

© ШИПИЦЫНА И.В., ОСИПОВА Е.В., 2022

Шипицына И.В., Осипова Е.В.

ВЛИЯНИЕ β -ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ НА АКТИВНОСТЬ БИОПЛЕНОЧНЫХ ФОРМ БАКТЕРИЙ *K. PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАН ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава РФ, 640014, Курган, Россия

Одной из причин появления высокорезистентных штаммов связывают со способностью бактерий формировать биопленки на различных поверхностях. Образование возбудителями биопленки приводит к снижению активности антибиотика, увеличению времени для выработки бактериями генов стрессового ответа, и, как следствие, повышению анти-микробной толерантности.

*Цель работы: исследовать влияние имипенема и цефепима на активность биопленочных форм бактерий *K. pneumoniae*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом. Объект исследования – клинические штаммы *K. pneumoniae*, выделенные из ран пациентов хроническим остеомиелитом. В контрольной серии оценивали уровень биопленкообразования штаммов *K. pneumoniae* через 48 ч культивирования на покровных стеклах и 96-луночных полистироловых планшетах. Во второй и третьей сериях на биопленочную форму бактерий *K. pneumoniae* воздействовали имипенемом и цефепимом и через 24 ч оценивали активность биопленкообразования согласно разработанным ранее критериям. Структура формирующейся биопленки на поверхности покровного стекла во всех сериях эксперимента была представлена одиночными адгезированными клетками и микроколониями различного размера. Культивирование с антибиотиками приводило к уменьшению количества микроколоний размером от 10 до 10 000 мкм² во второй и третьей сериях, однако значимые различия с показателями контрольной серии были установлены только при воздействии цефепима. Интенсивность пленкообразования *K. pneumoniae* в контрольной серии планшетным способом составляла 0,350 (0,334; 0,368) ед. опт. пл. При культивировании биопленок совместно с антибактериальными препаратами, биопленкообразующая активность через 24 ч эксперимента была значимо ниже показателей контрольной группы во всех опытных сериях. Бактерии *K. pneumoniae*, выделенные у пациентов хроническим остеомиелитом, при культивировании на полистироловых планшетах и на поверхности покровных стекол активно формируют биопленку, проявляя высокоадгезивные свойства. Показано, что исследуемые антибиотики оказывают бактериостатическое действие на биопленочные формы бактерий *K. pneumoniae*. Бактерицидного действия имипенема и цефепима на биопленочные формы не выявлено.*

Ключевые слова: биопленка; резистентность; хронический остеомиелит; антибиотики.

Для цитирования: Шипицына И.В., Осипова Е.В. Влияние β -лактамов антибиотиков на активность биопленочных форм бактерий *K. pneumoniae*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (10): 594-599. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-594-599>

Для корреспонденции: Шипицына Ирина Владимировна, канд.биол. наук, науч. сотр. отдела доклинических и лабораторных исследований; e-mail: ivschimik@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 30.06.2022

Принята к печати 27.07.2022

Опубликовано 14.10.2022

Shipitsyna I.V., Osipova E.V.

INFLUENCE OF β -LACTAM ANTIBIOTICS ON THE ACTIVITY OF *K. PNEUMONIAE* BACTERIA BIOFILM FORMS ISOLATED FROM WOUNDS OF PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS

Federal State Budgetary Institution Russian Ilizarov Scientific Centre «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of the RF Ministry of Health, 640014, Kurgan, Russian Federation

One of the reasons for the emergence of highly resistant strains is associated with the ability of bacteria to form biofilms on various surfaces. The formation of a biofilm by pathogens leads to a decrease in the activity of the antibiotic, an increase in the time for the production of stress response genes by bacteria, and, as a result, an increase in antimicrobial tolerance.

*To investigate the effect of imipenem and cefepime on the activity of biofilm forms of *K. pneumoniae* bacteria isolated from the wounds of patients with chronic osteomyelitis.*

*The object of the study is clinical strains of *K. pneumoniae* isolated from the wounds of patients with chronic osteomyelitis. In the control series, the level of biofilm formation of *K. pneumoniae* strains was assessed after 48 hours of cultivation on coverslips and 96-well polystyrene plates. In the second and third series, the biofilm form of *K. pneumoniae* bacteria was exposed to imipenem and cefepime, and after 24 hours the activity of biofilm formation was assessed according to previously developed criteria.*

*The structure of the emerging biofilm on the surface of the coverslip in all series of the experiment was represented by single adherent cells and microcolonies of various sizes. Cultivation with antibiotics led to a decrease in the number of microcolonies ranging in size from 10 to 10,000 μm^2 in the second and third series, however, significant differences from the control series were found only when exposed to cefepime. The intensity of film formation of *K. pneumoniae* in the control series by the tablet method was 0.350 (0.334; 0.368) units opt.pl. When cultivating biofilms together with antibacterial drugs, the biofilm-forming activity after 24 hours of the experiment was significantly lower than in the control group in all experimental series. *K. pneumoniae* bacteria isolated from patients with chronic osteomyelitis, when cultivated on polystyrene plates and on the surface of coverslips, actively form a biofilm, exhibiting highly adhesive properties. The studied antibiotics were shown to have*

a bacteriostatic effect on biofilm forms of K. pneumoniae bacteria. The bactericidal effect of imipenem and cefepime on biofilm forms was not revealed.

Key words: *biofilm; resistance; chronic osteomyelitis; antibiotics.*

For citation: Shipitsyna I. V., Osipova E. V. Influence of β -lactam antibiotics on the activity of *K. pneumoniae* bacteria biofilm forms isolated from wounds of patients with chronic osteomyelitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (10): 594-599 (in Russ.). DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-594-599

For correspondence: Shipitsyna I. V., Ph.D., researcher of the department of preclinical and laboratory studies; e-mail: ivschimik@mail.ru

Information about authors:

Shipitsyna I. V., <https://orcid.org/0000-0003-2012-3115>;
Osipova E. V., <https://orcid.org/0000-0003-2408-4352>.

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 30.06.2022

Accepted 27.07.2022

Published 14.10.2022

Введение. Остеомиелит – воспалительное деструктивное заболевание кости, вызываемое бактериями, микобактериями или грибами, возникающее, в большинстве случаев, в результате контактного распространения инфекции из прилежащей инфицированной ткани, гематогенного распространения, или обусловленное наличием открытых ран [1-4]. Для лечения остеомиелита большое значение имеет посев гнойного отделяемого на наличие микрофлоры с последующим определением чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам [3-5]. Недостаточное проникновение антибиотика в очаг воспаления; ослабление защитных механизмов пациента, применение лекарственных веществ, снижающих эффект препарата, возрастные особенности и другие причины могут приводить к несовпадению результатов терапии с данными антибиотикограмм, полученными для выделенных микроорганизмов [4-6]. Активность антибиотиков, в отличие от других лекарственных средств, величина непостоянная, зачастую снижается в связи с формированием у возбудителей приобретенной устойчивости [6]. Одной из распространенных причин резистентности инфекционных агентов к антимикробным препаратам и одним из факторов формирования хронических инфекционных процессов является биопленка, которая служит резервуаром для патогенных микроорганизмов, обеспечивает им физиологическую и функциональную стабильность [7-10]. Доказано, что биопленка является предпочтительной формой существования бактерий [8-11]. Поэтому выбор антибактериального препарата должен основываться не только на результатах антибиотикочувствительности возбудителей, находящихся в планктонном состоянии, но и на эффективности данных препаратов в отношении биопленочных форм бактерий.

Цель работы: исследовать влияние имипенема и цефепима на активность биопленочных форм бактерий *K. pneumoniae*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом.

Материал и методы. Исследованы клинические штаммы *Klebsiella pneumoniae* ($n=32$). Бактерии выделены из ран 24 пациентов с хроническим остеомиелитом, находившихся на лечении в гнойном центре ФГБУ «НМИЦ ТО» им. акад. Г.А. Илизарова в 2021-2022 гг.

Видовую идентификацию и определение чувствительности к антимикробным препаратам: цефепим (Cpm), имипенем (Im), проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе MicroScan WalkAway Plus System («Siemens», США) с использованием грамотрицательных 96-луночных панелей с субстратами для идентификации и антибиотиками – Neg Breakpoint Combo 44 (NBC 44). В качестве контроля использован референсный штамм *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Было проведено три серии эксперимента. В первой (контрольной) серии оценивали уровень биопленкообразования клинических штаммов *K. pneumoniae* через 48 ч культивирования на покровных стеклах и 96-луночных полистироловых планшетах. Во второй и третьей (опытных) сериях на формирующуюся (24 – часовую) биопленочную форму бактерий *K. pneumoniae* воздействовали антибактериальными препаратами: имипенемом и цефепимом в концентрации 10 мкг/мл и 30 мкг/мл соответственно и через 24 ч оценивали активность биопленкообразования согласно разработанным ранее критериям [11,12].

Показатели описательной статистики, в том числе медианы (Me) и квартилей (Q_{25} — Q_{75}), и критерия Вилкоксона, используемого для определения статистической значимости различий между группами, определяли с помощью программы Gnumeric 1.12.17. Различия между группами считали существенными при $p<0,05$.

Клиническое исследование проводилось в соответствии с этическими стандартами, изложенными в Хельсинской декларации, с разрешения комитета по этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова».

Результаты. При анализе антибиотикограмм бактерий *K. pneumoniae* 25% изолятов были резистентны к имипенему, 85% – к цефепиму. Среди чувствительных к имипенему штаммов 42% ($n=25$) изолятов обладали высокой биопленкообразующей способностью, 46% – средней, 12% – низкой. Чувствительные к цефепиму штаммы ($n=5$) характеризовались только средней биопленкообразующей способностью.

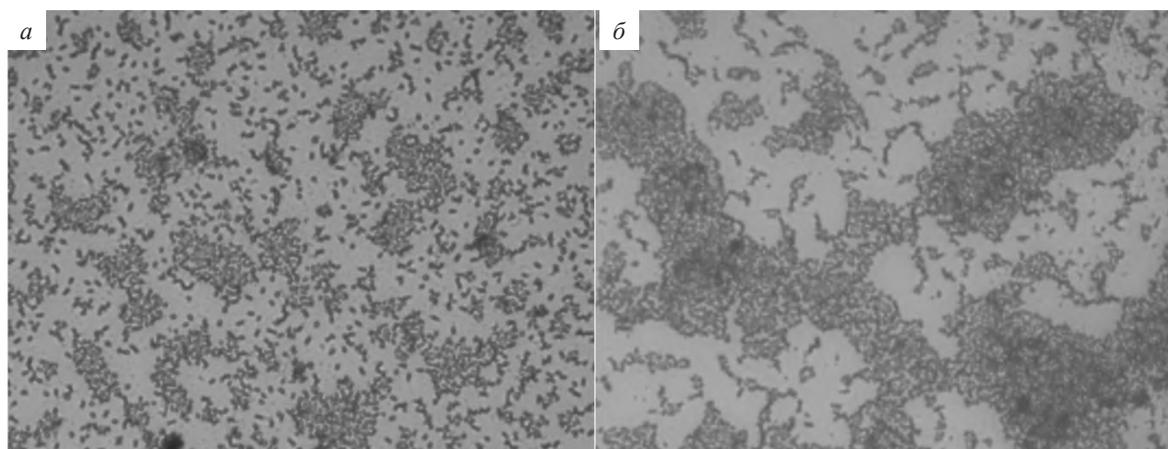


Рис. 1. Формирование биопленки штаммами *K.pneumoniae* на поверхности покровного стекла (1 серия).

a – через 24 ч эксперимента; *б* – через 48 ч эксперимента. Световая микроскопия.

Ув. x400. Окраска генциановым фиолетовым.

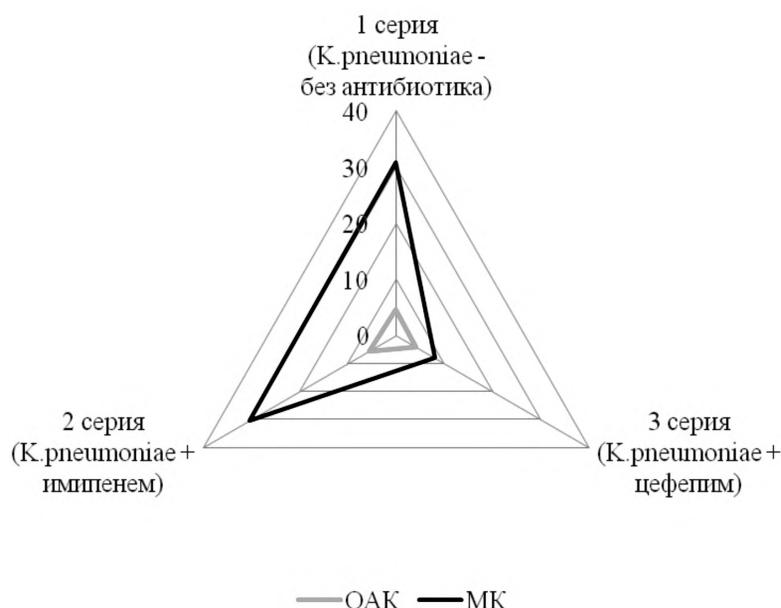


Рис. 2. Соотношение долей ОАК и МК в сериях эксперимента через 48 часов.

Среди резистентных к имипенему штаммов 49,1% ($n=8$) изолятов обладали высокой биопленкообразующей способностью, 46,8% – средней, 4,1% изолятов – низкой. Среди резистентных к цефепиму штаммов ($n=27$) высокая активность к биопленкообразованию была выявлена у 46% исследуемых штаммов, средняя активность у 44%, низкая – у 10% штаммов.

В течение 48 ч все выделенные клинические изоляты *K. pneumoniae* формировали биопленку на поверхности полистироловых планшетах и покровных стеклах (рис. 1, *a, б*).

Структура формирующейся биопленки на поверхности покровного стекла во всех сериях эксперимента была представлена одиночными адгезированными клетками (ОАК) и микроколониями (МК) различного

размера. Суммарная доля ОАК и МК в контрольной серии и в серии с имипенемом на биопленку не отличались ($p=0,29$) (рис. 2).

После добавления цефепима к формирующейся биопленке наблюдали значимое снижение показателя ($p=0,000006$), изменение которого происходило за счет уменьшения доли МК ($p=0,00002$) (рис. 3). В этой же серии наблюдали минимальные значения доли ОАК в площади поля зрения, однако существенных различий с другими сериями не установлено.

В структуре формирующейся биопленки во всех сериях преобладали МК размером от 10 до 100 мкм². Добавление антибиотиков приводило к уменьшению количества микроколоний размером от 10 до 10000 мкм² во второй и третьей сериях, однако значимые различия с показателями контрольной серии

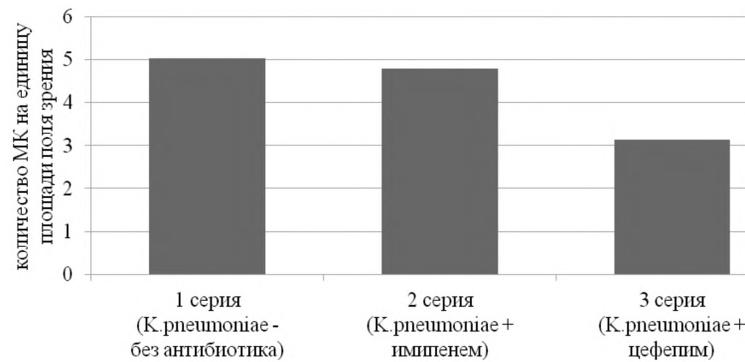


Рис. 3. Соотношение количества МК в сериях эксперимента через 48 часов.

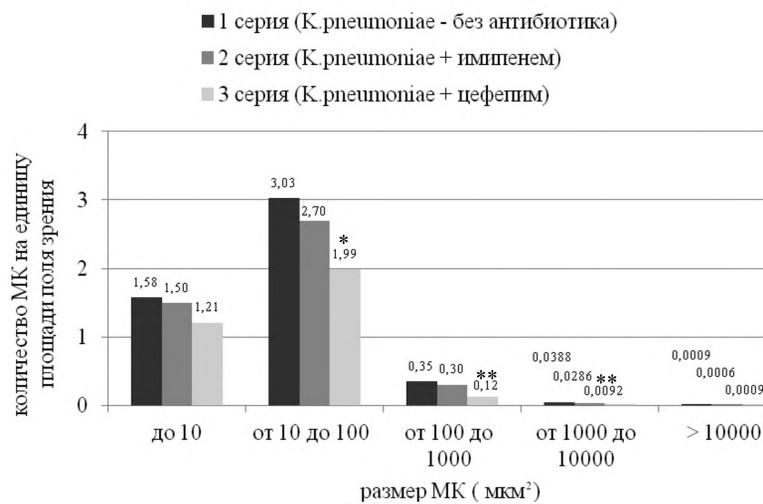


Рис. 4. Соотношение МК различного размера в сериях эксперимента через 48 часов.

* – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$ по сравнению с 1-й серией.

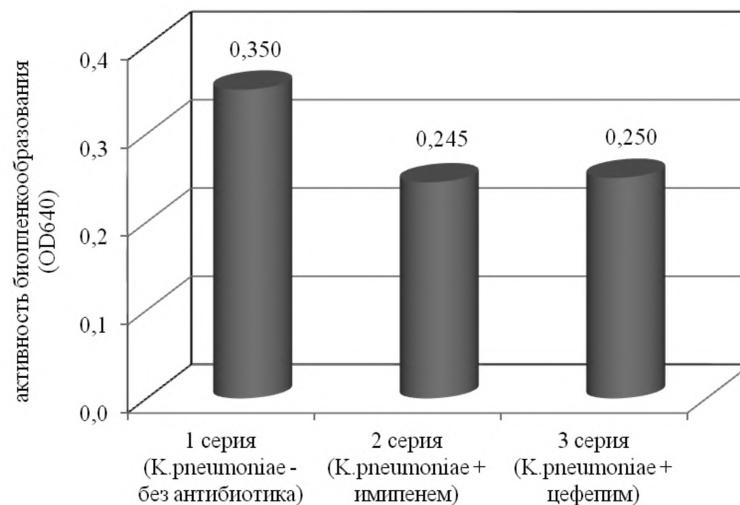


Рис. 5. Интенсивность биопленкообразования штаммами *K. pneumoniae* через 48 часов.

были установлены только после воздействия на биопленку цефепима (рис. 4).

Средняя интенсивность пленкообразования бактерий *K. pneumoniae* в контрольной серии планшет-

ным способом составляла 0,350 (0,334; 0,368) ед. опт. пл. При культивировании биопленок совместно с антибактериальными препаратами, интенсивность пленкообразования была значимо ниже показателей

контрольной группы (рис. 5). Имипенем и цефепим не оказывали бактерицидного действия на биопленочные формы бактерий, о чем свидетельствуют значения оптической плотности: 0,245 (0,221; 0,311) ед. опт. пл. ($p=0,000019$) и 0,250 (0,219; 0,290) ед. опт. пл. ($p=0,000021$) соответственно.

Обсуждение. Бактерии *K. pneumoniae* относят в группу клинически значимых патогенов с высоким уровнем антибактериальной устойчивости (ESKAPE) [13, 14]. По данным разных авторов за последние годы наблюдается активный рост антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae* к защищенным пенициллинам, цефалоспорином III – IV поколений, карбапенемам [13-15]. Это связано, в первую очередь, с главным механизмом резистентности, распространением ESBL CTX-M-типа, гидролизующих цефепим; OXA-48, гидролизующих цефалоспорины III и IV поколений, азтреонам, карбапенемы; металло- β -лактамаз NDM-1, VIM и IMP типа, эффективно гидролизующих множество β -лактамов [13, 15]. Резистентность *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам может реализовываться и по средствам формирования биопленки [7, 12, 16]. Биопленка – это барьер, препятствующий диффузии антибактериальных веществ в её матрикс [7, 9-10]. Доказано, что β -лактамы антибиотиков деактивируются уже в поверхностных слоях биопленки, сформированных β -лактамазопозитивными *K. pneumoniae* [13-15]. Экзополисахаридный матрикс биопленки обеспечивает защиту бактериальных клеток от проникновения гликопептидов и аминогликозидов [13]. Формирование возбудителями биопленки приводит к снижению активности антибиотика, увеличению времени для выработки бактериями генов стрессового ответа, и, как следствие, повышению антимикробной толерантности.

Заключение. Согласно проведенному нами исследованию, бактерии *K. pneumoniae*, выделенные у пациентов хроническим остеомиелитом, при культивировании на полистироловых планшетах и на поверхности покровных стекол активно формируют биопленку, проявляя высокоадгезивные свойства. Среди штаммов, резистентных к имипенему и цефепиму, выявлены, преимущественно, высоко- и среднеадгезивные изоляты. Показано, что исследуемые антибиотики оказывают угнетающее действие на биопленочные формы бактерий *K. pneumoniae*. Бактерицидного действия имипенема и цефепима на биопленочные формы бактерий *K. pneumoniae* не выявлено.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6, 12 см. REFERENCES)

1. Новомлинский В.В., Малкина Н.А., Андреев А.А., Глухов А.А., Микulich Е.В. Современные аспекты диагностики и лечения остеомиелита (обзор литературы). *Современные проблемы науки и образования*. 2016; 5:122.
2. Миронов С.П., Цискарашвили А.В., Горбатюк Д.С. Хронический посттравматический остеомиелит как проблема современной травматологии и ортопедии (обзор литературы). *Гений ортопедии*. 2019; 25(4):610-21. DOI: 10.18019/1028-4427-2019-25-4-610-621.
3. Винник Ю.С. Хронический остеомиелит: диагностика, лечение, профилактика (обзор литературы). *Московский хирургический журнал*. 2014; 2:50-3.
4. Привольнев В.В., Родин А.В., Каракулина Е.В. Местное применение антибиотиков в лечении инфекций костной ткани. *Клини-*

ческая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012; 14(2):118-31.

5. Шипицына И.В., Осипова Е.В., Леончук Д.С., Судницын А.С. Мониторинг ведущей грамотрицательной микрофлоры и антибиотикорезистентности при остеомиелите. *Гений ортопедии*. 2020; 2(4): 544-547. DOI:10.18019/1028-4427-2020-26-4-544-547.
7. Савилов Е.Д., Анганова Е.В., Носкова О.А., Духанина А.В. Бактериальные биопленки при гнойно-септических инфекциях. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 38-42. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.6.
8. Окулич В.К., Плотников Ф. В., Кабанова А. А. Роль микробных биопленок в патогенезе инфекционных процессов на современном этапе. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2012; (4): 70–82.
9. Романова Ю.М., Диденко Л.В., Толордава Э.Р. и др. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками. *Вестник РАМН*. 2011; 10: 31–9.
10. Глушанова Н.А., Блинова А.И., Алексеева Н.Б. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека. *Медицина в Кузбассе*. 2015; 14(2): 30-5.
11. Шипицына И.В., Осипова Е.В., Розова Л.В. Адгезивная способность клинических штаммов *Enterobacter cloacae*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом, и их чувствительность к антимикробным препаратам. *Новости хирургии*. 2017; 25(3): 273-8. DOI:10.18484/2305-0047.2017.3.273.
13. Осипова Е.В., Шипицына И.В. Информационная характеристика микробных биопленок, формируемых *in vitro* на поверхности покровного стекла клиническими штаммами *Klebsiella pneumoniae*. *Гений ортопедии*. 2018; 24(4): 478-81. DOI:10.18019/1028-4427-2018-24-4-478-481.
14. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопригора И.В., Шагин Д.А. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. *KMAX*. 2020; 22(1): 4-19. DOI: 10.36488/cmasc.2020.1.4-19.
14. Покудина И.О., Коваленко К.А. Распространенность и вклад в антибиотикоустойчивость β -лактамаз у амбулаторных изолятов *Klebsiella pneumoniae*. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016, 12 (2): 295-8.
16. Анганова Е.В., Ветохина А.В., Распопина Л.А., Кичигина Е.Л., Савилов Е.Д. Состояние антибиотикорезистентности *Klebsiella pneumoniae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 5:70-7. DOI:10.36233/0372-9311-2017-5-70-77.
17. Плотников, Ф.В. Комплексное лечение пациентов с гнойными ранами в зависимости от способности микроорганизмов-возбудителей формировать биопленку. *Новости хирургии*. 2014; 22(5): 575–81.

REFERENCES

1. Novomlinsky V.V., Malkina N.A., Andreev A.A., Glukhov A.A., Mikulich E.V. Modern aspects of diagnosis and treatment of osteomyelitis (literature review). *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; 5:122. (in Russian)
2. Mironov S.P., Tsiskarashvili A.V., Gorbatiyuk D.S. Chronic post-traumatic osteomyelitis as a problem of modern traumatology and orthopedics (literature review). *Geniy ortopedii*. 2019; 25(4): 610-21. DOI: 10.18019/1028-4427-2019-25-4-610-621. (in Russian)
3. Vinnik Yu.S. Chronic osteomyelitis: diagnosis, treatment, prevention (literature review). *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal*. 2014; 2:50-3. (in Russian)
4. Privolnev V.V., Rodin A.V., Karakulina E.V. Topical use of antibiotics in the treatment of bone infections. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2012; 14 (2): 118-31. (in Russian)
5. Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Leonchuk D.S., Sudnitsyn A.S. Monitoring of the leading gram-negative microflora and antibiotic resistance in osteomyelitis. *Geniy ortopedii*. 2020; 2(4): 544-7. DOI: 10.18019/1028-4427-2020-26-4-544-547. (in Russian)
6. Koller K.-P. Antibiotics. Targets, Mechanisms and Resistance. Edited by Claudio O. Gualerzi, Letizia Brandi, Attilio Fabbret-

- ti, and Cynthia L. Pon.. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014; 53: 3062. DOI:10.1002/anie.201400593
7. Savilov E.D., Anganova E.V., Noskova O.A., Dukhanina A.V. Bacteria Biofilms in Purulent-Septic Infections. *Acta biomedica scientifica.* 2019; 4(5): 38-42. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.6. (in Russian)
 8. Okulich V.K., Plotnikov F.V., Kabanova A.A. The role of microbial biofilms in the pathogenesis of infectious processes at the present stage. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2012; (4): 70–82. (in Russian)
 9. Romanova Yu.M., Didenko L.V., Tolordava E.R. Biofilms of pathogenic bacteria and their role in the chronicity of the infectious process. Search for means of combating biofilms. *Vestnik RAMN.* 2011; 10: 31–9. (in Russian)
 10. Glushanova N.A., Blinova A.I., Alekseeva N.B. Bacterial biofilms in infectious pathology of human. *Meditsina v Kuzbasse,* 2015; 14(2): 30-5. (in Russian)
 11. Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Rozova L.V. Adhesive ability of clinical strains of *Enterobacter cloacae* isolated from wounds of patients with chronic osteomyelitis and their sensitivity to antimicrobial drugs. *Novosti khirurgii.* 2017; 25(3): 273-8. DOI:10.18484/2305-0047.2017.3.273. (in Russian)
 12. Wyres K.L., Holt K.E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018; 45: 131-9. DOI: 10.1016/j.mib.2018.04.004.
 13. Osipova E.V., Shipitsyna I.V. Informational characteristics of microbial biofilms formed by clinical strains of *Klebsiella pneumoniae in vitro* on the surface of the cover glass. *Genij ortopedii.* 2018; 24(4): 478-81. DOI:10.18019/1028-4427-2018-24-4-478-481. (in Russian)
 14. Chebotar' I. V., Bocharova Y.A., Podoprigora I.V., Shagin D.A. Why *Klebsiella pneumoniae* becomes the leading opportunist pathogen. *KMAKH.* 2020; 22(1): 4-19. DOI: 10.36488/cmacc.2020.1.4-19. (in Russian)
 15. Pokudina I.O., Kovalenko K.A. Prevalence and contribution to antibiotic resistance of β -lactamases in outpatient isolates of *Klebsiella pneumoniae.* *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy.* 2016; 12(2): 295-8. (in Russian)
 16. Anganova E.V., Vetokhina A.V., Raspopina L.A., Kichigina E.L., Savilov E.D. The state of antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae.* *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2017; 5:70-7. DOI:10.36233/0372-9311-2017-5-70-77. (in Russian)
 17. Plotnikov, F.V. Complex treatment of patients with purulent wounds depending on the ability of pathogens to form a biofilm. *Novosti khirurgii.* 2014; 22(5): 575–81. (in Russian)