

*Шлепотина Н.М., Плоткин Л.Л., Белов В.В.*

## **Микробиологическое и клиническое значение биопленочных инфекций (обзор литературы)**

ГБОУ ВПО "Южно-Уральский государственный медицинский университет" Минздрава России, г. Челябинск

*Slatina N.M., Plotkin L.L., Belov V.V.*

### **Microbiological and clinical significance of biofilm infections (review)**

#### **Резюме**

Проведен анализ литературных данных, посвященных проблеме биопленочной инфекции. Течение инфекций, протекающих с образованием микробных биопленок, отличается длительностью течения и сложностями в подборе эффективных средств антимикробной терапии. Образование биопленок является универсальным защитным механизмом для бактерий, уклоняющихся от факторов гуморального и клеточного иммунитета, воздействия антибактериальных препаратов и дезинфектантов. В настоящее время исследуются как морфофизиологические характеристики самих биопленок, так и эффективные методы диагностики и лечения состояний, вызванных ими. В отечественной и зарубежной литературе сегодня активно изучаются вопросы системного и местного иммунитета. Разрабатываются стандартизированные и унифицированные методики верификации биопленок, применимые как в клинических условиях, так и в условиях научного эксперимента. Также на сегодняшний день отсутствуют алгоритмы ведения пациентов с наличием биопленок в очаге инфекции.

**Ключевые слова:** биопленка, иммунитет, верификация биопленок

#### **Summary**

The analysis of literary data on the problem of biofilm infections. For infections, proceeding with the formation of microbial biofilms, different duration and difficulties in finding effective means of antimicrobial therapy. The formation of biofilms is a universal protective mechanism for bacteria evading factors of humoral and cellular immunity, antibacterial agents and disinfectants. Currently being explored as morpho-physiological characteristics of biofilms and efficient methods of diagnosis and treatment of conditions caused by them. In Russian and foreign literature of segodia actively studied the problems of systemic and local immunity. Develop standardized and uniform methods of verification of biofilms, as applicable in clinical conditions and in conditions of a scientific experiment. Also today there are no algorithms for the management of patients with the presence of biofilms in the focus of infection.

**Keywords:** biofilm, immunity, verification of biofilms

Биопленки – это постоянно обновляющееся сообщество микроорганизмов, адгезированных на биотической или абиотической поверхности и друг к другу, заключенных в биополимерный матрикс, предохраняющий их от вредных воздействий и являющийся одним из факторов межклеточного взаимодействия [1]. Формирование биопленки микроорганизмами служит универсальным фактором защиты от внешних воздействий. Бактерии, образующие биопленки, могут быть sessильными, находясь в составе самой биопленки, а также планктонными – при их дисперсии из биопленки. Планктонные бактерии способны в последующем образовывать биопленки – то есть переходить в sessильную форму – при их фиксации на биотическом или абиотическом субстрате. Инфекции, этиология и патогенез которых связан с образованием микробных биопленок, называются биопленочными [2,3].

Первое упоминание о биопленки относится к 1933 году, когда Артур Хенричи описал образование пленки на воде [4]. Несмотря на то, что факт существования биопленок известен относительно давно, интерес к их изучению особенно повысился в последние десятилетия. По различным данным, от 90 до 100% бактерий способны к формированию биопленок [5]. В настоящее время известно, что от 60 до 90% инфекций у человека вызываются микроорганизмами в составе биопленок [6; 7]. Отдельную проблему составляет образование биопленок на абиотических объектах, таких как имплантационный материал, катетеры, интубационные и трахеостомические трубки и т.д. [8].

В состав биопленок входят сами бактерии (от 5 до 35% объема) [9], а также биополимерный матрикс

(65 – 95%), состоящий из белков (до 60%), полисахаридов (декстран, целлюлоза, гиалуроновая кислота и др.) (40 – 95%), липидов (до 40%), нуклеиновых кислот (до 20%) и ионов металлов [3; 10]. Именно наличие матрикса определяет специфические свойства биопленок: устойчивость к действию антибиотиков, дезинфектантов, высоких температур, высушиванию, ультрафиолетовому излучению [11; 12], факторам гуморального и клеточного иммунитета макроорганизма [11], а также способность к координированной экспрессии генов и обмену генетической информацией между биопленочными микроорганизмами [13]. Матрикс, окружающий бактериальные клетки, имеет трехмерную структуру [3] и пронизан каналами, напоминающими сеть кровеносных сосудов. Матрикс служит запасом питательных веществ и воды для населяющих данную биопленку микроорганизмов, что наряду со снижением метаболической активности возбудителей позволяет им переживать неблагоприятные условия. Биопленочный матрикс служит микроорганизмам каркасом, на котором происходит рост колоний, а также обеспечивает передачу сигнальных молекул между микроорганизмами-образователями биопленки [4]. Состав биополимерного матрикса отличается даже в пределах одного вида бактерий [2]. Слизистая субстанция межклеточного вещества биопленок, образованных штаммами *Staphylococcus epidermidis*, представлена в основном поли- $\beta$ -1,6-N-ацетилглюкозамин, обеспечивающим защиту от иммунной системы и от антибиотиков [14]. Поли- $\beta$ -1,6-N-ацетилглюкозамин часто является основным компонентом биопленки, образованной бактериями с множественной лекарственной устойчивостью [15]. Внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и альгинат являются одними из важнейших компонентов матрикса слизистых колоний - биопленок, образованных *Pseudomonas aeruginosa*. Другой компонент биополимерного матрикса - полисахаридный межклеточный адгезин - имеет решающее значение для образования биопленок эпидермальным стафилококком [17]. Показано, что около 69% штаммов *Staphylococcus epidermidis* продуцируют мукоид с наличием полисахаридного межклеточного адгезина [18]. Исследования показывают, что в периферических отделах биопленки располагаются бактерии, обладающие нормальной активностью метаболизма и аэробным окислением [9], в то время как в центральных слоях - бактерии с замедленным метаболизмом и имеющие анаэробный тип дыхания [20]. Однако было установлено, что культивация бактерий в анаэробных условиях ингибирует процесс образования биопленок [21].

Для биопленок описан характерный вид бактерий – так называемые персистеры, численность которых внутри разных типов биопленок составляет 1-10% [9]. Персистеры оказались нечувствительны практически ко всем антибиотикам [9]. Доказано их существование в популяции бактерий до контакта с антибиотиком [22]. Клетки-персистеры формируются непосредственно из планктонных форм под действием стрессовых факторов, например, при приеме антибактериальных препаратов,

что приводит к изменению работы оперона с включением или выключением работы соответствующих структурных генов и замедлению метаболических процессов в бактериальных клетках [23, 24]. Трансформацию бактерий в персистеры многие исследователи объясняют функционированием системы «токсин – антитоксин». В обычных условиях в бактериальной клетке постоянно происходит синтез «токсина» и «антитоксина» в равной степени, что обуславливает нейтрализацию токсина. В условиях действия стрессовых факторов происходит нарушение синтеза «антитоксина», вследствие чего «токсин» становится свободным и реализует свою активность, приводя к замедлению обменных процессов бактериальной клетки [25]. Как известно, антибиотики воздействуют лишь на метаболически активные клетки. В связи с этим наличие персистеров в биопленке рассматривается как один из главных механизмов антибиотикорезистентности данных сообществ. Персистеры настолько замедляют метаболические процессы, что бактерицидные антибиотики могут на них оказывать лишь бактериостатический эффект [26].

Микроорганизмы, составляющие биопленку, образуют "quorum sensing" (QS), которое рассматривают как социальное поведение бактерий. Феномен коллективного поведения бактерий был описан в 1992 – 1994 годах [9]. В данном сообществе посредством межклеточной коммуникации [3] происходит формирование, рост биопленки, а также процесс дисперсии планктонных форм. Межклеточная коммуникация осуществляется через специфические молекулы – мессенджеры, а также за счет обмена бактерий генетической информацией через плазмиды. Среди сигнальных молекул можно выделить пептиды и ацил-гомосеринлактоны. Первые синтезируются грамположительными бактериями, вторые – грамотрицательными. Сообщество организует единую генетическую систему в виде плазмид - кольцевых ДНК, несущих информацию о поведении, пищевых и энергетических связях бактерий биопленки. Внеклеточная ДНК биопленок является элементарным фактором переноса генов устойчивости к антибактериальным препаратам [27]. Таким образом, становится возможной передача от персистеров генов, обеспечивающих синтез измененных рецепторов бактерий, выработку ферментов, разрушающих антибиотики, и прочие механизмы устойчивости к антибиотикам. На сегодняшний день генетические детерминанты, определяющие резистентность к антибактериальным препаратам у сессильных бактерий, плохо изучены [8].

Биопленка образуется не одномоментно. Этапы развития биопленки трактуются по-разному в различных литературных источниках. Тем не менее, большинство исследователей выделяют пять стадий биопленкообразования: 1. Первичная адгезия из окружающей среды. 2. Вторичная адгезия. 3. Колонизация. 4. Созревание биопленки. 5. Стадия распространения. Первичная адгезия осуществляется за счет неспецифических факторов, таких как электростатическое, гидрофобное, ван-дер-ваальсовое взаимодействие, броуновское движение частиц [3], и носит обратимый характер. При первичной адгезии бактерии прикрепляются к основным компонентам

соединительной ткани (ламинин, фибронектин, коллаген), которые служат матрицей для построения будущей биопленки [28]. Вторичная адгезия является специфической, осуществляется за счет специальных молекул (адгезинов и лектинов) с рецепторами клеток макроорганизма [3]. Некоторые исследователи не выделяют отдельно вторичную адгезию, а разделяют две стадии созревания. Во время первой стадии происходит необратимая адгезия бактериальных клеток, а во время второй стадии – образование микроколоний и синтез экзополисахаридного матрикса [9]. Считается, что у сапрофитных штаммов преобладают процессы неспецифической адгезии, а у клинических изолятов – вторичная адгезия [29]. Колонизация происходит за счет агрегации бактериальных клеток и формирования микроколоний, которые дают начало будущей биопленке [10]. Созревание биопленки происходит за счет активного синтеза компонентов межклеточного матрикса, формирования упорядоченной многослойной структуры в процессе размножения биопленочных микроорганизмов [8]. На этом же этапе происходит установление системы межклеточной коммуникации quorum sensing [30]. Дисперсия из биопленки микроорганизмов, способных к адгезии на биотических и абиотических поверхностях, осуществляется за счет ферментов (ДНК-аз), синтезируемых самими бактериями биопленки. Отделившиеся планктонные бактерии способны так же прикрепляться к поверхности медицинского оборудования или тканей человека и образовывать биопленку.

Однако не все бактериальные штаммы способны к образованию биопленок. Бактерии, формирующие биопленку, отличаются более медленным размножением и метаболизмом по сравнению с планктонными формами. Способность бактериальных клеток к образованию биопленки запрограммирована на молекулярно-генетическом уровне. С помощью молекулярно-биологических методов удалось установить, что бактерии, входящие в состав биопленок, в значительной мере отличаются друг от друга по уровню экспрессии большого количества генов [31; 32]. В настоящее время происходит активный поиск генов, отвечающих у микроорганизмов за возможность образования биопленки. Например, найден ген-регулятор *Hna*, контролирующий гены, ответственные за формирование биопленки. Ген *pdvB* экспрессируется только у штаммов бактерий биопленок и связан с наличием антибиотикорезистентности. Белок *CagD* активирует рост фимбрий бактериальных клеток и синтез внеклеточных полисахаридов, способствуя образованию биопленок [9].

Практически во всех опубликованных работах подчеркивается, что штаммы, резистентные к наиболее часто применяемым в клинической практике антибиотикам, гораздо чаще образуют биопленки [33]. Образование стафилококками биопленок во многом связано с появлением метициллин-резистентных (MRSA) и ванкомицин-резистентных (VRS) стафилококков [34]. Способность микроорганизмов к образованию биопленок напрямую коррелирует с их вирулентностью. Среди клинически значимых микроорганизмов наибольшая способность формировать биопленки была выявлена у следующих родов

микроорганизмов: *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Actinomyces* spp., *Haemophilus* spp. [35, 36], *Streptococcus* spp., *Burkholderia cepacia*, а также у таких видов, как *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, грибы *Candida albicans* [2]. Особую проблему на данный момент представляют госпитальные штаммы синегнойной палочки. Они характеризуются крайне высокой вирулентностью и устойчивостью к стандартной антибиотикотерапии. *Pseudomonas aeruginosa* являются одними из наиболее часто образующих биопленку бактериями. Многие исследователи связывают данный факт с их способностью синтезировать в большом количестве в межклеточное пространство альгинат. Доказано, что штаммы со сверхэкспрессией гена *algA* обладают повышенной вирулентностью и способностью к образованию биопленок [37].

Данные литературы противоречивы в отношении проницаемости биопленки для антибиотиков [3]. Однако есть антибиотики, которые могут преодолевать матрикс биопленки [3]. К таким антибиотикам относятся: рифампицин [45], фторхинолоны, фосфомицин [40] и β-лактамы антибиотики [41]. Одним из первых препаратов, у которого была обнаружена способность вызывать деструкцию бактериальных биопленок, является кларитромицин [42]. Жуже проникают в структуру биопленки аминогликозиды, так как они связываются с полисахаридами матрикса [8] – глицерол-фосфорилированными β-глюканами у *Pseudomonas aeruginosa* [43], поэтому применение препаратов данной группы при инфекциях, вызванных синегнойной палочкой нередко оказывается неэффективным [44, 45]. Также отмечается возрастание резистентности штаммов в биопленках к ванкомицину [45; 34; 9]. Обильное слизеобразование у вирулентных штаммов *Staphylococcus epidermidis* снижает эффект применения гликопептидов - ванкомицина и тейкоплакина [46]. Также неоднозначны литературные данные по чувствительности бактерий в биопленках к ципрофлоксацину: многие из последних работ доказали снижение эффективности препарата. Большинство исследований подтверждают наличие резистентности бактерий в биопленках по отношению к пенициллинам и цефалоспорином [23]. Однако сниженная проницаемость биопленки не всегда может рассматриваться как основная причина неэффективности антибиотикотерапии [47]. Многие исследователи связывают ее напрямую с изменением метаболической активности бактерий в биопленке [8]. Действие антибиотика на биопленку определяется характером образующих ее бактерий, зрелостью биопленки и химической природой самого антибиотика, а также особенностями штаммов бактерий [25]. Тем не менее, не возникает сомнений, что монотерапия каким-либо антибиотиком, даже входящим в спектр чувствительности бактерий, окажется неэффективной в отношении биопленки. Так как биопленка чаще образована микробными ассоциациями, это приводит к аддикции антибиотикорезистентности внутри биопленки с получением множественной лекарственной устойчивости. Поэтому данный факт диктует применение комбинации антибак-

териальных препаратов в случае подозрения на наличие госпитальных штаммов в очаге инфекции, которые наиболее часто образуют биопленку [48, 49]. Без воздействия на биопленочный матрикс и существующие в биопленке персистеры нельзя говорить об успешной антибиотикотерапии. При этом наличие обоих механизмов обязательно, потому что только при разрушении внеклеточного матрикса можно доставить антибиотик в глубокие слои биопленки, где и находятся самые стойкие ее элементы – персистеры. К таким способам относятся использование липосом, микросфер, мицелл, гидрогеля [28] с целью адресной доставки антимикробного препарата, однако данный метод является дорогостоящим и до сих пор не нашел широкого применения в клинической практике [50, 51, 52].

Парадокс бактериальной биопленки состоит в том, что действие антибиотиков в сублетальных для бактерий концентрациях вызывает усиление роста биопленок [5]. Это объясняет усугубление тяжести течения инфекционного процесса у пациентов с недостаточно продолжительным курсом антибиотиков, либо при их применении в субтерапевтических дозах [56]. Данный эффект был выявлен у цефалотина, цефалексина, ванкомицина, линезолида как ответная реакция на стрессорное воздействие. Однако известен факт усиления роста биопленок и в присутствии терапевтических концентраций антибиотиков из группы пенициллинов [57]. Стимулирующий эффект низких доз антибиотиков на образование биопленки объясняется тем, что такие дозы способствуют появлению и распространению генов устойчивости к данному препарату [58].

Несмотря на то, что вопросы морфологии биопленок на сегодня изучены достаточно хорошо, по-прежнему остается открытым вопрос верификации биопленок в клинической практике. В настоящее время сложность исследования биопленки как биологического материала сводится к тому, что образование биопленки *in vitro* во многом отличается от такового *in vivo*. Все это наряду с отсутствием стандартизации процесса верификации биопленок порождает появление противоречивых данных относительно устойчивости бактерий в биопленках к антибиотикам и факторам иммунной системы. Следует отметить, что большинство работ по изучению взаимодействия биопленок и иммунной системы было проведено *in vitro* и с использованием всего нескольких актуальных биопленкообразующих микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* [2]. Уже зарекомендовавшие себя в научных исследованиях методы изучения биопленок (конфокальная, лазерная сканирующая микроскопия, электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, гибридизация *in situ*) практически не адаптированы к условиям клиники.

В литературе описаны два основных группы метода, позволяющих выявить биопленки: статические и динамические. Статические методы основаны на выращивании биопленок на питательной среде в лунках планшета с последующим удалением планктонных форм различны-

ми методами, окрашиванием и определением оптической плотности образца с помощью спектрофотометрии. По окрашиванию образца можно сделать вывод о степени зрелости биопленки: чем более интенсивное окрашивание, тем более зрелая биопленка, так как по мере созревания в ней происходит накопление межклеточного матрикса. Также биопленку можно верифицировать с помощью световой иммерсионной микроскопии после рутинной окраски [59]. Данный полуколичественный метод достаточно дешев и прост в исполнении. Динамические методы, основанные на способности бактерий образовывать биопленки на границе двух сред, позволяют визуализировать биопленки без необходимости использования красителей. Суть динамических методов сводится к инокуляции планктонных форм бактерий в жидкие питательные среды, циркулирующие в закрытых системах – так называемых ферментерах [9]. Учет проводится при помощи фазово-контрастной микроскопии с возможностью применения формата реального времени. Недостаток данного метода и его различных модификаций – необходимость использования специальных систем, обеспечивающих постоянный поток жидкости. В связи с этим данные способы культивации биопленок нашли свое применение в основном в научно-исследовательской деятельности [13]. Несомненными достоинствами молекулярно-биологических методов являются возможность определения отдельных генов, ответственных за способность микроорганизмов к биопленкообразованию, а также определение специфических последовательностей, участвующих в обеспечении антибиотикорезистентности. Однако и эти методы также являются недостаточно удобными в клинической практике, так как база генов, которые отвечают за возможность образования бактериями биопленки, еще недостаточно изучена.

Описано образование биопленок интенсивно изучается при стоматологической (периодонтит, карнес, стоматит), гинекологической (вагинит, цервицит, эндометрит), урологической патологии (простатит, инфекции мочевыводящих путей), заболеваниях ЛОР-органов (тонзиллит, отит, синусит), инфекциях кожи, хирургических инфекциях (инфекции мягких тканей, остеомиелиты, внутрибрюшные инфекции, гнойно-деструктивные заболевания легких, синдром диабетической стопы) [8]. У лиц с иммунодефицитными состояниями биопленки образуются чаще [61]. Клинически образование биопленки связано с переходом острой инфекции в хроническую, персистирующую, подострую [14]. В настоящее время доказано, что наличие биопленки в очаге инфекции является одним из факторов, влияющих на течение хирургических инфекций. В частности, показано, что распространенный перитонит характеризуется более тяжелым клиническим течением, а также отличается большей выраженностью системной воспалительной реакции в случае наличия у пациента биопленки в брюшной полости [42]. При открытых, травматических операциях на брюшной полости отмечается повышение устойчивости бактериальной флоры [62], что косвенно можно связать с более частым образованием биопленок. Существуют диагностические

критерии, позволяющие заподозрить наличие у пациента биопленок в очаге инфекции (Parsek M.R., Singh P.K., 2003): 1. Патогенные бактерии связаны с поверхностью. 2. При непосредственном исследовании инфицированных тканей обнаруживаются агрегированные клетки, заключенные в матрицу. 3. Инфекция носит монотопный характер. 4. Клиническая резистентность выделенных штаммов к антибиотикам наряду с верифицированной рутинными методами чувствительностью бактерий к ним. 5. Отрицательные результаты культурального метода при наличии клинической картины, свидетельствующей о наличии инфекционного процесса у пациента. 6. О неэффективности иммунного ответа в отношении биопленочных патогенов свидетельствует расположение макроколоний в отдельных участках тканей макроорганизма, связанных с иммунными клетками [9]. В настоящее время аспекты антибиопленочного иммунитета активно изучаются [63].

Подводя итог, нужно отметить, что на сегодняшний день открытыми остается большинство вопросов, связанных с биопленками, начиная от их морфологического и функционального устройства, заканчивая реакцией органов и систем макроорганизма в ответ на формирование биопленки, а также разработкой эффективных методов терапии. До сих пор не стандартизована методика ве-

рификации биопленок с помощью доступных в клинических условиях материалов и средств. Также не разработаны стандарты ведения пациентов с инфекциями при наличии биопленки. Вопросы местного и системного антибиопленочного иммунного ответа в настоящее время трактуются неоднозначно как в отечественной, так и в зарубежной литературе. Таким образом, изучение различных клинических и биологических аспектов биопленок на сегодняшний день представляется весьма актуальным. ■

*Шлепотина Н.М., ассистент кафедры биологии, ГБОУ ВПО "Южно-Уральский государственный медицинский университет" Минздрава России, г. Челябинск; Плоткин Л.Л., доктор медицинских наук, профессор кафедры факультетской хирургии, ГБОУ ВПО "Южно-Уральский государственный медицинский университет" Минздрава России, г. Челябинск; Белов В.В., кандидат медицинских наук, ассистент кафедры факультетской хирургии, ГБОУ ВПО "Южно-Уральский государственный медицинский университет" Минздрава России, г. Челябинск; Автор, ответственный за переписку - Плоткин Леонард Львович, plotcin@yandex.ru, 454092 Челябинск, Доватора 22а - 11*

## Литература:

1. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. Журнал микробиологии 2011; (1): 101 - 108
2. Чеботарь И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета. Вестник Российской Академии медицинских наук 2012; (2): 22 - 29
3. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции. Журнал инфектологии 2010; 2 (3): 4 -15
4. Белобородова Н.В., Байрамов И.Т., Миленин Д.О. Влияние комбинации кларитромицина с имипенемом на формирование микробной биопленки *Ps. aeruginosa*. Инфекции в хирургии 2010; 8(2): 71 - 74
5. Masadeh M.M., Mhaidat N.M., Alzoubi K.H., Hussein E.I., Al-Trad E.I. In vitro determination on the antibiotic susceptibility of biofilm-forming *Ps. aeruginosa* and *S. aureus*: possible role of proteolytic activity and membrane lipopolysaccharide. Infect. Drug Resist. 2013; 6: 27 - 32
6. Льюис К. Персистирующие клетки и загадка выживания биопленок. Биохимия 2005; 70(2): 327 - 336
7. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical device. J. Clin. Microbiol. 1985; 22: 996-1006
8. Сидоренко С.В. Роль бактериальной биопленки в патологии человека. Инфекции в хирургии 2004; (2): 16 - 20
9. Чернявский В.И. Бактериальные биопленки и инфекция (лекция). Анналы института Мечникова 2013; (1): 86 - 90
10. Голуб А.В. Бактериальные биопленки - новая цель терапии. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2012; (1): 23 - 29
11. Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. Molecules 2009; 14: 2535-54
12. Grant S.S., Hung D.T. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. Virulence 2013; 4: 273 - 283
13. Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В. Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективны. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2012; (1): 17 - 22
14. Arana M.S., Yadav S. Biofilms: microbes and disease. Braz. J. Infect. Dis. 2008; 12: 526 - 530
15. Roux D., Pier G.B., Skurnik D. Magic bullets for the 21th century: the reemergence of immunotherapy for multi- and pan-resistant microbes. Antimicrob. Chemother 2012; 67: 2785 - 2787
16. Kaplan J.B., Vetri K.L., Cardona S.T., et al. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. J. Antibiot. (Tokyo) 2011; 65(2): 73 - 77
17. Kristian S.A., Golda T., Ferracin F., et al. The ability of biofilm formation does not influence virulence of *Staphylococcus aureus* and host response in a mouse tissue cage infection model. Microb. Pathog. 2004; 36: 237 - 245
18. Podbielska A., Galkouska H., Stelmach E., Mlynczyk G., Olszewski W.L. Siime production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients with diabetic foot ulcers. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2010; 58: 321 - 324
19. Moons P., Michiels C.W., Aertsen A. Bacterial interactions in biofilms. Crit. Rev. Microbiol. 2009; 35(3): 157-168.
20. Hassett D. J., Sutton M.D., Schurr M.J., Herr A.B., Caldwell C.C., Matu J.O. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. Trends. Microbiol. 2009; 17: 130-138.

21. Hess D.J., Henry-Stanley M.J., Lusczek E.R., Beilman G.J., Wells C.L. Anoxia inhibits biofilm development and modulates antibiotic activity. *J. Surg. Res.* 2013; 184: 488 - 494
22. Hotchkiss R.S., Karl I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Eng. J. Med.* 2003; 348: 138-150
23. Singh R., Ray P., Das A., Sharma M. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *S. aureus* an in vitro study. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58: 1067 - 1073
24. Izano E.A., Amarante M.A., Kher W.B., Kaplan J.B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74: 470-476.
25. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2012; (1): 51 - 58
26. Moker N., Dean C.R., Tao J. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to Quorum sensing signaling molecules. *J. of Bact.* 2010; 192: 1946-1955.
27. Montaharo L., Poggi A., Visai L., et al. Extracellular DNA in biofilms. *Int. J. Artif. Organs.* 2011; 34: 824 - 831
28. Kasimanickam R.K., Ranjan A., Asokan G., Kasimanickam V.R., Kastelic J.P. Prevention and treatment of biofilms by hybrid- and nanotechnologies. *Int. J. Nanomedicine* 2013; 8: 2809 - 2819
29. Демаков В.А., Кузнецова М.В., Карпунина Т.И., Николаева Н.В. Гидрофобные свойства и пленкообразующая способность штаммов рода *Pseudomonas*, изолированных из разных экологических ниш. *Вестник Пермского университета* 2010; (1): 55 - 58
30. Manos J., Arthur J., Rose B., et al. Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung. *J. of Med. Microb.* 2008; 57: 1454-1465
31. Wagner V.E., Gillis R.J., Iglewski B.H. Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* 2004; 22 Suppl 1:S15-20.
32. Vilain S., Cossette P., Zimmerlin I., Jean-Paul D., Guy-Alain J., Thierry J. Biofilm proteome: homogeneity or versatility? *J. Proteome Res.* 2004; 3: 132-136.
33. Sanchez C.J., Mende K., Beckius M.L., et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 47
34. Abdelhady W., Bayer A.S., Seidi K., et al. Reduced vancomycin susceptibility in an in vitro catheter-related biofilm model correlates with poor therapeutic outcomes in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *S. aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57: 1447 - 1454
35. Немцева Н.В., Фадеев С.Б. Формирование биопленок возбудителями хирургической инфекции мягких тканей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии* 2011; (4): 8 - 14
36. McAuliffe L., Ellis R.J., Miles K., Ayling R.D., Nicholas R.A. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology* 2006; 152(Pt 4): 913-922
37. Oglesby L.L., Jain S., Ohman D.E. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology* 2008; 154: 1605-1615.
38. Mohamed J.A., Huang D.B. Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56: 1581 - 1588
39. Driffell K., Miller K., Bostock J.M., O'Neill A.J., Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; 61: 1053-1056.
40. Rodriguez-Martinez J.M., Ballesta S., Pascual A. Activity and penetration of fosfomicin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2007; 30: 366-368.
41. Zahler J., Stewart P.S. Transmission electron microscopic study of antibiotic action on *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 2679-2683
42. Плоткин Л.Л., Парфенова О.В., Бордуновский В.Н., Шапко И.П. Клиническое значение биопленки у пациентов с распространенным перитонитом. Современные проблемы науки и образования 2013; (2). Available from: URL: <http://www.science-education.ru/108-9136>
43. Sadovskaya I., Vinogradov E., Li J., Hachani A., Kowalska K., Filloux A. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the ndvB gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans, which bind aminoglycosides. *Glycobiology* 2010; 20: 895-904
44. Singh R., Ray P., Das A., Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65: 1955 - 1958
45. Kotulova D., Slobodnikova L. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to vancomycin, gentamicin and rifampicin. *Microbiol. Immunol.* 2010; 59: 80 - 87
46. Farber B.F., Kaplan M.H., Clogston A.G. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptides antibiotics. *J. Infect. Dis.* 1990; 161(1): 37-40.
47. Stewart P.S. Diffusion in biofilms. *J. Bacteriol.* 2003; 185: 485-91
48. Sandoe J.A., Worsome J., West A.P., Heritage J., Wilcox M.H. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57: 767 - 770
49. Tang H.J., Chen C.C., Cheng K.C., et al. In vitro efficacy and resistance of rifampicin-based-combination regimens for biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57: 5717 - 5720
50. Moen M.D., Lyseng-Williamson K.A., Scott L.J. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs.* 2009; 69: 361-392.
51. Rediske A.M., Hymas W.C., Wilkinson R., Pitt W.G. Ultrasonic enhancement of antibiotic action on several species of bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1998; 44: 283-288
52. Скоробогатых Ю.И., Перунова П.П., Курлаев П.П. Экспериментальное изучение комбинации ципрофлоксацина с окситоцином на образование биопленок условно патогенными бактериями. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии* 2010; (6): 3-7.
53. Rahman M., Kim S., Kim S.M., Seol S.Y., Kim J. Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. *Biofouling.* 2011; 27: 1087 - 1093
54. Jass J., Costerton J.W., Lappin-Scott H.M. The effect of electrical currents and tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Ind. Microbiol.* 1995; 15: 234 - 242.
55. Roche D.M., Byers J.T., Smith D.S., Glansdorp F.G., Spring D.R., Welch M.K. Communications blackout? Do N-acylhomoserine-lactone degrading enzymes have any role in quorum sensing? *Microbiology.* 2004; 150:

- 2023 – 2028.
56. Fluit A.C., Schmitz F.J. Bacterial resistance in urinary tract infections: how to stem the tide. *Expert. Opin. Pharmacother.* 2001; 2: 813 - 818
  57. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15: 167-193.
  58. Kaplan J.B., Izano E.A., Gopal P., et al. Low level of  $\beta$ -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *MBio.* 2012; 3: e00198-12
  59. Плоткин Л.Л., Бордуновский В.Н., Белов В.В., Христенко П.И., Колесникова Ю.О., Широбокова М.В. Роль бактериальной биопленки в течении гнойно-некротического процесса у пациентов с синдромом диабетической стопы. *Инфекции в хирургии* 2010; 8(2): 75-77
  60. Struthers J. K. The use of a continuous culture system to study the antimicrobial susceptibility of bacteria in biofilm. *Meth. Molecular. Med.* 2000; 48: 215-225.
  61. Sawhney R., Berry V. Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics and control: an overview. *Indian. J. Med. Sci.* 2009; 63: 313 - 321
  62. Didem B., Huseyin B., Osman Y., Yasemin B., Necati G., Canan T. Early effects of laparotomy and laparoscopy on bacterial behavior and proinflammatory cytokines on bacterial peritonitis in rats I: *Escherichia coli*. *J. Pediatr. Surg.* 2008; 43: 1494 - 1501