, koncentracija vankomicina od 1 µg/ml je MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) za ćelije *S. aureus* u suspenziji, ali isti soj u biofilmu uspešno preživljava tretman sa 20 µg/ml vankomicina (Williams i sar., 1997). Ili, tretman biofilma *P. aeruginosa* sa imipenemom je bez efekta (MIC > 1024 µg/ml) dok su ćelije ove bakterije u tečnoj kulturi visoko osetljive na koncentraciju ovog leka od 1 µg/ml (Ceri i sar. 1999). Dok pencilin G, cloxacillin, ceftiofur i tetraciklin, baktericidno deluju u koncentraciji od 2 mg/mL na suspenziju *Arcanobacterium pyogenes*, minimalna biofilm eradikaciona koncentracija (MBEC) je viša od 1024 mg/mL (Olson i sar.,

2002). Pored toga, bakterije u biofilmu odlikuje izvanredna otpornost na komponente imunološkog sistema organizma domaćina, otpornost na baktericidni efekat dezinfekcionih sredstava i jona metala kao što su bakar i srebro (Mah i O'Toole, 2001; Donlan i Costerton, 2002).

Rezistencija se definiše kao sposobnost jednog mikroorganizma da raste u prisustvu povećanih koncentracija antimikrobnih sredstava. Prema ovom konvencionalnom kriterijumu, bakterijske ćelije u biofilmu ne pokazuju bezuslovno rezistenciju, tj. ne rastu bolje u odnosu na planktonske u prisustvu širokog spektra antimikrobnih sredstava. Većina eksperimenata o osetljivosti biofilma ispituje više efekat ubijanja, nego inhibiciju rasta. Tako saopštavana rezistencija u suštini opisuje jednu povećanu otpornost bakterija u biofilmu prema ubijanju ili povećanu sposobnost preživljavanja (Dunne, 2002). U radovima i revijama na temu rezistencije bakterijskih biofilмова moguće je naći listu faktora koji se razmatraju kao odgovorni (Costerton i sar., 1999; Lewis, 2001; Mah i O'Toole, 2001; Maira-Litran i sar., 2000). Oni uključuju smanjen prodor antimikrobnih sredstava u biofilm, smanjenu brzinu (vrednost) rasta bakterija u biofilmu, ekspresiju mogućih gena rezistencije i povećane vrednosti genetskog transfera. Sami ili u kombinaciji, ovi faktori su korisni u objašnjenju preživljavanja biofilma u jednom broju slučajeva.

**Smanjen prodor antimikrobnih agenasa u biofilm:** Ekstracelularna polimerična supstancija (matriks, glikokaliks) koja okružuje ćelije bakterija u biofilmu, redukuje prodor antibiotika i dezinficijensa do bakterija, fizički usporavajući njihovu difuziju ili stupajući u hemijsku reakciju sa njima. Matriks tako deluje u različitom stepenu kao difuziona barijera, molekularno sito ili adsorbent i veoma je efikasan u zaštiti biofilm ćelija od krupnih molekula kao što su komponente komplementa, lizocima ili ćelija kao što su leukociti. Međutim, za male molekule antimikrobnih sredstava, barijera biofilm matriksa može pre da odloži bakterijsku smrt, nego efikasno da je prevenira (Dunne, 2002). Usporena difuzija je korisna u sprezi sa drugim mehanizmima destrukcije antibiotika koji smanjuju njihovu koncentraciju u dubljim slojevima biofilma. Tako je matriks biofilma kao elektro-negativan veoma efektivan u zaštiti od pozitivno punjenih aminoglikozida, verovatno putem vezivanja. Takođe, usporena difuzija u kombinaciji sa degradacijom putem enzima, kao što su katalaza i  $\beta$ -lactamase, pruža efikasnu zaštitu biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* (Lewis, 2001). Konfokalnom skeniranjem laser mikroskopijom je dokazano da antibiotici mogu prodrati kroz matriks biofilma, ali teško dospevaju u prostor biofilm ćelija, zato što su one zbijene u grupe i mikrokolonije (Trachoo, 2003). Praktično, letalnim koncentracijama antibiotika izložene su samo bakterije u površinskim slojevima biofilma. Takođe je moguće da u dubljim slojevima biofilma deluju isti faktori koji nepovoljno utiču i na antimikrobnu aktivnost

in vitro. To se odnosi na pH vrednost, koncentraciju CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, dvovalentnih katjona, pirimidina i vode. U odnosu na slabiji prodor antibiotika, deficit kiseonika i slaba metabolička aktivnost bakterija u dubljim slojevima biofilma, u većoj meri utiču na toleranciju *P. aeruginosa* u biofilmu na ciprofloksacin i tobramicin (Walters i sar., 2003).

**Smanjena vrednost rasta:** Bakterije u biofilmu sporo rastu, slično suspendovanim bakterijama u stacionarnoj fazi. Prosečna stopa rasta *Klebsiella pneumoniae* u biofilmu je 0.032 h<sup>-1</sup>, a u planktonskoj populaciji 0.59 h<sup>-1</sup> (Anderl i sar., 2003). Spor rast nesumnjivo doprinosi rezistenciji biofilma, kao što je spor rast planktonskih ćelija bakterija glavni faktor povećane otpornosti u stacionarnoj fazi rasta (Costerton, 1999). Visoka koncentracija ćelija u biofilmu indukuje proizvodnju rpoS proteina ili alternativno s-faktora, koji se uobičajeno javlja samo u stacionarnoj fazi rasta ćelija različitih mikroorganizama i koji kodira *rpoS* gen (Trachoo, 2003). To znači da smanjena vrednost rasta bakterija u biofilmu nije posledica oskudice u hranljivim materijama, već je to genetski regulisan proces i mehanizam adaptacije na život u biofilmu. Značaj usporenog rasta za fiziologiju biofilma dokazan je u studijama McLean i sar. (1997). Kod *Escherichia coli*, gubitak rpoS ima minimalni efekat na planktonsku populaciju, ali se biofilm populacija redukuje za 50-60% i oštećuje se struktura biofilma. Spor rast redukuje metaboličku aktivnost a time i osetljivost na antibiotike. U suštini, sva antimikrobna sredstva su efektivnija u ubijanju brzorastućih bakterija, a neki antibiotici (penicilin i ampicilin) imaju apsolutni zahtev da bakterija raste da bi mogli da je ubiju. Neki od naprednijih β-laktama, cefalosporina, aminoglikozida i fluorokvinolona mogu ubiti i nerastuće bakterije, ali su i oni efektivniji u ubijanju brzo-delećih bakterijskih ćelija.

**Ekspresija za biofilm-specifičnih gena rezistencije:** U suštini, ćelije bakterija u biofilmu nisu otpornije na inhibiciju rasta dejstvom antibiotika, tako da ne postoji realna potreba za dokazivanjem nekog specijalnog mehanizma rezistencije na lekove koji deluje samo u biofilmu (Lewis, 2001). *Multidrug resistance pumps* (MDR) igraju jednu ulogu u rezistenciji biofilma kod niskih koncentracija antibiotika i postoji razlog da se veruje da nepoznate MDR pumpe mogu da budu ispoljene u biofilmovima *P. aeruginosa* (Brooun i sar., 2000). Genetska ispitivanja ukazuju da je više gena ekspresionirano u biofilmu u odnosu na planktonsku populaciju i da ti *up*-regulisani geni uključuju *open reading frames* nepoznate funkcije (Pace i sar. 2006).

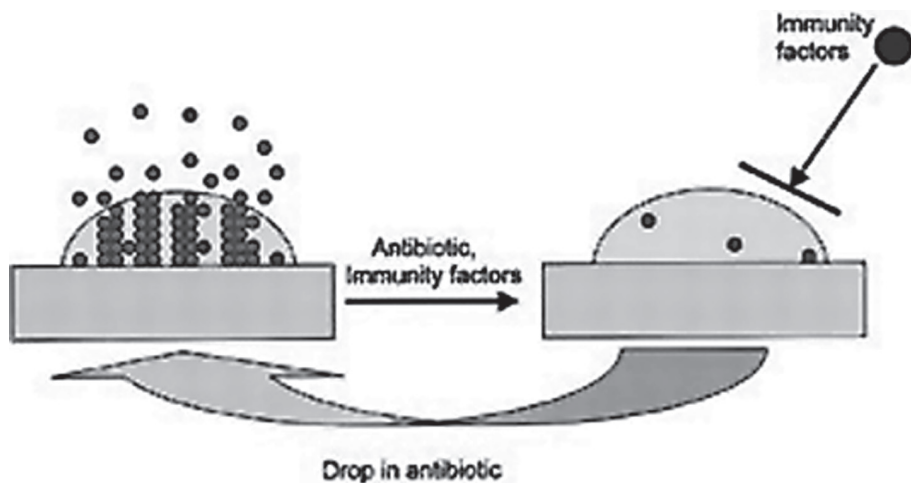
**Povećane vrednosti genetskog transfera:** Bakterije mogu steći rezistenciju na antibiotike mutacijama na nivou hromozoma ili horizontalnim transferom ekstrahromozomskih gena (plazmidi, transpozoni, integroni). Važna prednost života u biofilmu je ubrzana vrednost konjugacije koja je olakšana fizičkom blizinom ćelija (Hausner i Wuertz, 1999). Biofilm je perfektan milje za hori-

zontalni transfer genetskog materijala (transdukcija, transfekcija i konjugacija). Rezistencija na tetraciklin kodirana sa Tn916-like *elements* se brzo prenosi sa tetraciklin rezistentnih *Streptococcus* spp. na druge vrste *Streptococcus* spp. unutar modela oralnog biofilma (Roberts i sar., 2001).

Napred navedeni faktori ne objašnjavaju rezistenciju biofilмова na jednu važnu grupu antibiotika: fluorokvinolone. Dokazano je da fluorokvinoloni lako difunduju kroz matriks i veoma su efektivni u zaustavljanju rasta biofilma (Anderl i sar., 2000). Istraživanje efekta fluorokvinolona (ofloksacina i ciprofloksacina) na biofilm *P. aeruginosa* u zavisnosti od doze, pokazuje da se većina bakterija efikasno eliminiše primenom uobičajenih kliničkih koncentracija leka (Brooun, 2000). Međutim, posle početnog pada za 3-4 log, dalje povećanje koncentracije antibiotika nema cidni efekat. Povećanje koncentracije imipenema ili ciprofloksacina izaziva početno smanjenje broja ćelija *Escherichia coli*, ali preostala populacija je neosetljiva na dalje povećanje koncentracije. Slično je zapaženo u efektu amoksisilina na *Lactobacillus acidophilus* ili eritromicina i metronidazola na *Gardnerella vaginalis* (Lewis, 2001). Ovi eksperimenti pokazuju da je jedna mala populacija perzistera ultimativno odgovorna za visok nivo rezistencije biofilma. Bakterije koje prežive, održavaju se prisustvom antibiotika koji inhibira njihov rast, tj. paradoksalno, antibiotik pomaže perzistentnim bakterijama da istraju.

Perzisteri se smatraju specijalizovanim ćelijama odgovornim za toleranciju biofilma na antimikrobne agense i moguće je da biofilmovi omogućavaju više bakterija perzistera od planktonske populacije. Poznato je da planktonska populacija bakterija u ranoj fazi rasta ne sadrži perzistere i da se njihov broj povećava kako populacija ulazi u stacionarnu fazu rasta. Formiranje perzistera dakle zavisi od faze rasta, a jedan formiran, zreo biofilm, je gusto naseljena zona u kojoj je teško zamisliti bakterijsku deobu. U takvim uslovima prostorne prinude, nulta populacija rasta razmatra se kao norma (Watnik i Kolter 2000). Iako se ove bakterije ne dele, one su vijabilne i mogu se uspešno kultivisati kada se oslobode biofilm okruženja (matriksa). Interesantno, kada se oslobode iz biofilma, ove bakterijske ćelije deobom opet produkuju populaciju bakterija osetljivu na antibiotike, iz čega je jasno da perzisteri nisu ćelije sa mutacijom gena. Međutim, ove činjenice nisu od glavnog značaja za preživljavanje ćelija u biofilmu in vivo. Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) leka je ona koncentracija koja rezultira smanjenjem broja živih bakterija 99,9% preko noći u okolnostima rasta i praktično je rezonovanje da je ubijanje većine patogena isto tako dobro kao i ubijanje svih. Preostale perzistere treba da eliminiše imunološki sistem. Perzistirajuće bakterije će postati problem in vivo samo u slučajevima kada imunološki sistem nije operativan. Perzisteri su u biofilmu potpuno zaštićeni fizičkom barijerom matriksa od efektoru imunološkog siste-

ma organizma domaćina, tj. ekstracelularna polimerična supstanca štiti bakterije u biofilmu od opsonizacije i fagocitoze (Costerton i sar., 1999). Kada se prekine terapija, perzisteri će ponovo formirati biofilm koji će proizvoditi nove planktonske ćelije, a one vratiti simptome bolesti (Slika 1). Kako je za obnovu biofilma tretiranog antibioticima dovoljno manje od 1% početne populacije bakterija, „žilavost“ biofilмова postaje jasnija. Zbog toga se infekcije izazvane biofilmom upoređuju sa infekcijama planktonskim ćelijama bakterija u odsustvu imunog odgovora (Lewis, 2001).



Slika 1. Model rezistencije biofilma na antibiotike baziran na preživljavanju perzistentnih ćelija. Inicijalni tretman sa antibioticima ubija planktonske ćelije i većinu bakterijskih ćelija u biofilmu. Imuni sistem ubija planktonske perzistere, ali ne i perzistere u biofilmu koji su zaštićeni ekstracelularnom polimeričnom supstancijom (matriksom). Kada se prekine tretman, perzisteri se umnožavaju, oslobađa se planktonska populacija i vraćaju simptomi bolesti ([bacteriology.com/2008/05/26/biofilm/](http://bacteriology.com/2008/05/26/biofilm/)).

Standardni dilucionni metod za ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike bazira se na izloženosti (ekspoziciji) planktonskih mikroorganizama antibioticima, što nije slučaj kod bakterija koje rastu u biofilmu (Donlan i Costerton, 2002). Jasno je da vrednosti za MIC dobijene standardnim dilucionim testom (NCCL standard) nisu aplikativne za biofilm rastuće ćelije, zbog čega se koriste različite tehnologije za utvrđivanje efekta antibiotika na biofilm rastuću populaciju bakterija, tj. određivanje MBEC vrednosti – *Minimal Biofilm Eradication Concentracion*. MBEC predstavlja koncentraciju antibiotika ili biocida koja efikasno uništava jedan biofilm i predstavlja ekvivalent MBC

koncentraciji za planktonsku populaciju. Određivanje MBEC omogućava izbor novih antibiotika koji efikasno deluju na biofilmove, identifikaciju meta u biofilmu za nove antibiotike, izbor više odgovarajućih antibiotika za lečenje i praćenje mogućeg budućeg razvoja rezistencije biofilma na antibiotike (Ceri i sar., 2006). Do danas su razvijene mnoge aparature koje treba da pruže korisne informacije o biofilm procesima i više takvih sistema se koristi za određivanje efikasnosti različitih antimikrobnih agenasa prema biofilm-vezanim mikroorganizmima (Tabela 1).

**Tabela 1:** Aparature koje se koriste za rast i ispitivanje osetljivosti bakterija u biofilmu na antibiotike

Aparatura	Testirani mikroorganizam	Dinamika tečnosti	Supstrat	Metod za uklanjanje i kvantifikaciju
<b>Modifikovani Robbins uređaj</b>	<i>P. pseudo-malei</i>	Batch/mešanje	<i>Silastic disk</i>	Način uklanjanja nije dat; brojanje vijabilnih ćelija
<b>Calgary bio-film uređaj</b>	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i>	Batch/mešanje	Plastični klin	Sonikacija, brojanje vijabilnih ćelija
<b>Disk reaktor</b>	Gram negativne bakterije	Batch/mešanje	Kupon teflona	Sonikacija, vorteks, homogenizacija, brojanje vijabilnih ćelija ili direktno brojanje
<b>CDC biofilm reaktor</b>	Gram negativne bakterije	Kontinuiran/otvoren sistem	Nepotreban priključak (plastika)	Sonikacija, vorteks, homogenizacija, brojanje vijabilnih ćelija ili direktno brojanje
<b>Perfused biofilm fermentor</b>	<i>Candida albicans</i>	Kontinuiran/otvoren sistem	Filter celuloza-acetat	Resuspenzovanje u sterilnoj vodi i brojanje vijabilnih ćelija
<b>Model mehura (bešike)</b>	Gram negativne bakterije	Kontinuiran/otvoren sistem	Urinarni kateter	Direktno posmatranje SEM ili TEM ili hemijska analiza

Donlan i Costerton, 2002.



Konvencionalni metod ubijanja bakterija antibioticima i dezinfekcionim sredstvima, uobičajeno je neefektivan kod biofilm organizovanih bakterija. Visoke doze antimikrobnih agenasa koje su potrebne za uklanjanje biofilm vezanih bakterija iz okruženja su nepoželjne i nisu u saglasnosti sa propisima o zaštiti životne sredine, kao što su i medicinski neprihvatljive, jer bi primena doze potrebne za ubijanje bakterija u biofilmu bilo ubijanje pacijenta. Zbog toga se nove strategije borbe protiv bakterijskih biofilmova zasnivaju na boljem razumevanju vezivanja bakterija za žive i nežive supstrate, rasta i odvajanja od susprata i hitno su potrebne medicini, kao i većini industrijskih grana.

## LITERATURA

1. Anderl J.N., Franklin M.J., Stewart P.S.: Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 7, 1818-1824, 2000.
2. Anderl J.N., Zahller J., Roe F., Stewart P.S.: Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 1251-1256, 2003.
3. Brooun A., Liu S., Lewis K.: A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 3, 640-646, 2000.
4. Brown C.M., Ellwood D.C., Hunter J.R.: Growth of bacteria at surfaces: influence of nutrient limitation, *FEMS Microbiology Letters*, 1, 163-166, 1977.
5. Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D., Buret A.: The Calgary Biofilm Device: a new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms, *J Clin Microbiol*, 37, 1771-1776, 1999.
6. Ceri H., Olson M.E., Morck D.W., Storey D.G.: Minimal Biofilm Eradication Concentration (MBEC) Assay: Susceptibility Testing for Biofilm, in *Biofilms, infection and antimicrobial therapy*, In: *Mechanisms of Biofilm resistance to antibiotics*, CRC Press Taylor & Francis Group, US, 257-269, 2006.
7. Costerton J.W., Stewart P.S.: Greenberg EP., Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections, *Science*, 284, 1318-1322, 1999.
8. Donlan R.M., Costerton J.W.: Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 2, 167-193, 2002.



9. Dunne Jr WM.: FOCUS, Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 2, 155-166, 2002.
10. Hausner M., Wuertz S.: High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis, *Appl Environ Microbiol*, 65, 3710-3713, 1999.
11. Lewis K.: MINIREVIEW Riddle of Biofilm Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 4, 999-1007, 2001.
12. Mah T.F.C., O'Toole G.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *TRENDS in Microbiology*, 9, 1, 34-39, 2001.
13. Maira-Litran T., Allison D.G., Gilbert P.: An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and the multi-drug efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms, *J Antimicrob Chemother*, 45, 789-795, 2000.
14. Olson M.E., Ceri H., Morck D.W., Buret A.G., Read R.R.: Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, *Can J Vet Res*, 66, 86-92, 2002.
15. Pace J.L., Rupp M., Roger G.: Biofilms, infection and antimicrobial therapy, In: Mechanisms of Biofilm resistance to antibiotics, CRC Press Taylor & Francis Group, US, 9-19, 2006.
16. Roberts A.P., Cheah G., Ready D., Pratten J., Wilson M., Mullany P.: Transfer of Tn916-like elements in microcosm dental plaques, *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 2943-2946, 2001.
17. Trachoo N.: Biofilms and the food industry, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 25, 6, 807-815, 2003.
18. Walters M.C III, Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J., Stewart P.S.: Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin, *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 317-323, 2003.
19. Watnick P., Kolter R.: Biofilm, City of Microbes, *Journal of Bacteriology*, 182, 10, 2675-2679, 2000.
20. Williams I., Venables W.A., Lloyd D., Paul F., Critchley I.: The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*, *Microbiology*, 143, 2407-2413, 1997.

Primljeno: 15.12.2010.

Odobreno: 20.02.2011.