

## СОВРЕМЕННЫЕ СПОСОБЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК КИШЕЧНИКА



Т. В. Артюх, Т. Н. Соколова, В. М. Шейбак

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

*В статье изложены основные методы изучения микробных биопленок, позволяющие выявить: закономерности образования биопленок микроорганизмами семейства Enterobacteriaceae, генетические программы, регулирующие процессы пленкообразования, качественные и количественные характеристики компонентов микробных сообществ, влияние внешних факторов на этапы формирования биопленок и их диспергирования. Исследование феномена пленкообразования в сочетании с мониторингом резистентности кишечных микроорганизмов в составе биопленки к антибактериальным препаратам позволит приблизиться к пониманию роли биопленок в течении инфекционных процессов микробной природы.*

**Ключевые слова:** биопленка, методы исследования, антибиотикорезистентность, микрофлора кишечника

## MODERN METHODS FOR RESEARCHING MICROBIAL BIOFILMS OF THE ENTEROBACTERIACEAE FAMILY

T. V. Artyukh, T. N. Sokolova, V. M. Sheibak

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

*The article outlines the main methods of studying microbial biofilms, which make it possible to reveal: the patterns of biofilm formation by microorganisms of the Enterobacteriaceae family, genetic programs regulating the processes of film formation, qualitative and quantitative characteristics of the components of microbial communities, the influence of external factors on the stages of biofilm formation and dispersion. The study of the phenomenon of film formation in combination with monitoring the resistance of intestinal microorganisms in the biofilm to antibacterial drugs will make it possible to get closer to understanding the role of biofilms in the course of infectious processes of a microbial origin.*

**Key words:** biofilm, research methods, antibiotic resistance, intestinal microflora

**Автор, ответственный за переписку:**

Артюх Татьяна Валерьевна – ассистент, Гродненский государственный медицинский университет;  
e-mail: taniaartsukh@gmail.com

**Corresponding author:**

Artsiukh Tatiana Valerievna – lecturer of the Chair of Microbiology, Virology and Immunology named after S. I. Gelberg, Grodno State Medical University;  
e-mail: taniaartsukh@gmail.com

**Для цитирования:** Артюх, Т. В. Современные способы исследования микробных биопленок кишечника / Т. В. Артюх, Т. Н. Соколова, В. М. Шейбак // Гепатология и гастроэнтерология. 2021. Т. 5, № 1. С. 30-36. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2021-5-1-30-36>

**For citation:** Artyukh TV, Sokolova TN, Sheibak VM. Modern methods for researching microbial biofilms of the enterobacteriaceae family. Hepatology and Gastroenterology. 2021;5(1):30-36. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2021-5-1-30-36>

Большинство накопленных знаний о свойствах кишечной микрофлоры относится к исследованиям, проводимым с чистой культурой или планктонными формами бактерий. Пример тому – данные о чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП). Для каждого отдельно взятого микроорганизма разработаны: процедуры определения чувствительности, параметры контроля качества, допустимые значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) препаратов по стандартам мировых систем глобального мониторинга резистентности [1, 2]. Бактерии могут существовать в природе в виде планктонных форм, однако подавляющее большинство (95-99%) микроорганизмов в кишечнике существуют не изолированно друг от друга, а в виде специфически организованных сообществ, биопленок (Biofilms, BF) [3]. BF сообщество – это организованная совокупность микроорганизмов, живущих во

внеклеточной полимерной матрице (Extracellular polymeric substance, EPS), которую они производят, прикрепившись к живой или неживой поверхности [4], что указывает на значимость EPS для защиты биопленки и стабильности ее функционирования. Структура и пространственная организация BF определяются видами бактерий и соотношением микроорганизмов и полимерного вещества в BF, составляющим 15% к 85% [5]. Окружение BF микроорганизмов кишечной группы индуцирует широко распространенный путь адаптивной аминокислотной ферментации, обеспечивающий преимущество колонизации E.coli за счет восстановления аминокислоты треонина до 1-пропанола. Это дает возможность кишечной палочке приспосабливаться к гипоксическим условиям, преобладающим в BF, прикрепленных к стенкам кишечника [6].

Пленкообразование – фактор колонизации, патогенности и вирулентности, предоставляет

бактериям массу преимуществ в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина [7, 8]. Так, МИК антибиотиков в отношении бактерий в BF может в тысячи раз превышать данный показатель для планктонных форм бактерий [9]. С этим связывают тот факт, что большинство бактериальных инфекций склонны к хронизации [10]. По данным Национального института здоровья (НИН) США, около 80% бактериальных инфекций человека ассоциированы с микробными BF и с трудом поддаются лечению АБП [11].

Недавние исследования показали, что механизм образования BF выступает ключевым фактором в инициации развития канцерогенеза толстой кишки. Кишечная микробная BF образуется во внутреннем слое слизи толстой кишки и состоит из полимикробных сообществ. BF приводит к перераспределению E-кадгерина эпителиальных клеток толстой кишки, увеличивает проницаемость кишечника и вызывает потерю функции кишечного барьера, что усиливает дисбактериоз кишечника. Эти результаты привели к идентификации микроорганизмов, которые несут протоонкогены – гены, связанные с канцерогенозом, в том числе бактерия *F. nucleatum*, за счет экспрессии адгезинов, таких как *Fap2* и *Fap2* (рис. 1) [12].

Установлена также связь между способностью к биопленкообразованию микроорганизмов, выделенных из кишечника, и реактивным артритом [13].

Таким образом, современные методы исследования позволяют выявить разные аспекты негативного влияния кишечных BF на организм человека, накоплено немало методов прямой и косвенной, а также качественной и количествен-

ной оценки биопленкообразования, включая недавнее открытие феномена пленкообразования [14]. В то же время нет единого мнения о наиболее подходящей классификации методов изучения BF. В обзоре представлены методы изучения BF, классифицированные по цели исследования и принципу метода.

В зависимости от цели исследования можно выделить следующие приоритетные направления в изучении BF:

1. Диагностика и мониторинг эффективности лечения биопленочных инфекций, непосредственно тканевых (tissue infections) и опосредованных инфекций (device-related infections), связанных с колонизацией патогенов на поверхности медицинских устройств и катетеров [15].

2. Изучение степени способности микроорганизмов образовывать BF и состоять в конкретном микробном сообществе [16].

3. Исследование генетически детерминированных программ, регулирующих процессы биопленкообразования на разных стадиях [17].

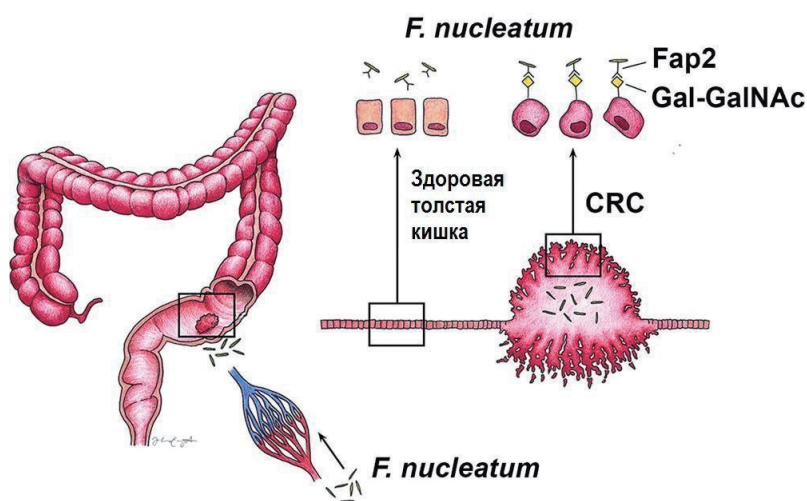
4. Оценка влияния факторов иммунного воздействия на BF [18].

5. Отдельно надо отметить изучение механизмов устойчивости BF к антибиотикам и разработку препаратов, которые способствуют ее диспергированию. Адьювантные механизмы молекул против BF микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae включают ингибирование через вмешательство в пути восприятия кворума, механизм адгезии, нарушение внеклеточной ДНК, белка, липополисахаридов, экзополисахаридов, первичных и вторичных мессенджеров, участвующих в сигнальных путях [19].

6. Определение и мониторинг антибиотико-чувствительности микроорганизмов в составе BF. Особое внимание на сегодняшний день привлекают экспресс-методы, позволяющие одновременно определять резистентность микроорганизмов кишечной группы к этиотропной терапии и их способность образовывать BF [20].

7. Разработка вакцин для профилактики биопленочной инфекции [21].

8. Изучение этапов формирования BF, роли структурных компонентов и их количественное измерение. Состав матрикса кишечной BF может сильно варьировать в зависимости от условий среды и вида микроорганизмов (факультативно-аэробные микроорганизмы: *Escherichia coli* (Lac+), *Escherichia coli* (Lac-), *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp.,



**Рисунок 1.** – взаимодействие протоонкогенных адгезинов *Fap2* и фузобактериального *GalNAc*-связывающего лектина [12]

**Figure 1.** – interaction of proto-oncogenic adhesins *Fap2* and fusobacterial *GalNAc*-binding lectin [12]

Enterobacter spp., Cronobacter spp., Bacillus spp., Staphylococcus spp., Enterococcus spp., грибы рода Candida; факультативно-анаэробные микроорганизмы: Bifidobacterium spp., Lactobacillus spp., Clostridium spp., Bacteroides spp., Actinomyces spp., Propionibacterium spp) [13]. Приведенные цели требуют понимания закономерностей процесса пленкообразования, который протекает в несколько этапов (рис. 2) [22].

Методы исследования BF можно разделить по принципу работы, который положен в основу метода:

Культуральные методы позволяют выращивать модели BF. Выделяют *in vitro*, *in situ*, *ex vivo*, и *in vivo* исследования. Наиболее часто используются *in vitro* методики, которые в свою очередь делятся на статические и динамические. Статические (закрытые) системы чаще используют в силу их простого исполнения. Для выполнения данных методик применяют пластиковые пластины, в которые вносят микробный инокулят. После инкубации планктон удаляют вместе с питательной средой, а сформировавшиеся BF подвергают дальнейшим исследованиям в зависимости от поставленных целей [23, 24]. Преимущество динамических (открытых) систем, когда микроорганизмы циркулируют в закрытой системе в жидкой питательной среде, заключается в максимальном приближении к условиям живых систем. Данные методы ограничены высокой стоимостью эксплуатации сложных конструкций. Отдельно рассматриваются микрокосмы – более сложные модели, имитирующие условия *in situ*. Они включают несколько видов бактерий и материал их естественной среды обитания. Теоретически как открытые, так и закрытые системы могут быть превращены в микрокосмы [25]. Культивирование *ex vivo*, как правило, проводится *in vitro*, однако эти термины не являются синони-

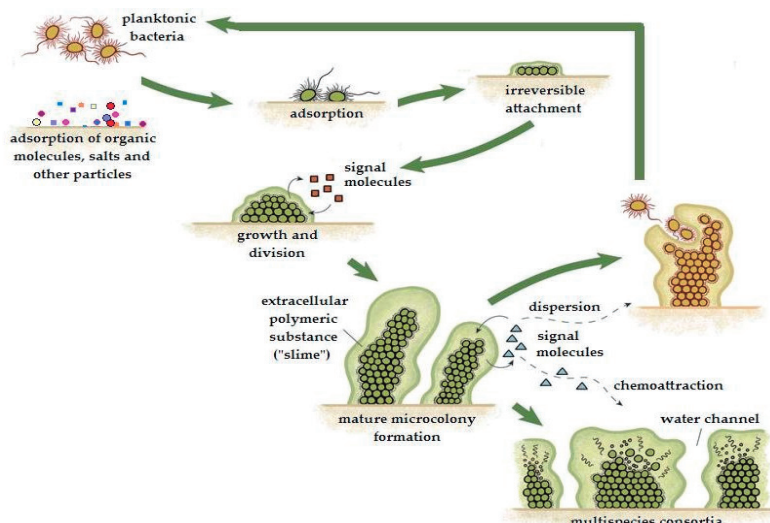
мами. В экспериментах BF культивируется на живых эукариотических клетках (HeLa, HMEC-1 Cells и т. д.) или тканях, извлеченных из организма, но в лабораторных условиях. Способы культивирования могут быть как динамическими, так и статическими [26]. В методах культивирования BF *in vivo* используются разные млекопитающие, насекомые, простейшие и растения. Это позволяет изучать особенности биопленкообразования, вирулентность и патогенность представителей микробных сообществ в условиях, приближенных к природным [27].

Результаты исследований культурального метода в закрытых системах имеют некоторую погрешность в силу разной степени адгезии одних и тех же штаммов микроорганизмов в зависимости от свойств абиотической поверхности, которую колонизирует BF [28]. Однако подавляющее большинство знаний о свойствах кишечных BF накоплено через использование статических методов. Наблюдается существенное преобладание исследований на BF *in vitro* над *in vivo*: работы по изучению BF в живом организме в режиме реального времени важны и информативны, но весьма малочисленны.

Микроскопические методы – это основной вариант визуализации BF. Световая микроскопия позволяет определить степень биопленкообразования, провести анализ клеточных компонентов BF, выявить спектр структур матрикса, их тинкториальные свойства. Возможен также подсчет клеток с использованием методик без окрашивания или с окраской как в световом микроскопе, так и с расширенными возможностями флуоресценции. Подсчет клеток может быть выполнен на незрелых BF *in situ*, если же BF перешла в трехмерную структуру, требуется гомогенизация взвеси микроорганизмов в камере Петрова-Хассера [14]. Использование флуоресцентной

микроскопии может улучшить видимость клеток и отличить живые клетки от мертвых, выделить общее покрытие поверхности и объем BF, а также толщину слоя BF – степень ее зрелости. Продукция полисахаридного компонента – наиболее важное условие появления зрелой BF [29]. В отличие от обычной световой микроскопии, электронная микроскопия (ЭМ) и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) признаны основными методами для визуализации ультраструктуры BF.

CLSM позволяет получать трехмерные изображения BF, изучать динамические процессы и взаиморасположение молекул в клет-



**Рисунок 2.** – Формирование биопленки и факторы, влияющие на каждую стадию [23]

**Figure 2.** – Biofilm formation and factors that affect each stage [23]

ке, наблюдать за миграцией плазмид [14]. ЭМ позволяет изучить состав и ультраструктуру BF, визуализировать эффекты воздействия на них разнообразных факторов. Преимущество растровой (сканирующей) ЭМ – четкое изображение топографии поверхности исследуемого образца. С помощью атомно-силовой (зондовой) микроскопии возможно получение информации о свойствах бактерий (пластичность, жесткость, элементный состав образца), а также механизмах адгезии бактерий к материалам и оценить шероховатость поверхности прикрепления биопленок. Трансмиссионная (просвечивающая) ЭМ, несмотря на сложность в пробоподготовке объектов, позволяет визуализировать наружные и внутренние структуры матрикса BF и ее клеток, а применение гистохимических методов контрастирования дает возможность определять химический состав ее компонентов. Точный анализ эффектов воздействия разных факторов на BF позволяет осуществлять последующая морфометрия снимков [30].

При использовании микроскопических методов обязательное условие – исключение распространенной ошибки: восприятия агаровых колоний за BF. Фактом несоответствия истинной BF выступает пространственная структура, отсутствие адгезии, разный уровень экспрессии генов [31].

Иммунологические методы основаны на выявлении антигенов микроорганизмов и вырабатываемых в ответ на их присутствие факторов иммунного ответа, в первую очередь антител. Как видно из немногочисленных исследований, клеточные и гуморальные механизмы врожденного иммунитета несостоятельны в элиминации BF из организма. В некоторой степени они зависят от степени зрелости BF и видового состава микроорганизмов, формирующих BF [30]. Что касается приобретенного клеточного иммунитета, то очаг поражения характеризуется массивной инфильтрацией Т-хелперами, выступающими в роли активных участников хронического биопленочного воспаления за счет продукции цитокинов [33]. Попытки поиска специфических особенностей биопленочного процесса (цитокринового профиля сыворотки, иммунограммы крови и т. д.) не выявили ожидаемых закономерностей. Более того, в некоторых случаях микроорганизмы могут извлекать пользу из контакта с иммунными эффекторами, что приводит к усилению пленкообразования [34]. Однако применение методов серотипирования и серодиагностики остается перспективным для идентификации BF. Так, при применении соответствующих моноклональных антител, меченых флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), возможно прямое быстрое определение состава и плотности BF. Существование антигенов теоретически позволяет разработать простые и воспроизводимые иммунохимические методы обнаружения биопленочного матрикса

в материале, полученном от пациента. Однако иммунологические методы, разрабатываемые в научно-исследовательских центрах, не имеют широкого применения в диагностике и лечении биопленочных инфекций. Такая же ситуация и с методами профилактики биопленочных инфекций. Выявленные антитела к частным антигенам (поверхностные адгезины *S. epidermidis*, коллаген-связывающий фактор *S. aureus*, фимбрии SMF-1 *St. maltophilia* и др.) не дают полной картины для создания вакцины от биопленочной инфекции [35]. Изучение взаимоотношений микробных сообществ с иммунной системой претендует на то, чтобы стать самостоятельным разделом иммунологической науки по вопросам антибиопленочного иммунитета.

Молекулярно-генетические методы применяются для идентификации генетических структур, контролирующих разные этапы пленкообразования, а также использования генов или белков в качестве мишеней для разработки терапевтических подходов. Важнейшим механизмом генетической регуляции в клеточном сообществе является чувство кворума (quorum sensing, QS). QS – это особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящий от плотности популяции. QS системы участвуют в контроле вирулентности бактерий и формирования BF. Так, повышенная регуляция генов, кодирующих токсины и белки, связанных с уклонением от иммунитета, играет важную роль в устойчивости BF *S. aureus* [36]. Специализированные вещества, аутоиндукторы способны экскретироваться клетками и накапливаться в среде во время роста клеточной популяции. Ответ клетки зависит от концентрации индуктора в среде, по достижении критического значения которого запускается определенная генетическая программа у каждой клетки сообщества. В результате достигается высокая степень координации экспрессии генов и механизмов адаптации [37]. Роль мессенджеров-аутоиндукторов первого типа у грамотрицательных бактерий выполняют N-ацетилгомосеринлактоны (AHL), у грамположительных бактерий – олигопептиды. Мессенджеры, также называемые аутоиндукторами второго типа, ответственные за передачу сигнала между грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами. Помимо QS регуляции, активно исследуется роль регуляторов формирования BF малых РНК и циклический ди-гуанозин-монофосфат (c-di-GMP), участвующий в контроле синтеза экзополисахаридов. Ингибиторы QS и c-di-GMP могут иметь фармацевтическое значение, на их основе разрабатываются лекарственные средства, направленные на диспергирование BF через системы генетической регуляции [38].

Основными способами определения экспрессии генов являются разные варианты секвенирования, в том числе секвенирование

нового поколения (16S-метагеномика, Шотган-метагеномика, анализ транскриптома микроорганизма, полногеномное секвенирование и другие). Секвенирование позволяет изучать генетический контроль образования ВФ, определить уровень экспрессии каждого белок-кодирующего гена в геноме, различать варианты мРНК, получающиеся в результате альтернативного сплайсинга [39]. Измерение биолюминесценции (BPI) – метод изучения и детекции ВФ, который используется как *in vitro*, так и *in vivo*. При искусственном введении в бактерии плазмид, ответственных за синтез люминесцирующего белка, проводится визуализация матрикса биопленки и адгезированных бактерий. С помощью упоминавшейся ранее CLSM, используя гены-репортеры, кодирующие флуоресцирующие белки, удалось показать, что интенсивность горизонтального переноса генов в ВФ выше, чем в планктонных культурах [40]. С помощью данного метода определена неоднородность бактерий в ВФ и выявлены клетки-персистеры, ответственные за выживание популяции во время воздействия факторов, летальных для основной массы клеток [41]. Проводить идентификацию микроорганизмов и их количественную оценку можно путем прямого воздействия на геномную ДНК, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Количественная ПЦР (кПЦР) может дать результаты в течение нескольких часов, исключив этапы, требующие длительной инкубации. Недостаток кПЦР – ее тенденция к завышению количества жизнеспособных клеток из-за присутствия ДНК, полученной из мертвых клеток, и свободной внеклеточной ДНК. Выявлять микроорганизмы по базам данных и определять различия в уровне экспрессии разных генов планктонных и биопленочных культур можно, используя технологию матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI) [42]. Такой сложный процесс, как образование ВФ, основан на работе определенных генов, выявление которых позволяет приблизиться к пониманию данного феномена.

Химические или титриметрические методы, в них используются красители, которые могут связываться или адсорбироваться на компонентах ВФ. Изложенные ниже методы заслуживают внимания, так как являются базой для дальнейших, более точечных исследований, имеют ряд преимуществ, а именно скорость выполнения, относительную простоту, точность получаемых результатов.

Анализ с кристаллическим фиолетовым (CV) позволяет получить показатели плотности всей ВФ, без учета соотношения количества клеток и массы ВФ. Метод основан на сорбции молекул красителя на структурах биопленки с последующей их отмывкой (десорбцией) в органических растворителях. Растворитель помещают в чистые планшеты и измеряют оптическую плотность. Ре-

зультаты плотности ВФ интерпретируют согласно оптической плотности окрашенного растворителя [14]. Предполагая, что содержание белка в клетках коррелирует с количеством клеток в ВФ, можно заменить показатели общего роста ВФ определением общего белка. Количественный анализ протеина – это быстрый и общедоступный метод анализа, позволяющий провести относительную оценку роста ВФ. Чтобы определить это, ВФ удаляют из субстрата и гомогенизируют в жидкой суспензии. После лизиса содержание белка можно измерить по изменению цвета в результате взаимодействия краситель-белок с помощью спектрометра. Однако этот метод подходит в качестве дополнения в сочетании с прямыми методами количественной оценки, но не как самостоятельно достаточный метод [43].

Анализ восстановления ХТТ (2,3-бис (2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-5- [карбонил (фениламин)] – 2Н-гидроксид тетразолия) позволяет оценить метаболическую активность ВФ. Метод достаточно прост, имеет высокую пропускную способность, не нарушает целостности клеток и дает численные показатели бактерицидной для ВФ концентрации воздействующих веществ, используется также для определения бактериальной обсемененности пищевых продуктов [33]. Выбранная соль тетразолия разводится и инкубируется с ВФ в течение 1-3 часов при температуре культивирования. В течение этого времени при наличии кофакторов и ферментов клеточного метаболизма бесцветная соль восстанавливается в формазон, интенсивность которого пропорциональна жизнеспособности клеток. Ее можно обнаружить визуально или с использованием спектрометра. Существует множество разных модификаций этого метода, в том числе и коммерческих [44].

Физические методы, когда общая биомасса ВФ может быть получена путем измерения сухой или влажной массы. Для определения сухой массы ростовой субстрат (обычно это предметное стекло) взвешивается, затем на его поверхности культивируется ВФ. Модель находится в печи при постоянной температуре до тех пор, пока вода полностью не будет удалена и не будет достигнут постоянный вес, после чего образец снова взвешивается. Этот метод прост в применении и доступен во всех микробиологических лабораториях, однако он не позволяет выявить различия между компонентами биопленки, такими как EPS, и разными типами микроорганизмов [39].

Результаты, полученные с помощью разных методов обнаружения ВФ (микробная активность, общее количество клеток, трехмерное распределение бактерий в ВФ, идентификация разных компонентов ВФ и др.), также могут различаться [45].

Исследование ВФ представлено многими методами, начиная от старых методик, таких

как подсчет КОЕ, до более современных методов – флуоресцентная маркировка BF в сочетании с математическим прогнозным моделированием (CUSUM) [46]. Новые знания о BF, полученные с помощью современных методов исследований, изменили взгляды на инфекционные заболевания. Разработка и стандартизация методов позволит применять их в практической

медицине для выбора рациональной антимикробной химиотерапии кишечных инфекций, оценки ее эффективности, выявления циркуляции в стационарах штаммов микроорганизмов с повышенной способностью к формированию BF, что расширит спектр знаний о влиянии BF в качестве факторов, способных модулировать течение ряда патологических процессов [12, 13].

### References

- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver. 8.0. 2018. Available from: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints) <https://goo.su/5eKk>
- Vsemirnaja organizacija zdravoohraneniya, Evropejskoe regionalnoe bjuro. Jepidnadzor za ustojchivostju k protivomikrobnym preparatam v Centralnoj Azii i Evrope. Available from: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0013/430132/WHO-CAESAR-manual-2019-RUS.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0013/430132/WHO-CAESAR-manual-2019-RUS.pdf) (Russian).
- Oliveira NM, Martinez-Garcia E, Xavier J, Durham WM, Kolter R, Kim W, Foster KR. Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. *PLoS Biol.* 2015;13(7):e1002191. doi: 10.1371/journal.pbio.1002191.
- Skariyachan S, Sridhar VS, Packirisamy S, Kumargowda ST, Challapilli SB. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018;63(4):413-432.
- Peng N, Cai P, Mortimer M, Wu Y, Gao C, Huang Q. The exopolysaccharide-eDNA interaction modulates 3D architecture of *Bacillus subtilis* biofilm. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):115. doi: 10.1186/s12866-020-01789-5.
- Létoffé S, Chalabaev S, Dugay J, Stressmann F, Audrain B, Portais JC, Letisse F, Ghigo JM. Biofilm microenvironment induces a widespread adaptive amino-acid fermentation pathway conferring strong fitness advantage in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* 2017;13(5):e1006800. doi: 10.1371/journal.pgen.1006800.
- Kernien JF, Johnson CJ, Bayless ML, Chovanec JF, Nett JE. Neutrophils From Patients With Invasive Candidiasis Are Inhibited by *Candida albicans* Biofilms. *Front Immunol.* 2020;11:587956. doi: 10.3389/fimmu.2020.587956.
- Schulze A, Mitterer F, Pombo JP, Schild S. Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance - development, composition and regulation - therapeutic strategies. *Microb Cell.* 2021;8(2):28-56. doi: 10.15698/mic2021.02.741.
- Artsiukh TV, Sokolova TN, Astrowskaja AB. Osobennosti rezistentnosti klinicheskikh izoljatov *E.coli* i *C.albicans*, obrazujushhiih bioplenku [The resistance peculiarities of *E.coli* and *C.albicans* clinical isolates forming a biofilm]. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Vestnik of Vitebsk State Medical University]. 2021;20(1):46-54. doi: 10.22263/2312-4156.2021.1.46. (Russian).
- Myasoedov AA, Toropov SS, Berezin GV, Karelkin VV, Totoev ZA, Shubnyakov II, Tikhilov RM. Faktory riska razvitiya periproteznoj infekcii posle pervichnogo jendoprotezirovaniya tazobedrennogo sustava [Risk factors for prosthetic joint infection after primary hip arthroplasty]. *Travmatologija i ortopedija Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2020;26(1):40-46. doi: 10.21823/2311-2905-2020-26-1-40-47. (Russian).
- Mirzaei R, Mohammadzadeh R, Alikhani MY, Shokri Moghadam M, Karampoor S, Kazemi S, Barfipoursalar A, Yousefimashouf R. The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices. *IUBMB Life.* 2020;72(7):1271-1285. doi: 10.1002/iub.2266.
- Chew SS, Tan LT, Law JW, Pusparajah P, Goh BH, Ab Mutalib NS, Lee LH. Targeting Gut Microbial Biofilms-A Key to Hinder Colon Carcinogenesis? *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):2272. doi: 10.3390/cancers12082272.
- Chelpachenko OE, Danilova EI, Chajnikova IN, Perunova NB, Ivanova EV. Bioplenki kishechnyh mikrosimbiontov u detej s reaktivnym artritom. *Lechashhij vrach.* 2018;(4):56-58. (Russian).
- Wilson C, Lukowicz R, Merchant S, Valquier-Flynn H, Caballero J, Sandoval J, Okuom M, Huber C, Brooks TD, Wilson E, Clement B, Wentworth CD, Holmes AE. Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Res Rev J Eng Technol* [Internet]. 2017;6(4). Available from: <http://www.rroj.com/open-access/quantitative-and-qualitative-assessment-methods-for-biofilm-growth-a-mini-review-.pdf>
- Stewart PS, Bjarnsholt T. Risk factors for chronic biofilm-related infection associated with implanted medical devices. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(8):1034-1038. doi: 10.1016/j.cmi.2020.02.027.
- Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omaid M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(4):305-11.
- Bridges AA, Bassler BL. The intragenus and interspecies quorum-sensing autoinducers exert distinct control over *Vibrio cholerae* biofilm formation and dispersal. *PLoS Biol.* 2019;17(11):e3000429. doi: 10.1371/journal.pbio.3000429.
- Qu Y, McGiffin D, Kure C, McLean J, Duncan C, Peleg AY. In vitro Evaluation of Medihoney Antibacterial Wound Gel as an Anti-biofilm Agent Against Ventricular Assist Device Driveline Infections. *Front Microbiol.* 2020;11:605608. doi: 10.3389/fmicb.2020.605608.
- Milstrey A, Rosslenbroich S, Everding J, Raschke MJ, Richards RG, Moriarty TF, Puetzler J. Antibiofilm efficacy of focused high-energy extracorporeal shockwaves and antibiotics in vitro. *Bone Joint Res.* 2021;10(1):77-84. doi: 10.1302/2046-3758.101.BJR-2020-0219.R1.
- Djatlou IA. K voprosu o primeneni i jekspress-metodov vyjavlenija antibiotikorezistentnosti v uslovijah jepidemii koronavirusnoj infekcii [On the question of the use rapid express-methods for determining antibiotic resistance during an epidemic of coronavirus infection]. *Bakteriologija* [Bacteriology]. 2020;5(2):5-7. (Russian).
- Jiang Y, Geng M, Bai L. Targeting Biofilms Therapy: Current Research Strategies and Development Hurdles. *Microorganisms.* 2020;8(8):1222. doi: 10.3390/microorganisms8081222.
- López Y, Soto SM. The Usefulness of Microalgae Compounds for Preventing Biofilm Infections. *Antibiotics (Basel)*. 2019;9(1):9. doi: 10.3390/antibiotics9010009.
- Mardanov AM; Ilinskaja ON, editor. Bioplenki: osnovnye principy organizacii i metody issledovanija. Kazan: Institut fundamentalnoj mediciny i biologii; 2016. 44 p. (Russian).
- Otto SB, Martin M, Schäfer D, Hartmann R, Drescher K, Brix S, Dragoš A, Kovács ÁT. Privatization of Biofilm Matrix in Structurally Heterogeneous Biofilms. *mSystems.* 2020;5(4):e00425-20. doi: 10.1128/mSystems.00425-20.
- Arweiler NB, Auschill TM, Heumann C, Hellwig E, Al-Ahmad A. Influence of Probiotics on the Salivary Microflora Oral Streptococci and Their Integration into Oral Biofilm. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(11):803. doi: 10.3390/antibiotics9110803.
- Meeke DG, Beenken KE, Mills WB, Loughran AJ, Spencer HJ, Lynn WB, Smeltzer MS. Evaluation of Antibiotics Active against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Based on Activity in an Established Biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(10):5688-94. doi: 10.1128/AAC.01251-16.
- Torres M, de Cock H, Celis Ramírez AM. In Vitro or In Vivo Models, the Next Frontier for Unraveling Interactions between *Malassezia* spp. and Hosts. How Much Do We Know? *J Fungi (Basel)*. 2020;6(3):155. doi: 10.3390/jof6030155.
- Buhmann MT, Stiefel P, Maniura-Weber K, Ren Q. In Vitro Biofilm Models for Device-Related Infections.

- Trends Biotechnol.* 2016;34(12):945-948. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.05.016.
29. Devaraj A, González JF, Eichar B, Thilliez G, Kingsley RA, Baker S, Allard MW, Bakaletz LO, Gunn JS, Goodman SD. Enhanced biofilm and extracellular matrix production by chronic carriage versus acute isolates of *Salmonella* Typhi. *PLoS Pathog.* 2021;17(1):e1009209. doi: 10.1371/journal.ppat.1009209.
  30. Petuhova IN, Dmitrieva NV, Grigorevskaja ZV, Bagirova NS, Tereshhenko IV. Infekcii, svjazannye s obrazovaniem bioplenok. Zlokachestvennyye opuholi. 2019;9(3S1)26-31. doi: 10.18027/2224-5057-2019-9-3s1-26-31. (Russian).
  31. Okulich VK, Kabanova AA, Plotnikov FV. Mikrobnye bioplenki v klinicheskoy mikrobiologii i antibakterialnoj terapii. Vitebsk: VGMU; 2017. 300 p. (Russian).
  32. Movsesjan NA, Movsesjan LA, Torosjan TA. Vlijanie nejtrofilov krovi na matriks bioplenok *S. Aureus*. In: Shhastnyj AT, editor. *Aktuanye voprosy sovremennoj mediciny i farmacii*. Materialy 72-j nauchno-prakticheskoy konferencii studentov i molodyh uchjonyh; 2020 Maj 12-13; Vitebsk. Vitebsk: VGMU; 2020. p. 605-607. (Russian).
  33. Thanabalasuriar A, Scott BNV, Peiseler M, Willson ME, Zeng Z, Warren P, Keller AE, Sureward B, Dozier EA, Korhonen JT, Cheng LI, Gadjeva M, Stover CK, DiGiandomenico A, Kubes P. Neutrophil Extracellular Traps Confine *Pseudomonas aeruginosa* Ocular Biofilms and Restrict Brain Invasion. *Cell Host Microbe.* 2019;25(4):526-536.e4. doi: 10.1016/j.chom.2019.02.007.
  34. Zhilcova IV, Semenova VM, Torosjan TA, Movsesjan NA. Vlijanie urovnja beta-laktamaznoj aktivnosti rotovoj zhidkosti na jeffektivnost antibakterialnoj terapii. *Stomatolog.* 2018;4(31):34-38. doi: org/10.32993/stomatolog.2018.4(31).6. (Russian).
  35. Shahrooei M, Hira V, Khodaparast L, Khodaparast L, Stijlemans B, Kuchariková S, Burghout P, Hermans PW, Van Eldere J. Vaccination with ScaC decreases *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Infect Immun.* 2012;80(10):3660-8. doi: 10.1128/IAI.00104-12.
  36. Yadav P, Verma S, Bauer R, Kumari M, Dua M, Johri AK, Yadav V, Spellerberg B. Deciphering Streptococcal Biofilms. *Microorganisms.* 2020;8(11):1835. doi: 10.3390/microorganisms8111835.
  37. Urwin L, Okurowska K, Crowther G, Roy S, Garg P, Karunakaran E, MacNeil S, Partridge LJ, Green LR, Monk PN. Corneal Infection Models: Tools to Investigate the Role of Biofilms in Bacterial Keratitis. *Cells.* 2020;9(11):2450. doi: 10.3390/cells9112450.
  38. Zhang LJ, Yu SB, Li WG, Zhang WZ, Wu Y, Lu JX. Polymorphism analysis of virulence-related genes among *Candida tropicalis* isolates. *Chin Med J.* 2019;132(4):446-453. doi: 10.1097/CM9.0000000000000069.
  39. Achinas S, Yska SK, Charalampogiannis N, Krooneman J, Euverink GJW. A Technological Understanding of Biofilm Detection Techniques: A Review. *Materials (Basel).* 2020;13(14):3147. doi: 10.3390/ma13143147.
  40. Gallego-Hernandez AL, DePas WH, Park JH, Teschler JK, Hartmann R, Jeckel H, Drescher K, Beyhan S, Newman DK, Yildiz FH. Upregulation of virulence genes promotes *Vibrio cholerae* biofilm hyperinfectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(20):11010-11017. doi: 10.1073/pnas.1916571117.
  41. Simonova IR, Golovin SN, Verkina LM, Bereznjak EA, Titova SV. Metody kultivirovanija i izuchenija bakteriálnyh bioplenok [Methods of culturing and studying bacterial biofilms]. *Izvestiya vuzov. Severo-Kavkazskii region. Estestvennyye nauki* [Bulletin of higher education Institutes North Caucasus region]. 2017;(1):73-79. doi: 10.18522/0321-3005-2017-1-73-79. (Russian).
  42. Santos T, Théron L, Chambon C, Viala D, Centeno D, Esbelin J, Hébraud M. MALDI mass spectrometry imaging and in situ microproteomics of *Listeria monocytogenes* biofilms. *J Proteomics.* 2018;187:152-160. doi: 10.1016/j.jprot.2018.07.012.
  43. Shlepotina NM, Peshikova MV, Kolesnikov OL, Shishkova YS. Sovremennye predstavlenija o mehanizmah vzaimodejstvija bioplenki i faktorov kletocchnogo immuniteta [Modern conceptions about the mechanisms of interaction between biofilm and cellular immunity factors]. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii* [Journal of microbiology epidemiology immunobiology]. 2020;97(1)83-90. doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-1-83-90. (Russian).
  44. Van den Driessche F, Rigole P, Brackman G, Coenye T. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *J Microbiol Methods.* 2014;98:31-34. doi: 10.1016/j.mimet.2013.12.011.
  45. Azeredo J, Azevedo NF, Briand R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, Desvaux M, Di Bonaventura G, Hébraud M, Jaglic Z, Kačániová M, Knøchel S, Lourenço A, Mergulhão F, Meyer RL, Nychas G, Simões M, Tresse O, Sternberg C. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol.* 2017;43(3):313-351. doi: 10.1080/1040841X.2016.1208146.
  46. Borzykh DA, Zazykov AA. O prakticheskoy primenimosti treh CUSUM-metodov k obnaruzheniju strukturnyh sdvigov v EGARCH-modeljah [ On the practical applicability of three CUSUM-methods for structural breaks detection in EGARCH-models]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Prikladnaja matematika. Informatika. Processy upravlenija* [Vestnik of Saint Petersburg University. Applied mathematics. Computer science. Control processes]. 2020;16(1):19-30. doi: https://doi.org/10.21638/11701/spbu.10.2020.102. (Russian).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

**Сведения об авторах:**

Артюх Татьяна Валерьевна – ассистент, Гродненский государственный медицинский университет; e-mail: taniaartsuikh@gmail.com, ORCID: 0000-0001-7368-0623;

Соколова Татьяна Николаевна – канд. мед. наук, доц., Гродненский государственный медицинский университет; e-mail: sakalova@tut.by, ORCID: 0000-0002-4075-4515;

Шейбак Владимир Михайлович – д-р мед. наук, проф.; e-mail: VSheibak@gmail.com, Гродненский государственный медицинский университет ORCID: 0000-0001-6829-447X.

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

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee.

**Information about authors:**

Artsuikh Tatiana Valerievna – lecturer of the Chair of Microbiology, Virology and Immunology named after S. I. Gelberg, Grodno State Medical University; e-mail: taniaartsuikh@gmail.com, ORCID: 0000-0001-7368-0623;

Sokolova Tatiana Nikolaevna – PhD (Medicine), Associate Professor; Grodno State Medical University; e-mail: sakalova@tut.by, ORCID: 0000-0002-4075-4515;

Sheibak Vladimir Mikhailovich – PhD, MD (Medicine), Professor; Grodno State Medical University; e-mail: VSheibak@gmail.com, ORCID: 0000-0001-6829-447X.

Поступила: 13.03.2021

Принята к печати: 20.04.2021

Received: 13.03.2021

Accepted: 20.04.2021