

МИКРОБИОЛОГИЯ

© ШИПИЦЫНА И.В., ОСИПОВА Е.В., 2023

Шипицына И. В., Осипова Е. В.

ИНГИБИРОВАНИЕ СТАФИЛОКОККОВОЙ БИОПЛЕНКИ ТРИПСИНОМ И ЦИПРОФЛОКСАЦИНОМ

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

Применение ферментов совместно с антибиотиками представляет перспективное направление терапии различных инфекционных заболеваний, ассоциированных с биоплёнкой, в том числе и при хроническом остеомиелите. Цель работы: повысить чувствительность бактерий Staphylococcus spp. к цiproфлоксацину, используя трипсин для разрушения матрикса биоплёнки. Биоплёнки бактерий Staphylococcus spp. (n=23) выращивали в лунках полистироловых планшетов и на поверхности покровных стекол. Эксперимент состоял из 4-х серий. В первой (контрольной) серии получали 72-часовую биоплёнку исследуемых клинических штаммов. Во второй и третьей сериях на 48- часовые биоплёнки воздействовали трипсином и цiproфлоксацином в концентрации 2 мкг/мл, в четвёртой - одновременно трипсином и цiproфлоксацином в равных соотношениях. Определяли интенсивность биоплёнкообразования на иммуноферментном анализаторе и изучали морфологию биоплёнок с помощью светового микроскопа. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Gnumeric 1.12.17. В контрольной серии эксперимента практически вся поверхность покровного стекла была покрыта плёнкой. После обработки цiproфлоксацином, матрикс биоплёнки становился более разреженным, при воздействии трипсином - рыхлым. Сочетанное действие трипсином и цiproфлоксацином вело к частичной деградации биоплёнки, рассеиванию и уменьшению площади её матрикса. Цiproфлоксацин не ингибировал биоплёнкообразование клиническими изолятами S. aureus, но бактериостатически действовал на рост биоплёнок, образованных штаммами S. haemolyticus и S. epidermidis по сравнению с контролем. Трипсин не оказывал ингибирующего действия на S. haemolyticus, но снижал активность биоплёнкообразования штаммами S. aureus и S. epidermidis. Результатом совместного действия цiproфлоксацина и трипсина стало снижение интенсивности биоплёнкообразования всех исследуемых штаммов стафилококков в 1,5-2,2 раза. Эффективность комбинированной терапии против биоплёночных форм бактерий в хронических ранах не изучена. Применение ферментов, разрушающих межклеточный матрикс биоплёнки, способствует переходу микроорганизмов в состояние планктонных форм, что повышает эффективность проводимой антибиотикотерапии и может позволить снизить сроки санации хронических ран.

Ключевые слова: хронический остеомиелит; биоплёнка; цiproфлоксацин; трипсин.

Для цитирования: Шипицына И. В., Осипова Е. В. Ингибирование стафилококковой биоплёнки трипсином и цiproфлоксацином. Клиническая лабораторная диагностика. 2023; 68 (7): 412-417. DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7- 412-417.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 16.03.2023

Принята к печати 10.04.2023

Опубликовано 03.07.2023

Shipitsyna I. V., Osipova E. V.

INHIBITION OF STAPHYLOCOCCAL BIOFILM BY TRYPSIN AND CIPROFLOXACIN

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

The use of enzymes together with antibiotics is a promising direction in the treatment of various infectious diseases associated with biofilm, including chronic osteomyelitis. To increase the sensitivity of bacteria Staphylococcus sp. to ciprofloxacin, using trypsin to destroy the biofilm matrix. Biofilms of bacteria Staphylococcus spp. (n=23) were grown in the wells of polystyrene plates and on the surface of coverslips. The experiment consisted of 4 series. In the first (control) series, a 72-hour biofilm of the studied clinical strains was obtained. In the second and third series, 48-hour biofilms were exposed to trypsin and ciprofloxacin at a concentration of 2 µg/ml; in the fourth series, they were simultaneously treated with trypsin and ciprofloxacin in equal proportions. The intensity of biofilm formation was determined on an enzyme immunoassay analyzer and the biofilm morphology was studied using a light microscope. Statistical analysis of the obtained data was carried out using the Gnumeric 1.12.17 program. In the control series of the experiment, almost the entire surface of the coverslip was covered with a film. After treatment with ciprofloxacin, the biofilm matrix became sparser, and when exposed to trypsin, it became loose. The combined action of trypsin and ciprofloxacin led to partial degradation of the biofilm, dispersion and reduction in the area of its matrix. Ciprofloxacin did not inhibit biofilm formation by clinical isolates of S. aureus, but had a bacteriostatic effect on the growth of biofilms formed by strains of S. haemolyticus and S. epidermidis compared to the control. Trypsin had no inhibitory effect on S. haemolyticus, but at the same time reduced the activity

of biofilm formation by strains of *S. aureus* and *S. epidermidis*. The result of the combined action of ciprofloxacin and trypsin was a decrease in the intensity of biofilm formation of all studied strains of *Staphylococcus* spp. by 1.5-2.2 times. The effectiveness of combination therapy against biofilm forms of bacteria in chronic wounds has not been studied. The use of enzymes that destroy the intercellular matrix of the biofilm contributes to the transition of microorganisms to the state of planktonic forms, which increases the effectiveness of antibiotic therapy and can reduce the time of rehabilitation of chronic wounds.

Key words: chronic osteomyelitis; biofilm; ciprofloxacin; trypsin.

For citation: Shipitsyna I. V., Osipova E.V. Inhibition of staphylococcal biofilm by trypsin and ciprofloxacin. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2023; 68 (7): 412-417 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-412-417>.

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.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 16.03.2023
Accepted 10.04.2023
Published 03.07.2023

Введение. Бактерии рода *Staphylococcus* - лидеры по частоте встречаемости при хроническом остеомиелите [1-3]. Наличие факторов патогенности (микрoкапсулы, адгезинов, протеина А, ферментов агрессии, коагулазы, нейраминидазы, фибринолизина, гиалуронидазы, экзотоксинов и др.) позволяет стафилококкам уклоняться от воздействия защитных механизмов врождённого иммунитета [4, 5]. Бактерии рода *Staphylococcus* формируют биоплёнки, в составе которых микроорганизмы обмениваются сигналами, поступающими из окружающей среды, и при достижении определённой концентрации способны изменять свой метаболизм, повышая шансы на выживание [5, 6]. Основное свойство биоплёнок - высокая устойчивость к антимикробным препаратам (АМП), что в значительной степени связано со строением внеклеточного матрикса [4, 6-9]. Дисперсия бактерий биоплёнки приводит к рецидиву инфекционного процесса. При этом АМП, высокоактивный в отношении планктонных клеток *in vitro*, оказывается не эффективным *in vivo* в борьбе с биоплёнкой [4, 9, 10].

Одним из эффективных подходов к эрадикации биоплёнки считается разрушение её матрикса, в результате чего бактерии становятся более восприимчивыми к иммунной системе хозяина и АМП [7, 11]. Особое внимание в контексте разрушения матрикса биоплёнки привлекает использование ферментов, эффективность которых зависит от его состава [11-14]. В стафилококковых биоплёнках соотношение полисахаридов, белков, эДНК может варьировать в зависимости от наличия питательных веществ, окружающей среды хозяина и других условий, что позволяет использовать широкий спектр экзоферментов для воздействия на определённые компоненты матрикса [4,7].

Применение ферментов совместно с АМП представляет перспективное направление терапии различных инфекционных заболеваний, ассоциированных с биоплёнкой, в том числе и при хроническом остеомиелите.

Цель работы: повысить чувствительность бакте-

рий *Staphylococcus* spp. к ципрофлоксацину, используя трипсин для разрушения матрикса биоплёнки.

Материал и методы. Объект исследования – клинические штаммы *Staphylococcus* spp. ($n=23$), выделенные из биоматериала ран и свищей пациентов с хроническим остеомиелитом.

Идентификацию микроорганизмов проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе MicroScan WalkAway Plus System (Siemens, США) с использованием грамположительных панелей - Pos. Combo 33 (PC 33) в соответствии с критериями CLSI [15]. В качестве контроля использованы референтные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 26213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990.

Биоплёнки исследуемых микроорганизмов выращивали в лунках полистироловых планшетов и на поверхности покровных стекол по ранее описанной методике [16]. Эксперимент состоял из 4-х серий. В первой (контрольной) серии получали 72-часовую биоплёнку исследуемых клинических штаммов. Во второй и третьей сериях на 48-часовые биоплёнки воздействовали трипсином и ципрофлоксацином в концентрации 2 мкг/мл соответственно, в четвёртой - одновременно трипсином и ципрофлоксацином в равных соотношениях. Через 24 часа оценивали активность биоплёнкообразования на иммуноферментном анализаторе «Biotek ELx808» (США).

Изучение морфологии биоплёнки, полученной на поверхности покровного стекла, проводили с помощью светового микроскопа Axio Lab.A1 и модульного программного обеспечения ZEN («Carl Zeiss», Германия).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Gnumeric 1.12.17. Используются показатели описательной статистики: медиана (Me), квартили (Q_{25} - Q_{75}) и критерий Вилкоксона для определения статистической значимости. 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 и обсуждение. Исследована био-плёнкообразующая способность 23 клинических штаммов *Staphylococcus* spp., принадлежащих к 3 таксонам: *S. aureus* ($n=10$, из них 4 - MRSA), *S. epidermidis* ($n=8$, из них 6 - MRSE), *S. haemolyticus* ($n=5$, из них 2 - MRSH). Среди клинических штаммов - 65% чувствительны к ципрофлоксацину (см. таблицу).

Чувствительные к ципрофлоксацину штаммы

Штаммы	Количество штаммов, n
<i>S. aureus</i>	7
<i>S. epidermidis</i>	5
<i>S. haemolyticus</i>	3

Средняя био-плёнкообразующая способность бактерий *Staphylococcus* spp. составляла 0,380 (0,358; 0,434) ед. опт. пл. (рис. 1.) Воздействие ципрофлоксацина и трипсина по отдельности на сформированную био-плёнку бактерий вело к снижению оптической плотности относительно первоначальных значений и составило 0,308 (0,276; 0,414) ед. опт. пл. и 0,231 (0,211; 0,309) ед. опт. пл., соответственно. При совместном воздействии трипсина с ципрофлоксацином активность био-плёнкообразования снижалась в 1,7 раза.

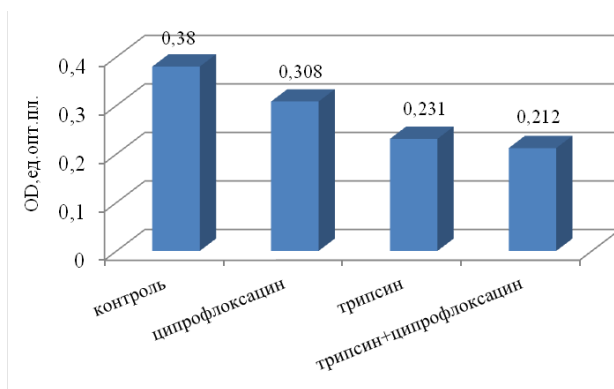


Рис. 1. Био-плёнкообразующая способность бактерий *Staphylococcus* spp. Здесь и на рис. 3,4: по оси абсцисс - препарат; по оси ординат - оптическая плотность.

Изменения в морфологии био-плёнки, наблюдаемые с помощью световой микроскопии, представлены на рис. 2, а – г. В контроле практически вся поверхность покровного стекла покрыта плёнкой (рис 2, а). После обработки ципрофлоксацином, матрикс био-плёнки становился более разреженным (рис. 2, б). При воздействии трипсином био-плёночный матрикс становился рыхлым, увеличивалась площадь и количество пустот в матриксе, появлялись отдельно лежащие клетки (рис. 2, в). Совместное действие трипсином и ципрофлоксацином вело к частичной деградации био-плёнки, рассеиванию и уменьшению площади её матрикса (рис. 2, г).

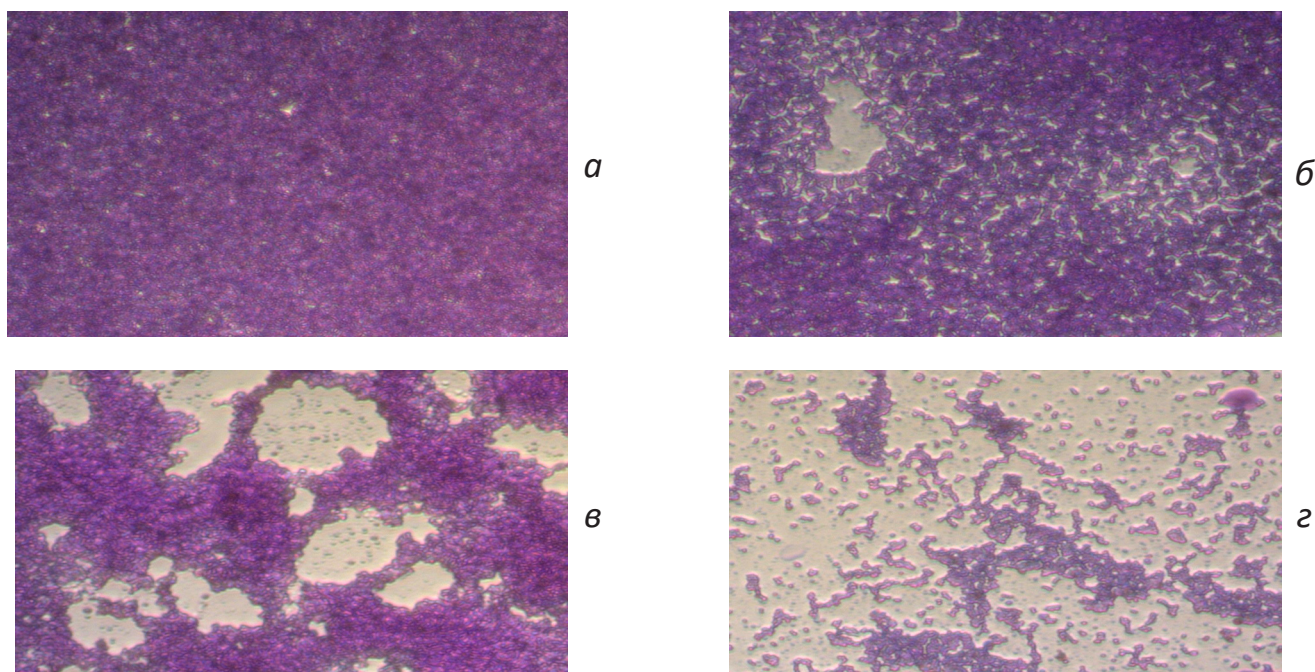


Рис. 2. Морфология био-плёнки, образованной клиническим штаммом MRSE на поверхности покровного стекла. а - морфология био-плёнки через 72 ч; б - морфология 48-часовой био-плёнки через 24 ч после обработки ее поверхности раствором ципрофлоксацина в дозе 2 мг/мл.; в - морфология 48-часовой био-плёнки через 24 ч после обработки ее поверхности трипсином в дозе 2 мг/мл; г - морфология 48-часовой био-плёнки через 24 ч после обработки ее поверхности трипсином и ципрофлоксацином. Световая микроскопия, об. x40. Окраска генциановым фиолетовым.

Ципрофлоксацин незначительно снижал активность биоплёнкообразования чувствительных к нему штаммов (рис. 3.). Трипсин оказывал бактериостатическое действие, снижая уровень биоплёнкообразования как чувствительных, так и резистентных к ципрофлоксацину штаммов в 1,7 и 1,4 раза соответственно. При сочетанном действии трипсина и ципрофлоксацина активность биоплёнкообразования чувствительных к препарату штаммов составляла 0,189 (0,171; 0,247) ед. опт. пл., резистентных штаммов - 0,257 (0,201; 0,259) ед. опт. пл.

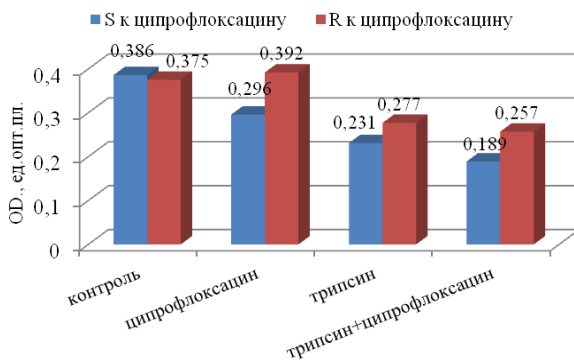


Рис. 3. Активность биоплёнкообразования бактерий *Staphylococcus* spp. в зависимости от чувствительности к ципрофлоксацину.

90% исследуемых штаммов обладали высокоадгезивными свойствами. Ципрофлоксацин не ингибировал биоплёнкообразование клиническими изолятами *S. aureus*, но бактериостатически действовал на рост биоплёнок, образованных штаммами *S. haemolyticus* ($p=0,006$) и *S. epidermidis* ($p=0,005$) по сравнению с контролем (рис. 4.). Трипсин не оказывал ингибирующего действия на *S. haemolyticus*, в то же время снижал активность биоплёнкообразования штаммами *S. aureus* ($p=0,00004$) и *S. epidermidis* ($p=0,02$). Результатом сочетанного действия ципрофлоксацина и трипсина стало снижение интенсивности биоплёнкообразования всех исследуемых штаммов стафилококков в 1,5-2,2 раза.

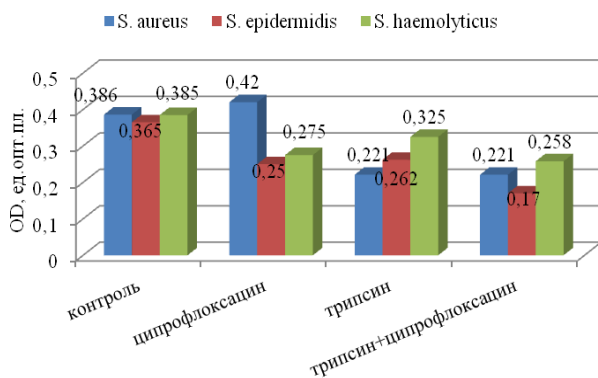


Рис. 4. Влияние трипсина и ципрофлоксацина на активность биоплёнкообразования штаммами *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*.

Одной из актуальных задач фармакологии на сегодняшний день является разработка препаратов, ингибирующих рост бактериальной плёнки, либо способствующих её разрушению [9, 11-13]. Биоплёнка - сложно организованные сообщества бактерий, окруженные биополимерным матриксом, служащим защитой от внешних воздействий [5-8]. Экспериментально доказано, что планктонные формы стафилококков в течение 2-4 часов образуют прочно присоединенные микроколонии, после чего вовлекаются в полноценные биоплёнки, процесс формирования которых занимает, в среднем, 2-4 дня [17]. Резистентность микроорганизмов биоплёнки может быть обусловлена ограниченным проникновением АМП в матрикс, экспрессией невыявленных генов резистентности, образованием клеток-персистеров, на которые АМП не действуют, и другими факторами [10, 18].

Механическое удаление считается наилучшим способом уменьшения биомассы, однако в виду сложной визуализации биоплёнки, до сих пор не определён наиболее эффективный для этого метод [18]. Среди других способов - применение дезинфектантов, которые могут как стимулировать, так и разрушать матрикс биоплёнки [19]. Применение биоцидов, проникающих внутрь биоплёнки и подавляющих рост микроорганизмов, активно изучается в настоящее время [20]. Имеются данные о способности ферментов разрушать матрикс биоплёнки [11-13]. Показана высокая эффективность трипсина в отношении биоплёнок *S. aureus* - *P. aeruginosa*, по сравнению с другими ферментами [21]. Установлено, что выраженность деградации биоплёнки от трипсина зависит от его концентрации и длительности воздействия [22]. Поскольку матрикс биоплёнки способствует развитию устойчивости к АМП, предполагают, что освободившиеся после деградации планктонные клетки будут более чувствительны к АМП. Получены и противоположные результаты, согласно которым ферменты как снижают, так и усиливают антимикробную активность АМП [21, 23]. Показан эффект от воздействия пектиназы и субтилизина на биоплёночную форму *Escherichia coli*, химотрипсина на биоплёнки *Staphylococcus aureus* [14]. Идентифицировано соединение QQ-2, оказывающее ингибирующее действие на формирование биоплёнки грамположительными бактериями [24]. Для разрушения матрикса биоплёнки нами использован протеолитический фермент - трипсин. Согласно полученным данным, трипсин при сочетанном действии с ципрофлоксацином способствует снижению интенсивности биоплёнкообразования штаммами стафилококков.

Заключение. Эффективность комбинированной терапии против биоплёночных форм бактерий в хронических ранах не изучена. Применение ферментов, разрушающих межклеточный матрикс биоплёнки, способствует переходу микроорганизмов в планктонную форму, что повышает эффективность проводимой антибиотикотерапии и может позволить снизить сроки санации хронических ран.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 7, 13, 15, 21 - 24 см. REFERENCES)

1. Шипицына И.В., Осипова Е.В. Мониторинг ведущей грамположительной микрофлоры и ее антибиотикочувствительности у лиц с хроническим остеомиелитом за трехлетний период. *Гений ортопедии*. 2022; 28(2): 189-93. DOI: 10.18019/1028-4427-2022-28-2-189-193.
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.
3. Бурнашов С.И., Шипицына И.В., Осипова Е.В. Микрофлора операционных ран и свищей у пациентов с хроническим остеомиелитом большеберцовой кости до реконструктивного лечения, при рецидиве инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(10): 627-31.
4. Окулич В.К., Кабанова А.А., Сенькович С.А., Плотников Ф.В. Резистентность к антибиотикам госпитальных изолятов золотистого стафилококка, образующих биопленку. *Здравоохранение (Минск)*. 2015; 7:11-6.
5. Корниенко М.А., Копыльцов В.Н., Шевлягина Н.В., Диденко Л.В., Любасовская Л.А., Припутневич Т.В., и др. Способность стафилококков различных видов к образованию биопленок и их воздействию на клетки человека. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016; 34(1): 18-25.
6. Шлепотина Н.М., Плоткин Л.Л., Белов В.В. Микробиологическое и клиническое значение биопленочных инфекций (обзор литературы). *Гинекология*. 2014; 4(118): 106-12.
7. Савилов Е.Д., Анганова Е.В., Носкова О.А., Духанина А.В. Бактериальные биоплёнки при гнойно-септических инфекциях. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 38-42. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.6.
8. Сухина М.А., Калашникова И.А., Кашников В.Н., Веселов А.В., Михалева В.И., Пиядина А.Ю. Влияние антибактериальных веществ на рост биопленки клинических изолятов. *Колопроктология*. 2018; 2(64): 78-84.
9. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2012; 14(1): 51-8.
10. Степанова Т.В., Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Навольнев С.О., Навольнева О.С., Гинцбург А.Л. Разработка средств борьбы с биопленками: изучение воздействия полисахаридных лиаз на матрикс биопленок, образуемых *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cenocepacia*. *Медицинский алфавит*. 2010; 1(2): 47-51.
11. Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Балабанова Л.А., Голотин В.А., Белик А.А., Бакунина И.Ю. и др. Влияние ферментов на формирование бактериальных биопленок. *Здоровье. Медицинская экология*. Наука. 2015; 1. 60(2): 86-94.
12. Тризна Е.Ю., Байдамшина Д.Р., Холявка М.Г., Шарафутдинов И.С., Хаирутдинова А.Р., Хафизова Ф.А. и др. Растворимые и иммобилизованные папаин и трипсин-деструкторы бактериальных биопленок. *Гены и клетки*. 2015; 10(3):106-12.
13. 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.
14. Габидова А.Э., Галынкин В.А. Основные начала возникновения резистентности в биосфере. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017; 3(1): 92-102. URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=11407>.
15. Афиногенова А.Г., Даровская Е.Н. Микробные биоплёнки ран: состояние вопроса. *Травматология и ортопедия России*. 2011; 3:119-25.
16. Ковалишена О.В., Алебашина Л.А., Саперкин Н.В. Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* к дезинфектантам: систематический обзор. *Журнал Медиаль*. 2014; 3(13):72-7.

20. Тец Г.В., Артеменко Н.К., Янковский Г.М., Кевер Л.В., Комиссарчик Я.Ю., Тец В.В. Действие антимикробного препарата «Мультицид» на биоплёнки стафилококка. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 163(6): 746-50.

REFERENCES

1. Shipitsyna I.V., Osipova E.V. Monitoring of the leading gram-positive microflora and its antibiotic sensitivity in patients with chronic osteomyelitis over a three-year period. *Geniy ortopedii*. 2022; 28(2): 189-93. DOI: 10.18019/1028-4427-2022-28-2-189-193. (in Russian)
2. Mironov S.P., Tsiskarashvili A.V., Gorbatyuk D.S. Chronic post-traumatic osteomyelitis as a problem of modern traumatology and orthopedics (literature review). *Geniy ortopedii*. 2019; 25(4): 610-21. (in Russian)
3. Burnashov S.I., Shipitsyna I.V., Osipova E.V. Microflora of surgical wounds and fistulas in patients with chronic osteomyelitis of the tibia before reconstructive treatment, in case of recurrence of infection. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(10): 627-31. (in Russian)
4. Okulich V.K., Kabanova A.A., Senkovich S.A., Plotnikov F.V. Antibiotic resistance of hospital isolates of *Staphylococcus aureus* forming a biofilm. *Zdravookhraneniye (Minsk)*. 2015; 7: 11-6. (in Russian)
5. Kornienko M.A., Kopyltsov V.N., Shevlyagina N.V., Didenko L.V., Lyubasovskaya L.A., Priputnevich T.V. et al. The ability of *Staphylococci* of various species to form biofilms and their effect on human cells. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2016; 34(1): 18-25. (in Russian)
6. Shlepotina N.M., Plotkin L.L., Belov V.V. Microbiological and clinical significance of biofilm infections (literature review). *Ginekologiya*. 2014; 4(118): 106-12. (in Russian)
7. Schilcher K., Horswill A.R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2020 Aug 12; 84(3): e00026-19. DOI: 10.1128/MMBR.00026-19.
8. 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)
9. Sukhina M.A., Kalashnikova I.A., Kashnikov V.N., Veselov A.V., Mikhalevskaya V.I., Piyadina A.Yu. Effect of antibacterial agents on biofilm growth of clinical isolates. *Koloproktologiya*. 2018; 2(64): 78-84. (in Russian)
10. Chebotar' I.V., Mayansky A.N., Konchakova E.D., Lazareva AV., Chistyakova V.P., Lazareva A.V., Chistyakova V.P. Antibiotic resistance of biofilm bacteria. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2012; 14(1): 51-8. (in Russian)
11. Stepanova T.V., Romanova Yu.M., Alekseeva N.V., Navolnev S.O., Navolneva O.S., Gintsburg A.L. Development of biofilm control agents: study of the effect of polysaccharide lyases on the matrix of biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *Meditinskiy alfavit*. 2010; 1(2): 47-51. (in Russian)
12. Terent'eva N. A., Timchenko N. F., Balabanova L. A., Golotin V.A., Belik A.A., Bakunina I.Yu. et al. Influence of enzymes on the formation of bacterial biofilms. *Zdorov'ye. Meditsinskaya ekologiya*. 2015; 1. 60(2): 86-94. (in Russian)
13. Thallinger B., Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S. Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol. J.* 2013; 8: 97-109.
14. Trizna E.Yu., Baidamshina D.R., Kholyavka M.G., Sharafutdinov I.S., Khairutdinova A.R., Khafizova F.A. et al. Soluble and immobilized papain and trypsin-destructors of bacterial biofilms. *Geny i kletki*. 2015; 10(3): 106-12. (in Russian)
15. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second information supplement. CLSI document M100-S22. Wayne P.A. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
16. 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. (in Russian)
17. Gabidova A.E., Galynkin V.A. The main beginnings of the emergence of resistance in the biosphere. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2017; 3(1): 92-102. URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=11407>. (in Russian)
 18. Afinogenova A.G., Darovskaya E.N. Microbial biofilms of wounds: state of the art. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2011; 3:119-25. (in Russian)
 19. Kovalishena O.V., Alebashina L.A., Saperkin N.V. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to disinfectants: a systematic review. *Zhurnal MediAl'*. 2014; 3(13): 72-7. (in Russian)
 20. Tets G.V., Artemenko N.K., Yankovsky G.M., Keвер L.V., Komissarchik Ya.Yu., Tets V.V. The effect of the antimicrobial drug "Multicide" on *Staphylococcus* biofilms. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2017; 163(6): 746-50. (in Russian)
 21. Fanaei Pirlar R., Emaneini M., Beigverdi R., Banar M.B., van Leeuwen W., Jabalameli F. Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the woundlike medium. *PLoS ONE*. 2020; 15(6): e0235093. DOI: 10.1371/journal.pone.0235093.
 22. Zhou J., Meng X.H., Han Q.C., Huang Y.X., Huo L.J., Lei Y.Y. An *in vitro* study on the degradation of multispecies biofilm of periodontitis-related microorganisms by bovine trypsin. *Front. Microbiol.* 2022; 13:951291. DOI: 10.3389/fmicb.2022.951291.
 23. Waryah C.B., Wells K., Ulluwishewa D., Chen-Tan N., Gogoi-Tiwari J., Ravensdale J. et al. *In vitro* antimicrobial efficacy of tobramycin against *Staphylococcus aureus* biofilms in combination with or without DNase I and/or dispersin B: a preliminary investigation. *Microbial. Drug. Resistance*. 2017; 23(3): 384-90. DOI: 10.1089/mdr.2016.0100 PMID: 27754780.
 24. Weiland-Bräuer N., Kisch M.J., Pinnow N., Liese A., Schmitz R.A. Highly effective inhibition of biofilm formation by the first metagenome-derived AI-2 quenching enzyme. *Front Microbiol.* 2016; 7:1098. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01098.