

# СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК

УДК 576.851.2:579.2

Поступила 18.11.2012 г.



**И.В. Чеботарь**, к.м.н., доцент кафедры микробиологии и иммунологии<sup>1</sup>;

**А.Г. Погорелов**, д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник<sup>2</sup>;

**В.А. Яшин**, зав. лабораторией методов оптико-спектрального анализа<sup>3</sup>;

**Е.Л. Гурьев**, к.б.н., научный сотрудник НИИ ПФМ<sup>1</sup>;

**Г.Г. Ломинадзе**, клинический ординатор<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская область, 142290, ул. Институтская, 3;

<sup>3</sup>Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская область, 142290, ул. Институтская, 3;

<sup>4</sup>Научный центр здоровья детей РАМН, Москва, 119991, Ломоносовский проспект, 2

**Цель исследования** — оценить возможности использования новых медико-биологических технологий для идентификации бактериальных биопленок и апробировать их на модели стафилококковой биопленки.

**Материалы и методы.** Для исследования стафилококковой биопленки применялись масс-спектрометрия, лазерная сканирующая (конфокальная) микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, ферментативная и окислительная деструкция внеклеточного биопленочного матрикса.

**Результаты.** Продемонстрированы возможности новых медико-биологических технологий в идентификации видовой принадлежности биопленкообразующего стафилококка, а также в обнаружении обязательных атрибутов стафилококковой биопленки. Масс-спектрометрия позволила идентифицировать вид биопленкообразующего стафилококка (*Staphylococcus aureus*). Микроскопическое исследование, проведенное методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, выявило характерную для биопленок *S. aureus* трехмерную организацию. С помощью сканирующей электронной микроскопии были визуализированы структуры внеклеточного биопленочного матрикса *S. aureus*. Установлено, что внеклеточный матрикс изучаемой биопленки образован ДНК-протеиновыми комплексами.

**Ключевые слова:** *Staphylococcus aureus*; биопленка; масс-спектрометрия; лазерная сканирующая конфокальная микроскопия; сканирующая электронная микроскопия.

## English

## Modern Technologies of Bacterial Biofilm Study

**I.V. Chebotar**, PhD, Associate Professor, the Department of Microbiology and Immunology<sup>1</sup>;

**A.G. Pogorelov**, D.Bio.Sc., Professor, Leading Research Worker<sup>2</sup>;

**V.A. Yashin**, Head of the Optical Spectroscopy Laboratory<sup>3</sup>;

**E.L. Guryev**, PhD, Research Worker, Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**G.G. Lominadze**, Resident Medical Practitioner<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

<sup>2</sup>Institute for Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya St., 3, Pushchino, Moscow region, Russian Federation, 142290;

<sup>3</sup>Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya St., 3, Pushchino, Moscow region, Russian Federation, 142290;

<sup>4</sup>Scientific Children Health Centre of Russian Academy of Medical Sciences, Lomonosovsky Avenue, 2, Moscow, Russian Federation, 119991

**The aim of the investigation** was to estimate the availability of new biomedical technologies to identify bacterial biofilms and evaluate them on a staphylococcal biofilm model.

**Materials and Methods.** We studied staphylococcal biofilms by mass spectrometry, laser scanning (confocal) microscopy, scanning electron microscopy, enzymatic and oxidative destruction of extracellular biofilm matrix.

**Results.** We demonstrated the capabilities of new biomedical technologies in identification of generic specificity of biofilm-forming staphylococcus, and in detection of the necessary characteristics of staphylococcal biofilm. Mass spectrometry enabled to identify the type of biofilm-forming staphylococcus (*Staphylococcus aureus*). Microscopic study using laser scanning confocal microscopic technique revealed

Для контактов: Чеботарь Игорь Викторович, тел. раб. 8(831)465-42-71, тел. моб. +7 903-607-70-54; e-mail: nizarnn@yandex.ru

3-dimensional organization typical of *S. aureus* biofilms. Scanning electron microscopy enabled to visualize the structures of extracellular *S. aureus* biofilm matrix. The extracellular matrix of the test biofilm was found to be formed of DNA-protein complexes.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; biofilm; mass-spectrometry; laser scanning confocal microscopy; scanning electron microscopy.

Патогенез многих бактериальных инфекций человека связан с образованием биопленок. Бактериальные биопленки — это слой бактериальных клеток, прикрепленных к поверхности и друг к другу, заключенных в биополимерный матрикс [1]. Стафилококки — актуальные возбудители гнойно-воспалительных заболеваний — активно формируют биопленки в организме человека и на поверхности сопряженных с ним устройств (катетеров, протезов, имплантатов). Это касается *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus haemolyticus* и других их видов [2–6]. Стафилококки в составе биопленок приобретают устойчивость к действию антимикробных препаратов, а также к атакам со стороны иммунной системы человека [7, 8], поэтому стафилококковые биопленочные инфекции характеризуются затяжным течением, склонностью к рецидивам и отсутствием эффекта от традиционных методов антимикробной терапии [9]. Однако даже внутри одного вида не все штаммы обладают способностью образовывать биопленки. Например, от 22 до 32% клинических изолятов *S. aureus* не формируют биопленки [10, 11]. Из этого следует, что для выбора оптимальной тактики лечения следует проводить микробиологическую диагностику, которая не только должна включать видовую идентификацию возбудителя, но и отвечать на вопрос о наличии или отсутствии биопленочного процесса в каждом конкретном случае. Иными словами, существует необходимость дифференцировки биопленочных и небиопленочных штаммов выделенного возбудителя. Для того, чтобы доказать присутствие биопленки, используют разнообразные методические подходы, направленные на обнаружение: 1) элементов биопленочного внеклеточного матрикса; 2) генов, контролирующих биопленкообразование; 3) сложных архитектурных структур, специфичных для биопленки [12]. Предварительно производят видовую идентификацию микробов, формирующих биопленку.

**Цель исследования** — оценить возможности использования новых медико-биологических технологий для идентификации бактериальных биопленок и апробировать их на модели стафилококковой биопленки. В задачи исследования входила идентификация видовой принадлежности возбудителя, а также подтверждение того, что исследуемый штамм стафилококка формирует биопленку. Доказательством существования биопленки служило обнаружение двух обязательных биопленочных атрибутов — бактериальных клеток и внеклеточного матрикса [12].

**Материалы и методы.** Объектом исследования был придонный слой бульонной культуры клинического изолята коагулазопозитивного стафилококка (штамм 5983/2) в пластиковых чашках Петри. В чашку (диаметр 40 мм) вносили 3,5 мл бульона Tryptic Soy Broth

(TSB) (Becton, Dickinson and Company, США), содержащего 1% глюкозы, и добавляли 0,5 мл стандартизованной по оптическим характеристикам (0,5 единиц на приборе DensiLaMeter II, ф. ERBA Lachema, Чехия) суточной культуры исследуемого стафилококка в том же бульоне; 1 мл содержал примерно  $10^8$  колониеобразующих единиц стафилококков. Инкубировали 48 ч при 37°C. После инкубации осторожно сливали надосадочный питательный бульон. Образовавшийся на дне чашки слой стафилококков дважды отмывали раствором Хенкса (по 4 мл).

Идентификацию видовой принадлежности проводили на основе технологии MALDI-TOF MS (Германия) методом прямого профилирования на масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия), оснащенный азотным лазером 337 нм, с использованием программы Maldi Biotyper automatic (Германия). При помощи бактериальной петли со дна чашки Петри забирали микробный материал и наносили его непосредственно на мишень. Затем материал смешивали с 1 мкл матрицы (насыщенный раствор  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты в смеси 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты), высушивали на воздухе, после чего мишень загружали в масс-спектрометр и подвергали исследованию. Сравнение полученного масс-спектра с масс-спектрами референсной библиотеки осуществлялось с помощью программного обеспечения flexControl и flexAnalysis (Bruker Daltonics, Германия). Надежность идентификации отражала система баллов (scores), разработанная на основе статистических алгоритмов: 2,300–3,000 баллов соответствует достоверной вероятности видовой идентификации [13].

Микроскопическое исследование проводили с помощью лазерного сканирующего (конфокального) микроскопа LSM 510 Meta (Zeiss, Германия). Непосредственно в чашке Петри слой стафилококков окрашивали флюорохромными красителями с помощью тест-системы FilmTracer™ 1-43 Green Biofilm Cell Stain (Invitrogen, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Полученные изображения реконструировали и анализировали при помощи компьютерной программы Zeiss LSM Image Browser (Германия). Отдельная серия микроскопических исследований подвижности биопленочных стафилококков (с аналогичной флюорохромной окраской) была проведена с применением технологии «резонансный сканер» на лазерном сканирующем (конфокальном) микроскопе TCS SP5 (Leica Microsystems, Швейцария); изображения были восстановлены при помощи программного обеспечения LAS AF Lite.

Для ультраструктурных исследований рельефа биопленки использовали сканирующий электронный микроскоп JSM 6390A (JEOL, Япония). Фиксацию препарата осуществляли при 4°C в два этапа. Вначале проводили предфиксацию (30 мин) образца в 2,5% раство-

ре глутарового альдегида (pH=7,2) (EM grade, ф. Agar Scientific Inc., Великобритания) с последующим трехкратным отмыванием дистиллированной водой. Затем препарат фиксировали (30 мин) 0,5% раствором  $\text{OsO}_4$  с последующим трехкратным отмыванием в дистиллированной воде. После этого препарат криофиксировали в жидком азоте ( $-196^\circ\text{C}$ ) и подвергали низкотемпературной дегидратации ( $-100^\circ\text{C}$ ) в высоком вакууме в течение 24 ч. После лиофилизации препарат монтировали на держатель электронного микроскопа и на его поверхность методом ионного распыления в аргоновой плазме наносили слой платины (10 нм), используя установку JFC-1600 (JEOL, Япония). Сканирующая электронная микроскопия проводилась при увеличении от 1000 до 10000 раз.

Биохимическая идентификация элементов межклеточного биопленочного матрикса выполнялась путем обработки биопленок субстанциями, обеспечивающими специфическую деструкцию разных типов матрикса [14–16]. Для того, чтобы подтвердить структурную роль белков в образовании матрикса, использовали протеиназу К (Amresco, США) и трипсин (Thermo Scientific, Финляндия), для обнаружения в составе матрикса внеклеточной ДНК (eДНК) применяли ДНКазу (Fermentas, Литва). Для выявления полисахаридов проводили обработку биопленок периодатом натрия. Протеиназа К была растворена в 100 ммоль Tris-Cl-буфера (pH=7,5) в концентрации 1000 мкг/мл. ДНКазы была растворена в 10 ммоль Tris-Cl-буфера (pH=8,0), содержащего 2 ммоль  $\text{MgCl}_2$ , в концентрации 1000 мкг/мл. Эти ферменты добавляли к биопленкам (в растворе Хенкса, 4 мл) в соотношении к объему раствора 1:9; биопленки с ферментами инкубировали 60 мин при  $37^\circ\text{C}$ . В серию проб были добавлены последовательно ДНКазы (конечная концентрация 100 мкг/мл, инкубация 60 мин при  $37^\circ\text{C}$ ) и протеиназа К (конечная концентрация 100 мкг/мл, инкубация 60 мин при  $37^\circ\text{C}$ ). Для каждой серии опытов были предусмотрены контрольные образцы, в которые добавляли соответствующие буферные растворы без ферментов. Из образцов с биопленками удаляли раствор Хенкса и добавляли по 4 мл дистиллированной воды, содержащей 40 ммоль периодата натрия (натрия йоднокислого мета), инкубировали 23 ч

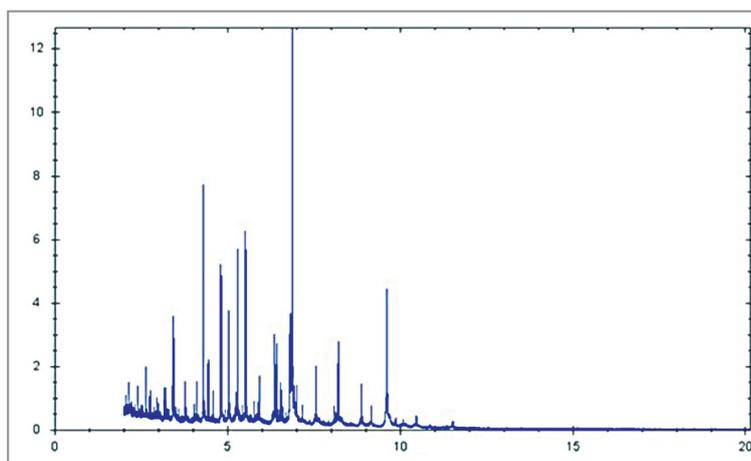
при  $4^\circ\text{C}$ . В качестве контроля использовали биопленки с добавлением одной из систем: 1) 4 мл дистиллированной воды, содержащей 40 ммоль периодата натрия и 40 ммоль глюкозы; 2) 4 мл дистиллированной воды, содержащей 40 ммоль глюкозы; 3) 4 мл дистиллированной воды. После инкубации биопленки дважды отмывали дистиллированной водой, окрашивали 1% раствором кристаллического фиолетового (4 мин при комнатной температуре), затем ополаскивали дистиллированной водой и элюировали краситель смесью (1:1) этанол-изопропанол (4 мл). О целостности биопленки судили по степени окраски элюата, интенсивность которой (светопоглощение) оценивали спектрофотометрически (610 нм). Результаты выражали в процентах относительно контрольных проб.

Все опыты выполняли в трех повторениях, серии экспериментов повторяли четырежды; полученные данные анализировали, используя как стандартные статистические методы (расчет средних значений, стандартных отклонений, критерия Манна–Уитни), так и модули, которые входят в пакеты программного обеспечения используемых в работе приборов (масс-спектрометр Microflex, сканирующий электронный микроскоп JSM).

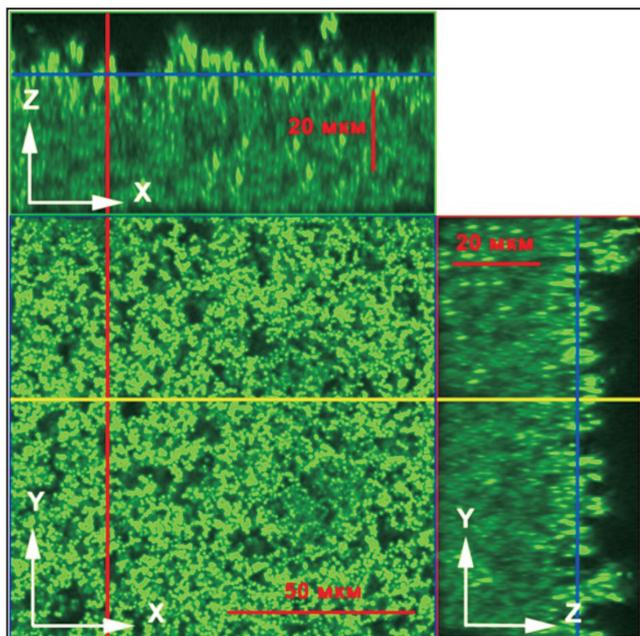
**Результаты и обсуждение.** Данные видовой идентификации биопленочных бактерий при помощи технологии MALDI-TOF MS (Германия) (рис. 1) подтвердили их достоверную принадлежность (score — 2,420) к виду *S. aureus*.

Визуализация биопленки с помощью конфокальной микроскопии и программного обеспечения LSM Image Browser выявила характерную для биопленок трехмерную организацию (рис. 2). Толщина двухсуточной биопленки *S. aureus* колебалась от 20 до 47 мкм.

Микроскопическое наблюдение за живой биопленкой в режиме реального времени позволило обнаружить особый вид хаотического (теплового) движения стафилококков, находящихся в ее составе (рис. 3). Некоторые стафилококки, являясь микроскопическими частицами, совершали хаотические колебания внутри ограниченного объема, соизмеримого с их размерами. При этом стафилококки могли не иметь прямых контактов с соседними клетками. В отличие от классического броуновского движения перемещения стафилококков



**Рис. 1.** Масс-спектрограмма формирующей биопленку штамма, демонстрирующая спектр соотношений массы к заряду ионизированных пептидов — дериватов бактериальных протеинов. По оси X — пики, каждый из которых соответствует ионизированному пептиду (белку или части белка) с уникальным отношением масса/заряд, по оси Y — интенсивность пика (в условных единицах), которая эквивалентна количеству белка (пептида). Статистический анализ спектров позволяет достоверно утверждать, что исследуемый изолят принадлежит к виду *S. aureus* (score — 2,420)



**Рис. 2.** Реконструкция двухслойной биопленки, сформированной *S. aureus* (штамм 5983/2), полученная на основе лазерной сканирующей (конфокальной) микроскопии. Прижизненное исследование биопленки, стафилококки окрашены красителем FilmTracer™ 1-43 Green Biofilm Cell Stain (Invitrogen). Соотношение экстинкция/эмиссия — 488 нм/543 нм. Объектив х63, водная иммерсия. Метка по оси X — 50 мкм, по оси Z — 20 мкм

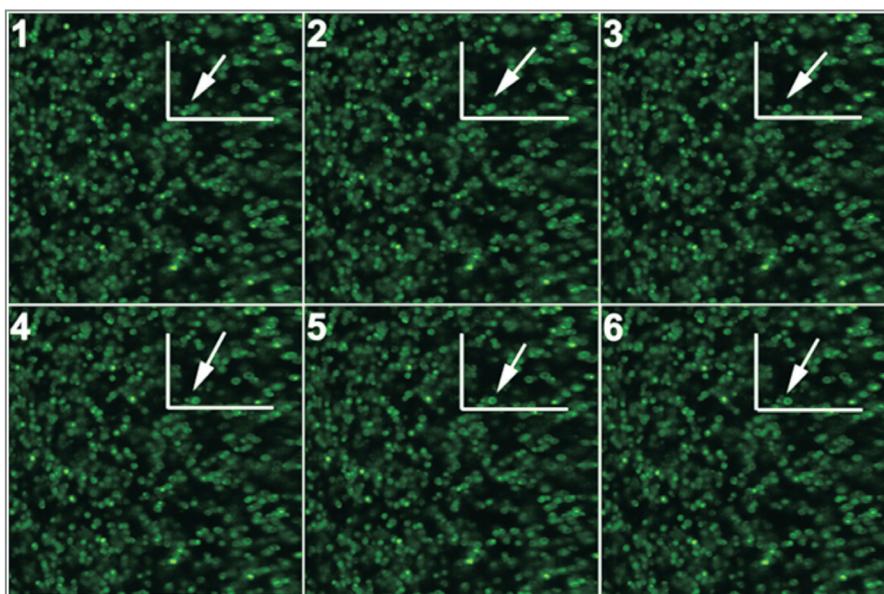
были ограничены. Это свидетельствовало о том, что стафилококки механически связаны между собой, и являлось косвенным подтверждением существования необходимого атрибута любой биопленки — внеклеточного матрикса, связывающего биопленочные микробы между собой и с подлежащей поверхностью. Из-за своих малых размеров структурные элементы матрикса не могли быть визуализированы методом конфокальной микроскопии.

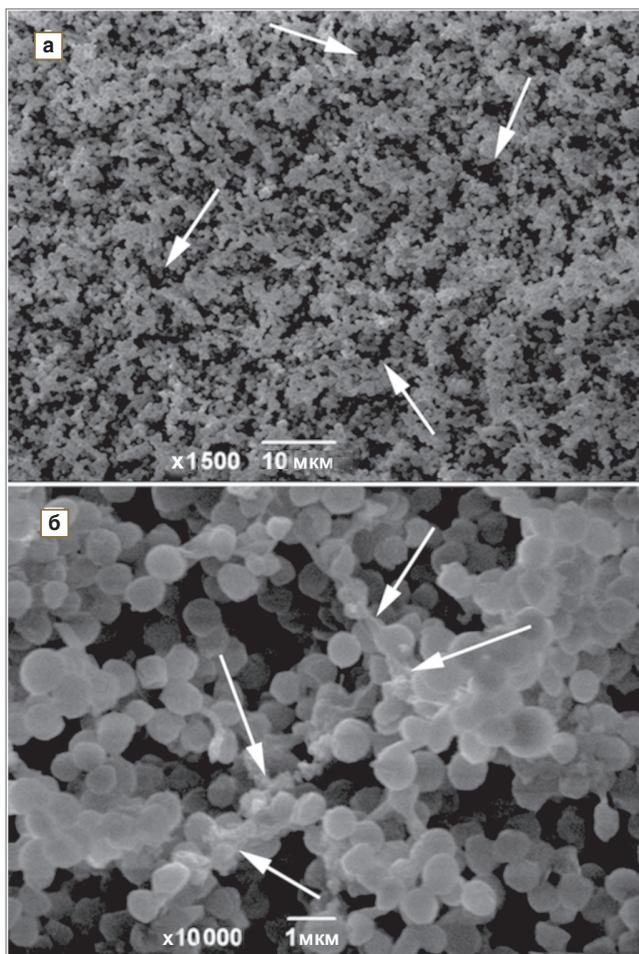
Ультрамикроскопическое исследование биопленок и прямая визуализация матрикса проведены при помощи сканирующей электронной микроскопии (рис. 4). В пространственном расположении стафилококков прослеживались два уровня организации. Первый уровень связан с тем, что стафилококки формировали кластеры, включающие от 9 до 55 клеток. На более высоком уровне организации стафилококковые кластеры формировали единую надкластерную структуру, состоящую из многих слоев, — биопленку. Массив биопленки пронизан многочисленными каналами, устья которых открывались на внешнюю (исследуемую) поверхность биопленки. Через просветы каналов не видно подложки, на которой сформировалась биопленка. На 100 мкм<sup>2</sup> поверхности биопленки открывается в среднем от 4 до 6 устьев каналов. В образовании стенок каналов в районе устьев принимают участие от 9 до 27 стафилококков.

Между стафилококками наблюдалось два типа контактов: непосредственное взаимодействие, с помощью которого формируются кластеры, и матрикс-опосредованные связи. Последние обнаруживались при увеличении от 3000 до 15 000: между отдельными стафилококками существовали необычные «перемычки» — структуры биопленочного матрикса, связывающие бактерии друг с другом. Клеточная поверхность большинства стафилококков — ровной округлой формы, исключения составляли участки клеточной поверхности, связанные с внеклеточным матриксом. Эта поверхность была неровной, матрикс представлял собой неструктурированную, неоформленную субстанцию. Следует отметить, что биопленочный матрикс в условиях *in vitro* может быть образован как активно секретиремыми бактериальными полимерами, так и дериватами клеток, полученными в результате аутолиза [17].

Микроскопические исследования показали наличие атрибутов, обязательных для биопленок, — бактерий (*S. aureus*) и внеклеточного матрикса. Это означает, что объект нашего изучения являлся биопленкой. Факт

**Рис. 3.** Серия микрофотографий, отражающая ограничение подвижности биопленочных стафилококков при хаотическом (тепловом) движении. На фотографиях 1–6 отражены перемещения стафилококков, окрашенных зеленым цветом. Стрелка указывает на группу стафилококков, которые изменяют свое положение относительно координатной сетки (пересекающиеся белые отрезки) с неизменяемыми координатами. Лазерная сканирующая (конфокальная) микроскопия. Прижизненная окраска с использованием флюорохромного красителя FilmTracer™ 1-43 Green Biofilm Cell Stain (Invitrogen). Соотношение экстинкция/эмиссия — 488 нм/543 нм. Объектив х40. Время между снимками — 0,075 с



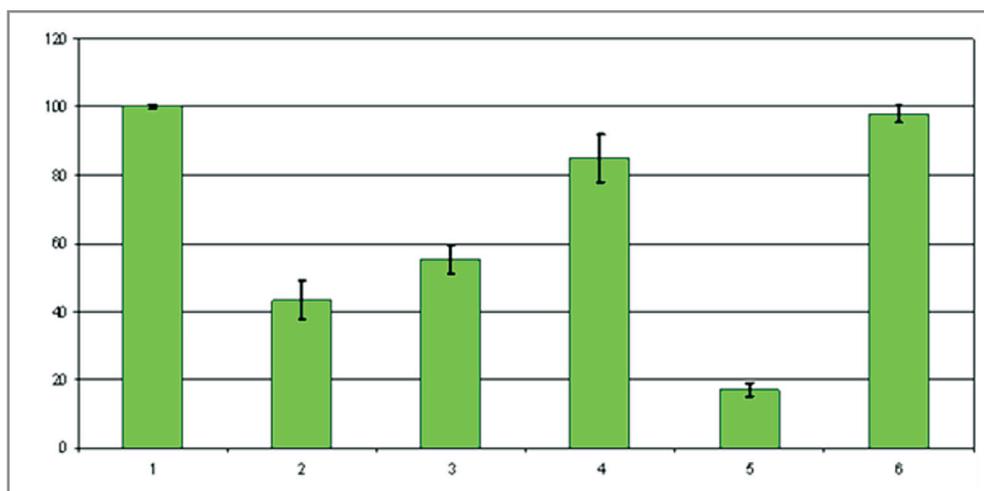


**Рис. 4.** Сканирующая электронная микроскопия поверхности двухсуточной биопленки, сформированной *S. aureus* (штамм 5983/2): *а* — увеличение 1500, метка — 10 мкм; стрелками указаны биопленочные каналы; *б* — увеличение 10 000, метка — 1 мкм; стрелками указаны элементы внеклеточного биопленочного матрикса

образования биопленки золотистым стафилококком не стал неожиданным, так как известно, что примерно 74% инвазивных и 68% неинвазивных клинических изолятов стафилококка являются биопленкообразующими [18].

При изучении влияния на биопленку субстанций, разрушающих внеклеточный матрикс (рис. 5), установлено, что обработка протеиназами приводит к статистически значимому снижению показателей окраски биопленок: при обработке трипсином показатели снижаются примерно на 57% и составляют  $43,3 \pm 5,8\%$  от негативного контроля ( $p < 0,01$ ), при обработке протеиназой К — на 45% и составляют  $55,4 \pm 4,3\%$  от контроля ( $p < 0,01$ ). Это свидетельствует о снижении биопленочной массы за счет разрушения протеинов внеклеточного матрикса. ДНКаза вызвала менее выраженное разрушение биопленок: показатели снижались примерно на 15%, но при этом статистически значимо отличались от контроля —  $84,9 \pm 7,1\%$  ( $p < 0,05$ ). Это указывает на возможное участие ДНК в образовании внеклеточного матрикса. Результаты, подтверждающие роль ДНК в построении матрикса, были получены в серии опытов при обработке биопленок последовательно ДНКазой и протеиназой К: показатели окраски биопленок снижались на 83% и составляли  $16,9 \pm 2,0\%$  от контрольных значений ( $p < 0,001$ ). Биопленочный матрикс был устойчив к периодатному окислению: биопленки, обработанные периодатом натрия, не отличались от контроля ( $p > 0,05$ ). Устойчивость к периодатному окислению свидетельствует об отсутствии полисахаридных структур в составе внеклеточного биопленочного матрикса.

Полученные данные позволяют сделать вывод о биохимическом составе внеклеточного матрикса исследуемой биопленки: он состоит из ДНК-протеиновых комплексов, механическая целостность биопленки не зависит от полисахаридных компонентов. Это не противоречит литературным данным [17, 19–22], в ко-



**Рис. 5.** Воздействие субстанций, разрушающих различные структуры внеклеточного биопленочного матрикса, на двухсуточную биопленку, сформированную *S. aureus* (штамм 5983/2). По оси X: 1 — контроль (пробы без внесения субстанций, разрушающих матрикс); 2 — трипсин; 3 — протеиназа К; 4 — ДНКаза; 5 — последовательная обработка ДНКазой и протеиназой К; 6 — периодат натрия (натрий йоднокислый мета). По оси Y — интенсивность окраски биопленки, отражающая ее целостность, в процентах относительно контроля

торых подтверждается существование штаммов золотистого стафилококка с различными типами матрикса. Разрушение матрикса всегда приводит к отторжению биопленки, поэтому информация о его биохимической структуре является крайне важной для управления биопленочными процессами. Она позволяет оптимизировать выбор антибиопленочных препаратов, действие которых может быть направлено на деградацию ДНК-матрикса (препараты на основе ДНКаз стрептококкового происхождения), разрушение протеинового матрикса (трипсин), дезинтеграцию матрикса на основе поли- $\beta$ -(1,6)-N-ацетилглюкозамина (дисперсин B).

Нужно отметить, что авторы сознательно не использовали в исследовании некоторые методы, применяемые в мировой практике. Речь идет о тестах с красителем «конго красный» и некоторых генетических методах, результаты которых могут быть не только малоинформативными, но и некорректными [12].

Технологии, примененные в настоящей работе для исследования стафилококковой биопленки, позволяют сделать следующие выводы: 1) изучаемый штамм стафилококка при росте (48 ч) в бульоне формирует биопленку на полимерной поверхности; 2) исследуемый биопленкообразующий изолят принадлежит к виду *S. aureus*; 3) внеклеточный матрикс полученной биопленки образован ДНК-протеиновыми комплексами, его механическая целостность не зависит от полисахаридных компонентов.

**Заключение.** Новые медико-биологические технологии позволяют успешно идентифицировать видовую принадлежность биопленкообразующего стафилококка, обнаруживать обязательные атрибуты стафилококковой биопленки. Масс-спектрометрия дает возможность идентифицировать вид биопленкообразующего стафилококка (*Staphylococcus aureus*). Микроскопическое исследование, проведенное методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, выявляет характерную для биопленок *S. aureus* трехмерную организацию. Сканирующая электронная микроскопия визуализирует структуры внеклеточного биопленочного матрикса *S. aureus*.

## Литература

1. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальная биопленка как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2011; 3: 99–109.
2. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2011; 1: 101–108.
3. Gotz F. Staphylococcus and biofilms. Mol Microbiol 2002; 43: 1467–1378.
4. Vuong C., Otto M. Staphylococcus epidermidis infections. Microbes Infect 2002; 4: 481–489.
5. Frank K.L., del Pozo J.L., Patel R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for Staphylococcus lugdunensis. Clin Microbiol Rev 2008; 1: 111–133.
6. Fredheim E.G., Klingenberg C., Rohde H., Frankenberger S., Gaustad P., Flaegstad T., Sollid J.E. Biofilm formation by Staphylococcus haemolyticus. J Clin Microbiol 2009; 47(4): 1172–1180.
7. Бехало В.А., Бондаренко В.М., Сысолятина Е.В., Нагурская Е.В. Иммунобиологические особенности бактериаль-

ных клеток медицинских биопленок. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2010; 4: 97–105.

8. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. Клин микробиол и антимикроб химиотер 2012; 14(1): 51–58.
9. Archer N.K., Mazaitis M.J., Costerton J.W., Leid J.G., Powers M.E., Shirliff M.E. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence 2011; 2(5): 445–459.
10. Jain A., Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. J Microbiol Methods 2009; 76(1): 88–92.
11. Taj Y., Essa F., Aziz F., Kazmi S.U. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of Staphylococcus aureus. J Infect Dev Ctries 2012; 6(5): 403–409.
12. Чеботарь И.В., Гурьев Е.Л. Лабораторная диагностика клинически значимых биопленочных процессов. Вопр диагностики в педиатрии 2012; 4: 15–20.
13. Маянский Н.А., Калакуцкая А.Н., Мотузова О.В., Ломинадзе Г.Г., Крыжановская О.А., Катосова Л.К. MALDI-TOF масс-спектрометрия в рутинной работе микробиологической лаборатории. Вопр диагностики в педиатрии 2011; 3(5): 20–25.
14. Frank K.L., Patel R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive Staphylococcus lugdunensis isolates. Infect Immun 2007; 75(10): 4728–4742.
15. 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. Appl Environ Microbiol 2008; 74(2): 470–476.
16. Wang X., Preston J.F. III, Romeo T. The pgaABCD locus of Escherichia coli promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. J Bacteriol 2004; 186(9): 2724–2734.
17. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol 2010; 8(9): 623–633.
18. Jain A., Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. J Microbiol Methods 2009; 76(1): 88–92.
19. Chaignon P., Sadovskaya I., Ragunah Ch., Ramasubbu N., Kaplan J.B., Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. Appl Microbiol Biotechnol 2007; 75(1): 125–132.
20. Mack D., Fischer W., Krokotsch A., Leopold K., Hartmann R., Egge H., Laufs R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J Bacteriol 1996; 178(1): 175–183.
21. Hansen U., Hussain M., Villone D., Herrmann M., Robenek H., Peters G., Sinha B., Bruckner P. The anchorless adhesin Eap (extracellular adherence protein) from Staphylococcus aureus selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. Matrix Biol 2006; 25: 252–260.
22. Montanaro L., Poggi A., Visai L., Ravaioli S., Campoccia D., Speziale P., Arciola C.R. Extracellular DNA in biofilms. Int J Artif Organs 2011; 34(9): 824–831.

## References

1. Romanova Yu.M., Gintsburg A.L. Bacteriálnaya bioplenka kak estestvennaya forma sushchestvovaniya bakteriy v okruzhayushchey srede i organizme khozyaina [Bacterial biofilms as a natural form of existence of bacteria in the environment and host organism]. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii — Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2011; 3: 99–109.
2. Mayanskiy A.N., Chebotar I.V. Stafilokokkovyye bioplenki: struktura, regulyatsiya, ottorzhenie [Staphylococcal biofilms: structure, regulation, rejection]. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii — Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2011; 1: 101–108.

3. Gotz F. Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol* 2002; 43: 1467–1378.
4. Vuong C., Otto M. Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes Infect* 2002; 4: 481–489.
5. Frank K.L., del Pozo J.L., Patel R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for Staphylococcus lugdunensis. *Clin Microbiol Rev* 2008; 1: 111–133.
6. Fredheim E.G., Klingenberg C., Rohde H., Frankenberger S., Gaustad P., Flaegstad T., Sollid J.E. Biofilm formation by Staphylococcus haemolyticus. *J Clin Microbiol* 2009; 47(4): 1172–1180.
7. Bekhalo V.A., Bondarenko V.M., Sysolyatina E.V., Nagurskaya E.V. Immunobiologicheskie osobennosti bakterial'nykh kletok meditsinskikh bioplenok [Immunobiological features of bacterial cells of medical biofilms]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii — Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology* 2010; 4: 97–105.
8. Chebotar I.V., Mayanskiy A.N., Konchakova E.D., Lazareva A.V., Chistyakova V.P. Antibiotikorezistentnost' bioplenochnykh bakteriy [Antibiotic resistance of biofilm bacteria]. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya — Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy* 2012; 14(1): 51–58.
9. Archer N.K., Mazaitis M.J., Costerton J.W., Leid J.G., Powers M.E., Shirtliff M.E. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2011; 2(5): 445–459.
10. Jain A., Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Microbiol Methods* 2009; 76(1): 88–92.
11. Taj Y., Essa F., Aziz F., Kazmi S.U. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of Staphylococcus aureus. *J Infect Dev Ctries* 2012; 6(5): 403–409.
12. Chebotar I.V., Gurev E.L. Laboratornaya diagnostika klinicheski znachimykh bioplenochnykh protsessov [Laboratory diagnostics of clinically significant biofilm processes]. *Voprosy diagnostiki v pediatrii — Diagnostic Issues in Pediatrics* 2012; 4: 15–20.
13. Mayanskiy N.A., Kalakutskaya A.N., Motuzova O.V., Lominadze G.G., Kryzhanovskaya O.A., Katosova L.K. MALDI-TOF mass-spektrometriya v rutinnoy rabote mikrobiologicheskoy laboratorii [MALDI-TOF mass spectrometry in microbiological laboratory routine]. *Voprosy diagnostiki v pediatrii — Diagnostic Issues in Pediatrics* 2011; 3 (5): 20–25.
14. Frank K.L., Patel R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive Staphylococcus lugdunensis isolates. *Infect Immun* 2007; 75(10): 4728–4742.
15. 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. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(2): 470–476.
16. Wang X., Preston J.F. III, Romeo T. The pgaABCD locus of Escherichia coli promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* 2004; 186(9): 2724–2734.
17. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(9): 623–633.
18. Jain A., Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Microbiol Methods* 2009; 76(1): 88–92.
19. Chaignon P., Sadovskaya I., Rangunah Ch., Ramasubbu N., Kaplan J.B., Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 75(1): 125–132.
20. Mack D., Fischer W., Krokotsch A., Leopold K., Hartmann R., Egge H., Laufs R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 1996; 178(1): 175–183.
21. Hansen U., Hussain M., Villone D., Herrmann M., Robenek H., Peters G., Sinha B., Bruckner P. The anchorless adhesin Eap (extracellular adherence protein) from Staphylococcus aureus selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biol* 2006; 25: 252–260.
22. Montanaro L., Poggi A., Visai L., Ravaioli S., Campoccia D., Speziale P., Arciola C.R. Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs* 2011; 34(9): 824–831.