

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредители:

Синопальников А.И.; Пискунов Г.Г.; Козлов Р.С.; Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)

Главный редактор:
Синопальников А.И.

Адрес редакции:

214019, Смоленская обл., г. Смоленск, ул. Кирова, д. 46А

Эл. почта: info@cmac-journal.ru

Адрес для корреспонденции:

214019, г. Смоленск, а/я 5.

Тел./факс: +7(4812)45-06-02

Издатель МАКМАХ:

214019, г. Смоленск,

ул. Кирова 46А. www.iacsmac.ru

Адрес типографии:

214020, Россия, г. Смоленск,

ул. Смольянинова, д. 1

Электронная версия журнала:

https://cmac-journal.ru

Подписка на сайте издателя:

https://service.iacsmac.ru

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

Запись в реестре зарегистрированных СМИ: ПИ № ФС 77 – 86269 от 27.11.2023

Не распространяется через предпринятия связи Тираж 3000 экз.

Свободная цена

Дата выхода – 19.05.2025

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 №436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

Иллюстрация для обложки предоставлена: Ольга Николаевна Пинегина (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России)

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2024.

Содержание

Болезни и возбудители

Миронов К.О., Гапонова И.И., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Шеленков А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Платонов А.Е., Козлов Р.С., Акимкин В.Г.

- 396** Определение серотипов *Streptococcus pneumoniae*, вызывающих инвазивные и неинвазивные формы инфекций, с использованием высокопроизводительного секвенирования

Бубман Л.И., Тополянская С.В., Рачина С.А., Гладких М.А., Усова Т.В., Карпов В.В., Молочников А.Ю., Нечаев А.И., Хан С.О., Эмомадов А.М., Захаров Н.С., Харченко Е.И., Лыткина К.А., Марченко И.П., Буриев И.М., Мелконян Г.Г.

- 401** Микробный пейзаж при исследовании ран у пациентов с боевыми травмами конечностей

Васильева И.А., Панова А.Е., Грачева А.Н., Байракова А.Л., Казюлина А.А., Елисеев П.И., Самойлова А.Г.

- 411** Видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий, выделенных у пациентов ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России в «доковидный» период и во время пандемии COVID-19

Максимова Е.А., Кузьменков А.Ю., Лямин А.В., Козлов А.В., Кондратьева Е.И., Кондратенко О.В.

- 417** Возможности использования онлайн-регистратора AMRcf у пациентов с муковисцидозом

Арсеньева А.А., Лямин А.В., Мигачёва Н.Б., Орлов Е.В., Алексеев Д.В.

- 426** Микрoэкологические аспекты взаимосвязи кожной микробиоты и псориаза

Антимикробные препараты

Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Козлов Р.С.

- 439** Разработка критериев интерпретации и оценки качества результатов определения чувствительности представителей порядка Enterobacterales и *Pseudomonas aeruginosa* к цефепиму-сульбактаму

Гамаюнов Д.Ю., Калягин А.Н., Орлова Г.М., Балабина Н.М., Синькова Г.М., Синьков А.В.

- 452** Применение фторхинолонов в лечении внебольничной пневмонии и их кардиотоксические эффекты

Антибиотикорезистентность

Васильева И.А., Панова А.Е., Тинькова В.В., Грачева А.Н., Казюлина А.А., Елисеев П.И., Байракова А.Л., Самойлова А.Г.

- 462** Антибиотикорезистентность *Mycobacterium avium* в период пандемии COVID-19

Опыт работы

Косилова И.С., Домотенко Л.В., Храмов М.В.

- 470** Организация производства отечественного бульона Мюллера-Хинтон

Комягина Т.М., Тряпочкина А.С., Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Горинова Ю.В., Симонова О.И.

- 480** Популяционная структура и молекулярно-генетическая характеристика штаммов

Streptococcus pneumoniae, выделенных от детей с хронической бронхолегочной патологией

Козлов Р.С., Тапальский Д.В., Карпова Е.В., Петровская Т.А., Куркова А.А.

- 487** Микробиологическая активность бовгиалуронидазы азоксимера в отношении микробных биопленок

Новикова И.Е., Садеева З.З., Самойлова Е.А., Карасева О.В., Янюшкина О.Г., Лазарева А.В.

- 496** Характеристика парных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, полученных от детей

Белова И.В., Широкова И.Ю., Точилина А.Г., Ковалишена О.В., Белянина Н.А., Тулупов А.А., Молодцова С.Б., Селиверстов А.Н., Кропотов В.С., Соловьева И.В.

- 505** Исследование антимикробного действия супернатанта *Lactiplantibacillus plantarum* 8P-A3 на госпитальные штаммы *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*

Видманова М.В., Жестков А.В., Лямин А.В., Исмагуллин Д.Д., Шеститко Е.Ю., Решетникова В.П.

- 514** Микробиологическое исследование при коклюше и влияние состава питательной среды на белковое профилирование *Bordetella* spp.

Немченко У.М., Ситникова К.О., Григорова Е.В., Сухорева М.В., Белькова Н.Л., Чемезова Н.Н., Савилов Е.Д.

- 522** Формирование биопленок клиническими изолятами условно-патогенных микроорганизмов под влиянием дезинфицирующих средств

Описание клинических случаев

Хостелиди С.Н.

- 529** Опыт применения изавуконозола для лечения мукормикоза: описание клинического случая и анализ данных регистра

Микробиологическая активность бовгиалуронидазы азоксимера в отношении микробных биопленок

Козлов Р.С.¹, Тапальский Д.В.², Карпова Е.В.³, Петровская Т.А.³, Куркова А.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, Смоленск, Россия

² ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

³ УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

Контактный адрес:

Дмитрий Викторович Тапальский
Эл. почта: tapalskiy@yandex.ru

Ключевые слова: бовгиалуронидаза азоксимер, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, биопленка.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Оценить способность бовгиалуронидазы азоксимера вызывать деструкцию биопленок, сформированных выделенными от пациентов клиническими штаммами микроорганизмов.

Материалы и методы. В исследование было включено 50 клинических штаммов *Staphylococcus aureus* (25 штаммов), *Staphylococcus epidermidis* (6), *Enterococcus faecalis* (8), *Escherichia coli* (9), *Candida albicans* (2). Оценку интенсивности образования микробных биопленок в присутствии антибиотиков, бовгиалуронидазы азоксимера и их комбинаций выполняли в 96-луночных планшетах в бульоне Мюллера-Хинтона и сердечно-мозговом бульоне с фиксацией биопленок 2,5% раствором глутаральдегида, окрашиванием 0,25% раствором кристаллического фиолетового и экстракцией красителя 33% раствором уксусной кислоты.

Результаты. Бовгиалуронидаза азоксимер в концентрациях 64–1000 МЕ/мл способен *in vitro* эффективно разрушать матрикс предварительно сформированных биопленок метициллинорезистентных штаммов *S. aureus*, а также *S. epidermidis*, *E. coli*, *C. albicans*, оказывая при этом дозозависимый эффект.

Выводы. При сочетанном воздействии с антибиотиками на микробные биопленки, сформированные микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью, бовгиалуронидаза азоксимер будет потенцировать антимикробные эффекты, разрушая экзополисахаридный матрикс и облегчая проникновение антибиотиков к клеточным мишеням.

Original Article

Microbiological activity of bovhialuronidaze azoximer against microbial biofilms

Kozlov R.S.¹, Tapalski D.V.², Karpova E.V.³, Petrovskaya T.A.³, Kurkova A.A.¹

¹ Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

² Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

³ Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Contacts:

Dmitry V. Tapalski
E-mail: tapalskiy@yandex.ru

Key words: bovhialuronidaze azoximer, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, biofilm.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To evaluate the ability of bovhialuronidaze azoximer to destroy biofilms formed by clinical strains of microorganisms.

Materials and methods. The study included 50 clinical strains of *Staphylococcus aureus* (n = 25), *Staphylococcus epidermidis* (n = 6), *Enterococcus faecalis* (n = 8), *Escherichia coli* (n = 9), *Candida albicans* (n = 2). Antimicrobial susceptibility testing was performed using broth microdilution method. Biofilm formation culturing in presence of antibiotics, or bovhialuronidaze azoximer, or their combinations was assessed in Mueller-Hinton broth and brain heart broth in 96-well plates. Biofilms were fixed with 2,5% glutaraldehyde solution, stained with 0,25% crystal violet solution, which is extracted by 33% acetic acid solution.

Results. Bovhialuronidaze azoximer can destroy the matrix of preformed biofilms of methicillin-resistant strains of *S. aureus* as well as *S. epidermidis*, *E. coli*, *C. albicans* in concentrations of 64–1000 IU/ml, while exerting a dose-depend effective.

Conclusions. Bovhialuronidaze azoximer combining with antibiotics will potentiate its antimicrobial effects by destroying the microbial biofilm matrix formed by microorganisms with multidrug resistance and facilitating the penetration of antibiotics to cellular targets.

Введение

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* – частые возбудители инфекций человека. Около 80% инфекций мочевыводящих путей (МВП) вызывает *E. coli*. Особенностью указанных микроорганизмов является их выраженная способность образовывать моно- и полимикробные биопленки как на эпителиальных клетках МВП, так и на различных медицинских устройствах (имплантатах, катетерах) [1].

Предполагается, что острые инфекции связаны преимущественно с планктонными клетками микроорганизмов, которые обычно поддаются лечению антибиотиками (АБ) в случае наличия *in vitro* чувствительности. Однако в тех случаях, когда бактериям удается сформировать биопленку в макроорганизме, инфекция переходит в хроническую форму и часто приобретает устойчивость к стандартным схемам терапии. Примечательно, что от 65 до 80% хронических бактериальных инфекций вызываются микроорганизмами, формирующими биопленки [2].

Биопленка – микробное сообщество, характеризующееся тем, что бактерии, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, и демонстрируют изменение фенотипа, выражающееся в изменении параметров роста и экспрессии специфических генов [3]. В химическом отношении матрикс биопленки неоднороден и различается у разных микроорганизмов. Внеклеточный слой содержит до 40–95% полисахаридов. Концентрация других химических компонентов сильно варьирует. Доля белков может составлять до 60%, липидов – до 40% и нуклеиновых кислот – до 20%. Данные соединения находятся в гидратированном состоянии, т.к. 80–90% объема биопленки занимает вода [4]. Матрикс препятствует проникновению лекарственных средств внутрь биопленки, и таким образом защищает входящие в ее состав микробные клетки от внешних летальных воздействий. Микроорганизмы в составе биопленок устойчивы к высоким концентрациям АБ, которые могут в 10–1000 раз превышать концентрации, подавляющие обычные клетки в культуральной среде, в связи с чем эффективность большинства режимов санации оказывается недостаточной [5]. Основными механизмами повышения устойчивости бактерий к АБ в биопленках являются ограничение проникновения АБ через полимерный матрикс биопленки, инактивация АБ внеклеточными полимерами или ферментами, замедление метаболизма с последующим уменьшением количества мишеней для противомикробных препаратов, экспрессия возможных генов резистентности и возникновение в биопленке микроорганизмов-персистентов [6, 7].

Одним из подходов к терапии ассоциированных с микробными биопленками инфекций является использование ферментов, расщепляющих компоненты матрикса. Установлена способность ряда протеолитических и сахаролитических ферментов вызывать деструкцию био-

пленок. Ограничением использования ферментов в комплексной антибактериальной терапии является их низкая стабильность во внутренней среде организма, связанная с быстрым протеолизом и инактивацией многочисленными ингибиторами. В ряде исследований показана способность гиалуронидазы разрушать компоненты матрикса биопленки [8, 9].

Гиалуронидаза быка, конъюгированная с высокомолекулярным носителем (бовгиалуронидаза азоксимер) способна расщеплять компоненты матрикса микробных биопленок и более продолжительное время сохранять активность в биологических средах организма [10].

Цель исследования

Оценить способность бовгиалуронидазы азоксимера вызывать деструкцию биопленок, сформированных выделенными от пациентов клиническими штаммами микроорганизмов.

Материалы и методы

В исследование было включено 50 клинических изолятов *S. aureus* ($n = 25$), *S. epidermidis* ($n = 6$), *E. faecalis* ($n = 8$), *E. coli* ($n = 9$), *C. albicans* ($n = 2$), выделенных из материала госпитализированных и амбулаторных пациентов с бактериальными инфекциями в Республике Беларусь (Гомель) и Российской Федерации (Таблица 1). Первичная идентификация была выполнена в локальных микробиологических лабораториях с использованием автоматических микробиологических анализаторов. До проведения исследований штаммы подвергались криоконсервации и хранились в сердечно-мозговом бульоне с добавлением 30% глицерина при температуре -62°C . В исследование были также включены 3 контрольных штамма: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *C. albicans* ATCC 10231.

Характеристика ферментных препаратов, включенных в исследование, представлена в Таблице 2.

Исследование было выполнено в соответствии с методикой Stepanovic S. и соавт. [11] с незначительными модификациями. В основе метода лежала способность микроорганизмов формировать биопленку на стенках и дне лунок полистиролового планшета и использование растворов красителей для окрашивания элементов биопленки с последующим учетом результатов. Из чистой 18–24-часовой культуры, выросшей на плотной не-селективной питательной среде (триптон-соевый агар), готовили микробную суспензию в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия. Оптическую плотность суспензии доводили до 0,5 единиц по стандарту мутности МакФарланда (контроль с помощью денситометра DEN-1B, Biosan, Латвия), что соответствует $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. В лунки 96-луночного плоскодонного полистиролового планшета вносили по 150 мкл бульона с сердечно-мозговой вытяжкой («Oxoid»,

Таблица 1. Изоляты микроорганизмов, выделенные от амбулаторных и госпитализированных пациентов

Микроорганизм	Количество штаммов	Место выделения	Примечания
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	Российская Федерация	метициллинорезистентные штаммы от госпитализированных пациентов, коллекция НИИ антимикробной химиотерапии
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	Республика Беларусь (г. Гомель)	штаммы от амбулаторных и госпитализированных пациентов
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	Республика Беларусь (г. Гомель)	штаммы от амбулаторных и госпитализированных пациентов с бактериальными инфекциями мочевыделительной системы
<i>Escherichia coli</i>	9	Республика Беларусь (г. Гомель)	штаммы от амбулаторных и госпитализированных пациентов с бактериальными инфекциями мочевыделительной системы
<i>Candida albicans</i>	2	Республика Беларусь (г. Гомель)	штаммы от амбулаторных пациентов с бактериальными инфекциями мочевыделительной системы

Таблица 2. Ферментные препараты, включенные в исследование

Название препарата	Форма выпуска	Серия и дата изготовления	Изготовитель
Бовгиалуронидаза азоксимер (Лонгидаза®) – 3000 МЕ	лиофилизат для приготовления раствора для инъекций	150923 (сентябрь 2023)	ООО «НПО Петровакс Фарм», г. Подольск, Российская Федерация
Лидаза-Белмед 725 МЕ	порошок лиофилизированный для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения	060623 (июнь 2023)	РУП «Белмедпрепараты», г. Минск, Республика Беларусь

Великобритания) и 1 мкл бактериальной суспензии. Таким образом, итоговая стартовая концентрация микробных клеток в бульоне составила 10^6 КОЕ/мл. Исследование выполняли в 3 повторах, на один изолят отводили 3 лунки ряда. Отрицательным контролем служили лунки с 150 мкл бульона с сердечно-мозговой вытяжкой без бактерий. Планшеты закрывали крышками и инкубировали при 35°C в течение 48 ч.

После инкубации лунки четырехкратно промывали при помощи автоматической мойки, вносили по 150 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл. Биопленку фиксировали путем добавления в лунки по 160 мкл 2,5% раствора глутаральдегида (экспозиция в течение 5 минут). Планшет четырехкратно промывали, используя по 200 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл, после чего вносили по 180 мкл 0,25% раствора кристаллического фиолетового на 5 минут. Планшет снова четырехкратно промывали, используя по 200 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл, и высушивали в течение 10 минут. Для экстракции сорбированного красителя из биопленки в лунки добавляли по 200 мкл 33% раствора уксусной кислоты, экспозиция при комнатной температуре 10 минут. Планшет помещали в многофункциональный микропланшетный ридер Infinite M200 (TECAN, Швейцария), где при длине волны 570 нм определяли оптическую плотность (OD) в лунках.

Значение оптической плотности биопленки (ОПБ) рассчитывали по формуле (1):

$$\text{ОПБ} = \frac{(\text{ОП}_1 + \text{ОП}_2 + \text{ОП}_3 - \text{ОП}_{к1} - \text{ОП}_{к2} - \text{ОП}_{к3})}{3} \quad (1),$$

где ОПБ – оптическая плотность биопленки; ОП₁, ОП₂ и ОП₃ – оптическая плотность лунок с тестируемым штаммом; ОП_{к1}, ОП_{к2} и ОП_{к3} – оптическая плотность лунок контроля.

Из суточных культур исследуемых микроорганизмов в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия готовили суспензии с оптической плотностью 0,5 МакФарланд (контроль с помощью денситометра DEN-1B, Biosan, Латвия), что соответствует $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Полученные суспензии добавляли в бульон с сердечно-мозговой вытяжкой для получения концентрации 10^6 КОЕ/мл. По 500 мкл инокулированного бульона переносили в лунки 24-луночного культурального планшета для адгезивных культур (TC-treated) и инкубировали при 35°C в течение 48 ч. в статических условиях.

После инкубации бульон осторожно удаляли, лунки однократно промывали 500 мкл стерильного изотонического раствора хлорида натрия, и затем вносили 500 мкл бульона с сердечно-мозговой вытяжкой, содержащего бовгиалуронидазу азоксимер (Лонгидаза®) в концентрациях 1000, 250 и 64 МЕ/мл. В качестве препарата сравнения использовали гиалуронидазу (Лидаза-Белмед) в аналогичных концентрациях. Выполняли инкубацию при 35°C в течение 24 ч., после

чего проводили анализ истощения конго красного. Для количественной оценки количества внеклеточного матрикса биопленок суспензию из лунок осторожно удаляли. В лунки вносили по 300 мкл водного раствора конго красного (Sigma-Aldrich, Art. С6767) с концентрацией 80 мг/л. Выполнили многократное интенсивное пипетирование содержимого лунки для механического отслаивания микробной биопленки. Далее планшеты инкубировали с красителем в течение 90 мин при температуре 35°C. По 300 мкл содержащих окрашенные биопленки суспензий переносили в микроцентрифужные пробирки и центрифугировали их в течение 5 мин при 4400 об/мин.

После центрифугирования по 100 мкл супернатанта из каждой пробирки переносили в лунки 96-луночного плоскодонного полистиролового планшета. Измеряли содержание красителя в многофункциональном микропланшетном ридере Infinite M200 (TECAN, Швейцария) при 490 нм. В качестве контрольного образца использовали водный раствор конго красного с концентрацией 80 мг/л.

Результаты выражали в оптических единицах конго красного, адсорбированного из раствора при окрашивании биопленок. Исследование выполняли в трех повторях. Статистическая значимость результатов оценивалась с использованием теста Краскела-Уоллиса с порогом значимости при $p < 0,05$.

Результаты

Интенсивность образования микробных биопленок штаммами *Staphylococcus aureus*

Свойство формировать биопленки было выявлено у всех включенных в исследование метициллинорезистентных штаммов *S. aureus* (Таблица 3). Значения ОПБ составили для них (Ме; LQ-UQ) 0,212; 0,079-0,336.

Контрольный штамм *S. aureus* ATCC 29213 характеризовался низкой биопленкообразующей способностью (значение ОПБ 0,084). Для дальнейшего исследования отобрано 6 штаммов с наибольшей способностью к биопленкообразованию (ОПБ > 0,4; расчетная масса микробной биопленки более 50 мкг/лунку).

Влияние бовгиалуронидазы азоксимера на матрикс сформированных биопленок *Staphylococcus aureus*

Для подтверждения разрушения матрикса сформированных при предварительной 48-часовой инкубации биопленки *S. aureus* был проведен анализ истощения конго красного. Конго красный окрашивает полисахариды и амилоидные структуры, таким образом выраженность адсорбции красителя из раствора является интегральным показателем биомассы экзополисахаридного матрикса биопленки.

Отмечено значительное дозозависимое снижение адсорбции красителя биопленками, обработанными бовгиалуронидазой азоксимером, наиболее выраженное при внесении концентрации 1000 МЕ/мл, что свидетельствует о ферментативном разрушении матрикса био-

Таблица 3. Значения оптической плотности биопленки (ОПБ) для штаммов *S. aureus*

Микроорганизм	Штамм	ОПБ
<i>S. aureus</i>	43113	0,524
<i>S. aureus</i>	43431	0,098
<i>S. aureus</i>	43488	0,292
<i>S. aureus</i>	43570	0,486
<i>S. aureus</i>	44018	0,142
<i>S. aureus</i>	44687	0,401
<i>S. aureus</i>	45579	0,187
<i>S. aureus</i>	45580	0,576
<i>S. aureus</i>	45619	0,022
<i>S. aureus</i>	45620	0,454
<i>S. aureus</i>	47667	0,336
<i>S. aureus</i>	48546	0,215
<i>S. aureus</i>	48566	0,031
<i>S. aureus</i>	48588	0,424
<i>S. aureus</i>	49185	0,079
<i>S. aureus</i>	49684	0,021
<i>S. aureus</i>	1065-15	0,259
<i>S. aureus</i>	876-15	0,248
<i>S. aureus</i>	BC-004	0,293
<i>S. aureus</i>	BC-008	0,212
<i>S. aureus</i>	BC-010	0,019
<i>S. aureus</i>	BC-011	0,134
<i>S. aureus</i>	BC-014	0,039
<i>S. aureus</i>	BC-015	0,146
<i>S. aureus</i>	BC-018	0,185
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	0,084

пленки (Рисунок 1). Дозозависимый эффект разрушения сформированных биопленок был отмечен для всех протестированных штаммов *S. aureus*.

Влияние бовгиалуронидазы азоксимера на матрикс сформированных биопленок *Staphylococcus epidermidis*

Для всех штаммов *S. epidermidis* отмечено снижение адсорбции конго красного биопленками, обработанными бовгиалуронидазой азоксимером в концентрации 250 МЕ/мл или 1000 МЕ/мл, что свидетельствует о ферментативном разрушении матрикса биопленки (Рисунок 2).

Влияние бовгиалуронидазы азоксимера на матрикс сформированных биопленок *Candida albicans*

Отмечено дозозависимое снижение адсорбции красителя биопленками, обработанными бовгиалуронидазой азоксимером, наиболее выраженное при внесе-

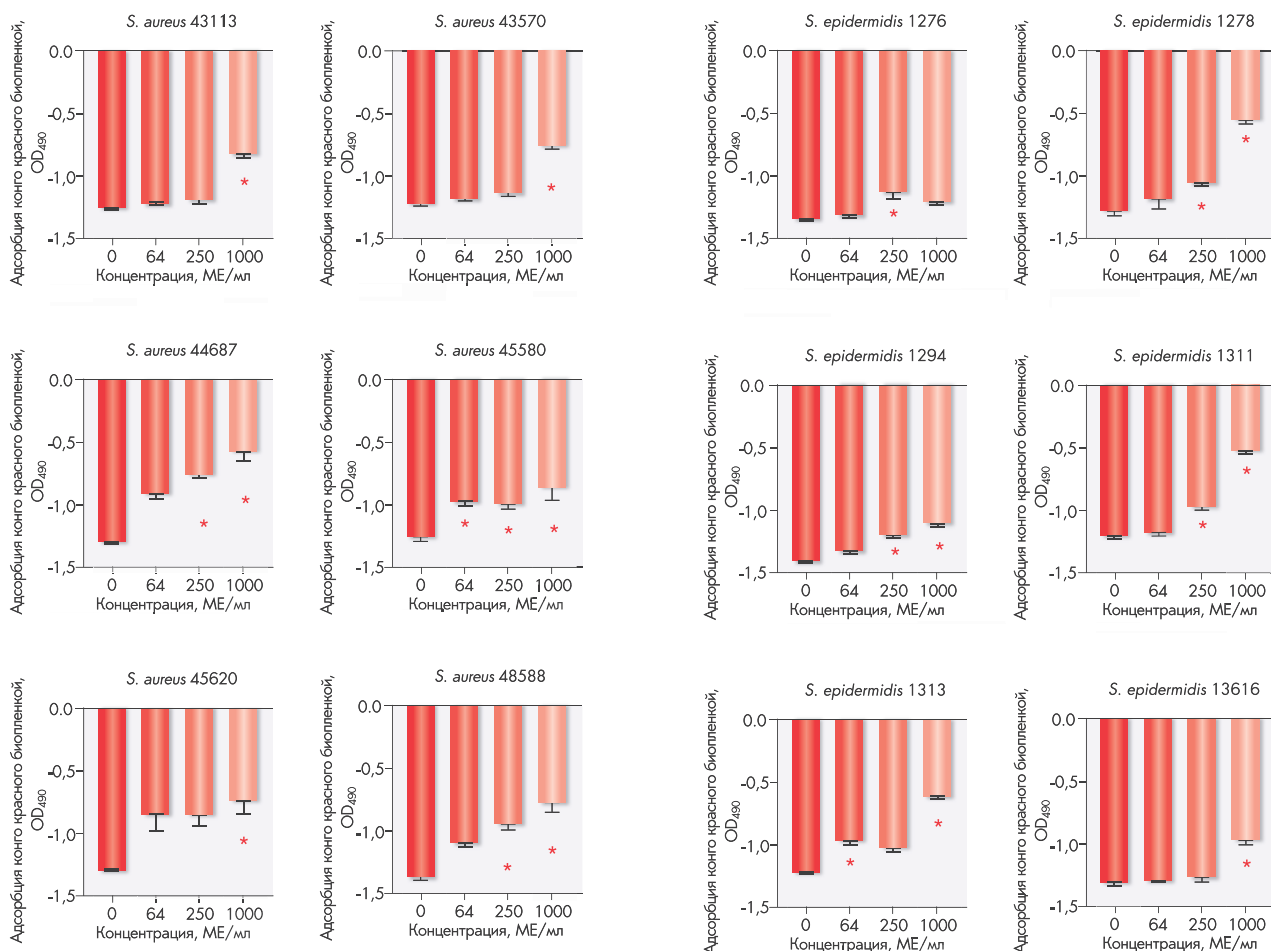


Рисунок 1. Эффект воздействия бовгиалуронидазы азоксимера на матрикс предварительно сформированных биопленок *S. aureus* в тесте истощения (адсорбции из раствора) конго красного.

* Различия статистически значимы в сравнении с контролем ($p < 0,05$, ранговый критерий Краскела-Уоллиса)

Рисунок 2. Эффект воздействия бовгиалуронидазы азоксимера на матрикс предварительно сформированных биопленок *S. epidermidis* в тесте истощения (адсорбции из раствора) конго красного.

* Различия статистически значимы в сравнении с контролем ($p < 0,05$, ранговый критерий Краскела-Уоллиса)

нии концентрации 1000 МЕ/мл, что свидетельствует о ферментативном разрушении матрикса биопленки (Рисунок 3). Дозозависимый эффект разрушения сформированных биопленок был отмечен для всех протестированных штаммов *C. albicans*.

Влияние бовгиалуронидазы азоксимера на матрикс сформированных биопленок *Enterococcus faecalis*

Обработка сформированных *E. faecalis* микробных биопленок бовгиалуронидазой азоксимером не приводило к значимому снижению адсорбции конго красного, что свидетельствует об их стабильности к действию фермента (Рисунок 4).

Влияние бовгиалуронидазы азоксимера на матрикс сформированных биопленок *Escherichia coli*

Отмечено значительное дозозависимое снижение адсорбции красителя биопленками *E. coli*, обработан-

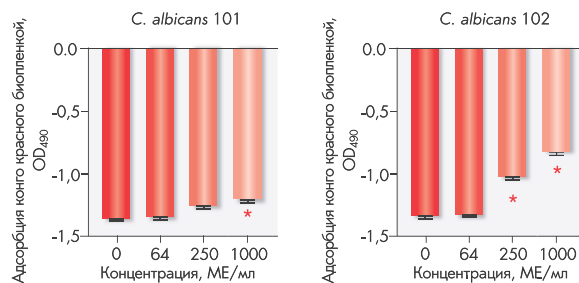


Рисунок 3. Эффект воздействия бовгиалуронидазы азоксимера на матрикс предварительно сформированных биопленок *C. albicans* в тесте истощения (адсорбции из раствора) конго красного.

* Различия статистически значимы в сравнении с контролем ($p < 0,05$, ранговый критерий Краскела-Уоллиса)

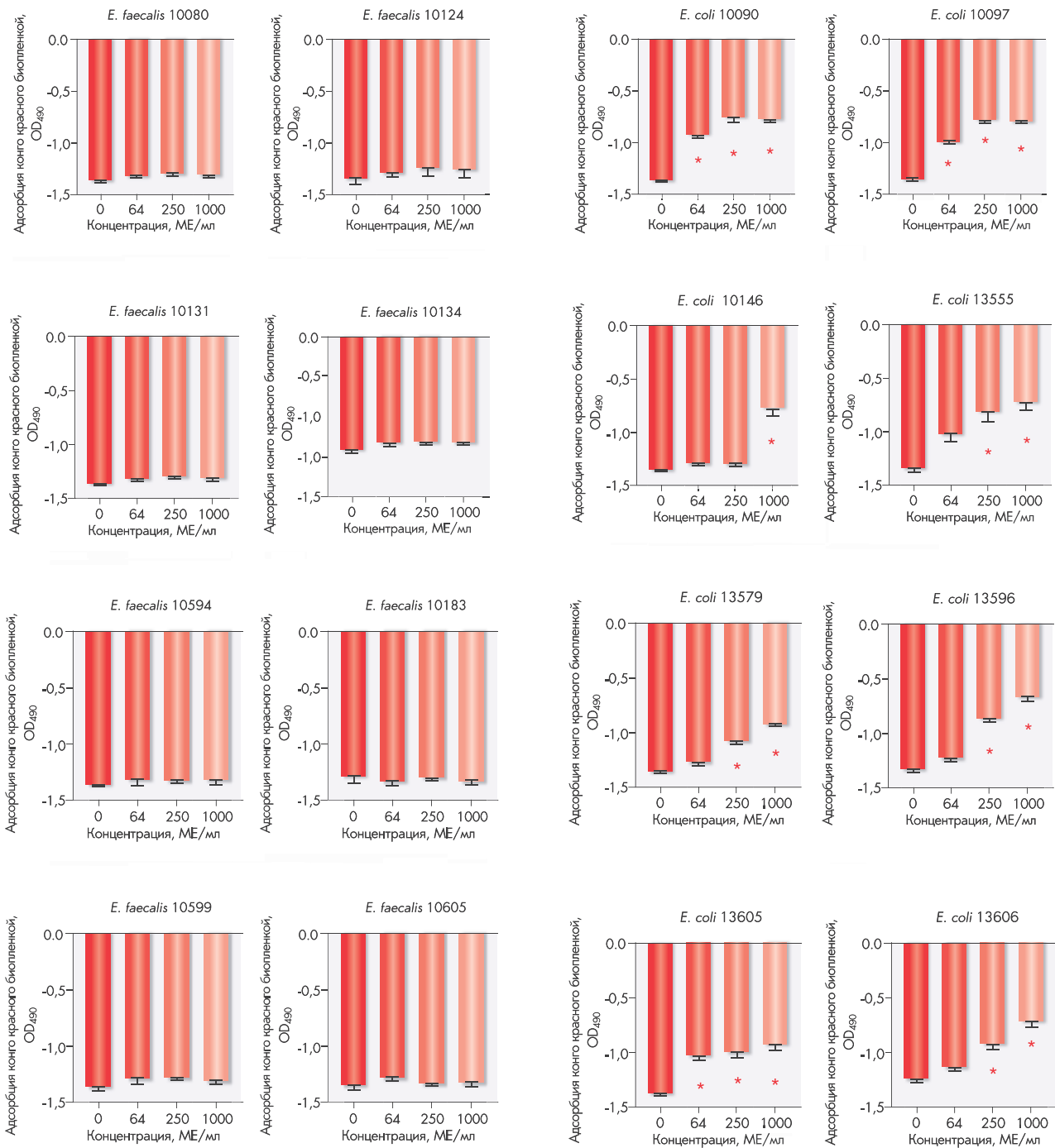
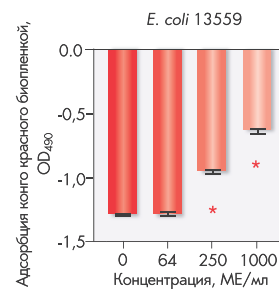


Рисунок 4. Эффект воздействия бовгиалуридазы азоксимера на матрикс предварительно сформированных биопленок *E. faecalis* в тесте истощения (адсорбции из раствора) конго красного

Рисунок 5. Эффект воздействия бовгиалуридазы азоксимера на матрикс предварительно сформированных биопленок *E. coli* в тесте истощения (адсорбции из раствора) конго красного.

* Различия статистически значимы в сравнении с контролем ($p < 0,05$, ранговый критерий Краскела-Уоллиса)



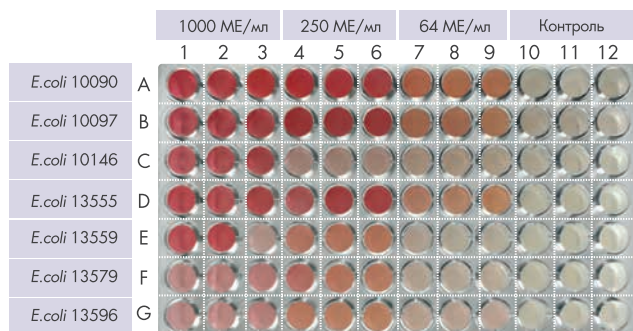


Рисунок 6. Эффект воздействия бовгиалуронидазы азоксимера на матрикс предварительно сформированных биопленок *E. coli* в тесте истощения (адсорбции из раствора) конго красного. Супернатанты после адсорбции красителя в планшете для измерения оптической плотности

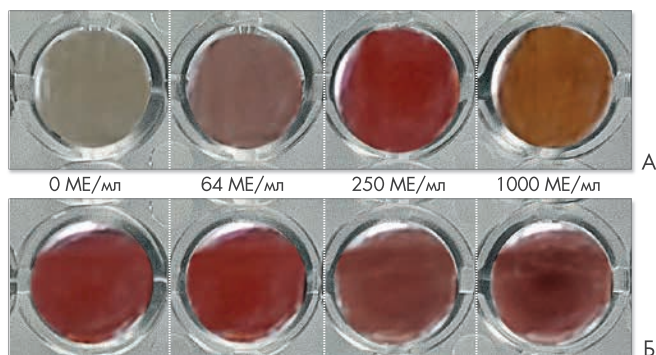


Рисунок 8. Эффект воздействия бовгиалуронидазы азоксимера (А) и гиалуронидазы (Б) на матрикс предварительно сформированных биопленок метициллинорезистентного штамма *S. aureus* 44687 в тесте истощения (адсорбции из раствора) конго красного

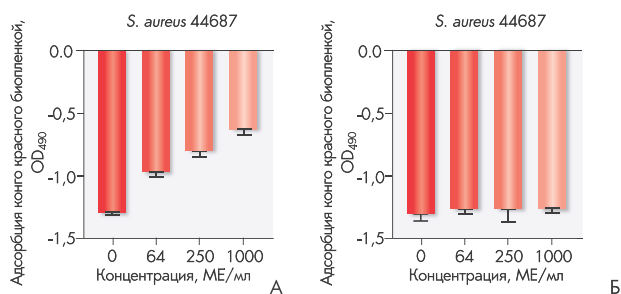


Рисунок 7. Эффект воздействия бовгиалуронидазы азоксимера (А) и гиалуронидазы (Б) на матрикс предварительно сформированных биопленок метициллинорезистентного штамма *S. aureus* 44687 в тесте истощения (адсорбции из раствора) конго красного

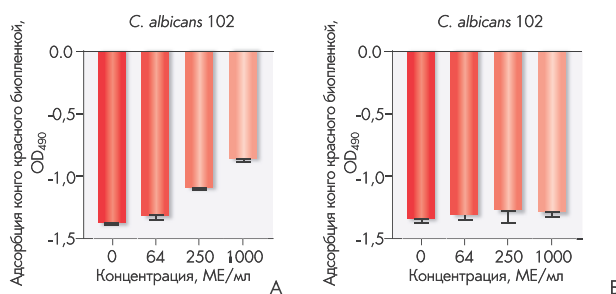


Рисунок 9. Эффект воздействия бовгиалуронидазы азоксимера (А) и гиалуронидазы (Б) на матрикс предварительно сформированных биопленок *C. albicans* 102 в тесте истощения (адсорбции из раствора) конго красного

ными бовгиалуронидазой азоксимером, наиболее выраженное при внесении концентрации 1000 МЕ/мл, но также проявляющееся при воздействии фермента с активностью 250 МЕ/мл и 64 МЕ/мл, что свидетельствует о ферментативном разрушении матрикса биопленки (Рисунки 5, 6). Дозозависимый эффект разрушения сформированных биопленок был отмечен для всех протестированных штаммов *E. coli*.

Влияние бовгиалуронидазы азоксимера на матрикс сформированных биопленок

Проведен сравнительный анализ воздействия на микробные биопленки метициллинорезистентного штамма *S. aureus* 44687. Отмечено дозозависимое снижение адсорбции красителя биопленками, обработанными бовгиалуронидазой азоксимером, наиболее выраженное при внесении концентрации 1000 МЕ/мл, что свидетельствует о ферментативном разрушении матрикса биопленки (Рисунок 1). Внесение гиалуронидазы в ана-

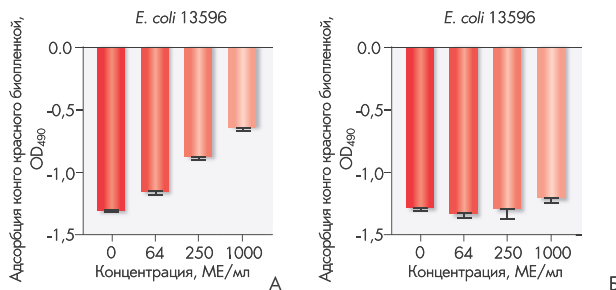


Рисунок 10. Эффект воздействия бовгиалуронидазы азоксимера (А) и гиалуронидазы (Б) на матрикс предварительно сформированных биопленок *E. coli* 13596 в тесте истощения (адсорбции из раствора) конго красного

логичных концентрациях (64, 250 и 1000 мг/л) не влияло на адсорбцию конго красного сформированными биопленками (Рисунок 7 Б, 8 Б).

Обработка препаратом гиалуронидазы также не оказывала влияния на адсорбцию конго красного биопленками, сформированными *S. albicans* и *E. coli* (Рисунки 9, 10).

Обсуждение

Несмотря на высокие темпы развития современной медицины, внедрение искусственных систем и инвазивных устройств, спасающих жизни многим пациентам, остаются нерешенными проблемы осложнений терапевтических мероприятий и оперативных вмешательств. К одной из причин развития воспалений и отторжения имплантов относится образование микробной биопленки [12, 13].

Связанные с биопленкой инфекции чаще всего характеризуются низкой восприимчивостью к лечению ввиду затруднения проникновения АБ в биопленку, что многократно повышает уровень резистентности микроорганизма [14, 15]. В свою очередь распространение антимикробной устойчивости бактерий значительно снижает эффективность доступных схем терапии.

На сегодняшний день известно несколько стратегий воздействия на микробные биопленки, включая ферментативный гидролиз матрицы биопленки. Метод ферментативного гидролиза обладает низкой токсичностью и характеризуется отсутствием риска развития резистентности [16–18], облегчая проникновение в клетки антимикробных препаратов [19, 20].

Влияние бовгиалуронидазы азоксимера на микробиоту урогенитального тракта описано в ряде клинических исследований [21, 22].

В данном исследовании оценивалась способность бовгиалуронидазы азоксимера вызывать деструкцию биопленок, сформированных выделенными от пациентов клиническими штаммами *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *C. albicans*.

Полученные нами данные свидетельствуют о ферментативном разрушении матрикса биопленки *S. aureus* и *C. albicans* при внесении концентрации 1000 МЕ/мл.

Для штаммов *S. epidermidis*, в проведенном нами исследовании, ферментативное разрушение матрикса биопленки было отмечено при обработке бовгиалуронидазы азоксимером в концентрациях 250 МЕ/мл и 1000 МЕ/мл. Значительное снижение адсорбции красителя,

характеризующее ферментативное разрушение матрикса биопленки, было выявлено и для штаммов *E. coli* при внесении концентрации 64 МЕ/мл, 250 МЕ/мл и 1000 МЕ/мл.

При этом для всех проанализированных штаммов микроорганизмов был отмечен дозозависимый эффект разрушения сформированных биопленок.

Биопленки, сформированные *E. faecalis*, оказались стабильны к действию фермента.

Способность бовгиалуронидазы азоксимера разрушать биопленку *C. albicans* была продемонстрирована также в другом исследовании, по результатам которого обработка *in vitro* биопленки 750 МЕ фермента снижала биомассу биопленок на 30% [23]. Также была продемонстрирована роль бовгиалуронидазы азоксимера и в эффективном разрушении биопленки, образованной монокультурами *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* (уменьшение биомассы биопленок в 1,5–2 раза). При этом в смешанных культурах (*S. aureus* – *E. faecalis* и *S. aureus* – *E. coli*) обработка бовгиалуронидазы азоксимером приводила к 30%–50% снижению массы биопленки [10].

Таким образом, полученные нами результаты подтверждают возможность повышения эффективности терапии инфекций, связанных с микробной биопленкой, при применении бовгиалуронидазы азоксимера в комбинации с противомикробными препаратами.

Заключение

Выявлено, что бовгиалуронидаза азоксимер в концентрациях 64–1000 МЕ/мл способен *in vitro* эффективно разрушать матрикс предварительно сформированных биопленок метициллинорезистентных штаммов *S. aureus*, а также *S. epidermidis*, *E. coli*, *C. albicans*, оказывая при этом дозозависимый эффект.

Известно, что при применении в комбинации с другими лекарственными средствами (антибиотиками, местными анестетиками, диуретиками) бовгиалуронидаза азоксимер повышает их биодоступность и усиливает их фармакологические эффекты. Можно ожидать, что при сочетанном воздействии с антибиотиками на микробные биопленки, сформированные микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью, бовгиалуронидаза азоксимер будет потенцировать антимикробные эффекты, разрушая экзополисахаридный матрикс и облегчая проникновение антибиотиков к клеточным мишеням.

Литература

1. Maharjan G., Khadka P., Siddhi Shilpakar G., Chapagain G., Dhungana G.R. Catheter-associated urinary tract infection and obstinate biofilm producers. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2018;2018:7624857. DOI: 10.1155/2018/7624857
2. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl.* 2013;(136):1-51. DOI: 10.1111/apm.12099
3. Garnett J.A., Matthews S. Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective. *Curr Protein Pept Sci.* 2012;13(8):739-755. DOI: 10.2174/138920312804871166

4. Moons P. Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 2009;35(3):157-168. DOI: 10.1080/10408410902809431
5. Hall C.W., Mah T.F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):276-301. DOI: 10.1093/femsre/fux010
6. Costerton W., Veeh R., Shirliff M., Pasmore M., Post C., Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.* 2003;112(10):1466-1477. DOI: 10.1172/JCI20365
7. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(2):114-122. DOI: 10.1038/nrd1008
8. Kolchanova N.E., Okulich V.K., Shilin V.E. Determination of the periodontal pocket bacteria's to form microbic communities and its chemical and biological objects resistance. *Immunopathology, allergology, infectology.* 2015;3:56-61. Russian. (Колчанова Н.Э., Окулич В.К., Шилин В.Е. Определение образования микробной биопленки бактериями периодонтального кармана и ее устойчивости к химическим и биологическим объектам. *Имунопатология, аллергология, инфектология.* 2015;3:56-61.) DOI: 10.14427/jipai.2015.3.56
9. Ibberson C.B., Parlet C.P., Kwiecinski J., Crosby H.A., Meyerholz D.K., Horswill A.R. Hyaluronan modulation impacts *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infect Immun.* 2016;84(6):1917-1929. DOI: 10.1128/IAI.01418-15
10. Trizna E., Baidamshina D., Gorshkova A., Drucker V., Bogachev M., Tikhonov A., et al. Improving the efficacy of antimicrobials against biofilm-embedded bacteria using bovine hyaluronidase azoximer (Longidaza®). *Pharmaceutics.* 2021;13(11):1740. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111740
11. Stepanovic S., Vukovic D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukic S., Cirković I., Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007;115(8):891-899. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
12. Saini H., Vadekeetil A., Chhibber S., Harjai K. Azithromycin-ciprofloxacin-impregnated urinary catheters avert bacterial colonization, biofilm formation, and inflammation in a murine model of foreign-body-associated urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(3):e01906-16. DOI: 10.1128/AAC.01906-16
13. Andersen M.J., Flores-Mireles A.L. Urinary catheter coating modifications: the race against catheter-associated infections. *Coatings.* 2020;10:23. DOI: 10.3390/coatings10010023
14. Cortese Y.J., Wagner V.E., Tierney M., Devine D., Fogarty A. Review of catheter-associated urinary tract infections and *in vitro* urinary tract models. *J Healthc Eng.* 2018;2018:2986742. DOI: 10.1155/2018/2986743
15. Uruen C., Chopo-Escuin G., Tommassen J., Mainar-Jaime R.C., Arenas J. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiotics.* 2020;10(1):3. DOI: 10.3390/antibiotics1001003
16. Hacioglu M., Oyardi O., Bozkurt-Guzel C., Savage P.B. Antibiofilm activities of ceragenins and antimicrobial peptides against fungal-bacterial mono and multispecies biofilms. *J Antibiot.* 2020;73:455-462. DOI: 10.1038/s41429-020-0299-0
17. Weiland-Bräuer N., Malek I., Schmitz R.A. Metagenomic quorum quenching enzymes affect biofilm formation of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS One.* 2019;14(1):e0211366. DOI: 10.1371/journal.pone.0211366
18. Sharafutdinov I.S., Ozhegov G.D., Sabirova A.E., Novikova V.V., Lisovskaya S.A., Khabibrakhmanova A.M., et al. Increasing susceptibility of drug-resistant *Candida albicans* to fluconazole and terbinafine by 2(5H)-furanone derivative. *Molecules.* 2020;25(3):642. DOI: 10.3390/molecules25030642
19. Thallinger B., Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M. Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol J.* 2013;8(1):97-109. DOI: 10.1002/biot.201200313
20. Nahar S., Mizan M.F.R., Ha A.J.W., Ha S.D. Advances and future prospects of enzyme-based biofilm prevention approaches in the food industry. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2018;17(6):1484-1502. DOI: 10.1111/1541-4337.12382
21. Troshina N.A., Dolgushin I.I., Dolgushina V.F., Bakharva L.I., Kurnosenko I.V., Nadvikova T.V. Effect of Longidaze on microbial landscape of cervical canal and uterine cavity during therapy of women with chronic nonspecific endometritis and uterus myoma. *ZHurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2015;4(4):71-74. Russian. (Трошина Н.А., Долгушин И.И., Долгушина В.Ф., Бахарева Л.И., Курносенко И.В., Надвикова Т.В. Влияние Лонгидазы на микробный пейзаж цервикального канала и полости матки при лечении женщин с хроническим неспецифическим эндометритом и миомой матки. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2015;4(4):71-74.)
22. Kulchavenya E.V., Shvetsova O.P., Breusov A.A. Rationale of use and effectiveness of Longidaza in patients with chronic prostatitis. *Urology.* 2018;4:64-71. Russian. (Кульчавеня Е.В., Швецова О.П., Бреусов А.А. Обоснование применения и эффективности Лонгидазы у пациентов с хроническим простатитом. *Урология.* 2018;4:64-71.) DOI: 10.18565/urology.2018.4:64-71
23. Gatina A., Trizna E., Kolesnikova A., Baidamshina D., Gorshkova A., Drucker V., et al. The bovyhyaluronidase azoximer (Longidaza®) disrupts *Candida albicans* and *Candida albicans*-bacterial mixed biofilms and increases the efficacy of antifungals. *Medicina.* 2022;58(12):1710. DOI: 10.3390/medicina58121710