

УДК 615.33+615.281].03:579.861.2].076.9

ВЛИЯНИЕ ХЛОРГЕКСИДИНА И «ПРОНТОСАНА» НА БИОПЛЕНКУ, СФОРМИРОВАННУЮ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*)

Ю. А. Еньчева^{1,2*}, М. В. Кузнецова^{2,3}, Е. А. Рубцова³, Е. В. Афанасьевская²,
В. А. Самарцев²

¹ Городская клиническая больница № 21, г. Пермь,

² Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е. А. Вагнера,

³ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Российская Федерация

CHLORHEXIDINE AND «PRONTOSAN» EFFECT ON BIOFILM FORMED BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (*IN VITRO* STUDY)

Yu. A. Encheva^{1,2*}, M. V. Kuznetsova^{2,3}, E. A. Rubtsova³, E. V. Afanasievskaya²,
V. A. Samartsev²

¹ City Clinical Hospital № 21, Perm,

² Perm State Medical University named after E. A. Wagner,

³ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of Ural Department of Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Цель. Изучить морфометрические показатели моновидовой биопленки, образованной *S. aureus*, после воздействия хлоргексидина и «Пронтосана»[®].

Материалы и методы. Объектами изучения служили референтный штамм *S. aureus* ATCC[®] 29213 и клинические изоляты *S. aureus* ($n = 39$). Биопленкообразование изучали согласно G. F. O'Toole и R. Kolter (1998).

Результаты. Антисептики хлоргексидин и «Пронтосан»[®] вызывали изменение структуры стафилококковой биопленки, что характеризовалось появлением участков разрыхления и увеличением показателя шероховатости поверхности, а также повреждения клеток, которые проявлялись в уменьшении диаметра и снижении количества жизнеспособных бактерий. Экспозиция с антисептиками приводила к снижению величины/массивности биопленки, образованной как на гидрофильной, так и гидрофобной поверхности. Показатель Me (Q1–Q3), характеризующий величину биопленки на гидрофобной поверхности, после воздействия «Пронтосана»[®] составил 0,154 (0,095–0,287), а хлоргексидина – 0,165 (0,118–0,268) ед. ОП_{50%}. Достоверность отличий в группах показана только для пары контрольные образцы/«Пронтосан»[®] ($p = 0,000128$).

© Еньчева Ю. А., Кузнецова М. В., Рубцова Е. А., Афанасьевская Е. В., Самарцев В. А., 2015

e-mail: yenchewa@mail.ru

тел. 8 (342) 282 76 55

[Еньчева Ю. А. (*контактное лицо) – врач-хирург ожогового отделения, аспирант кафедры общей хирургии № 1; Кузнецова М. В. – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии с курсом КДЛ, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии; Рубцова Е. А. – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории алканотрофных микроорганизмов; Афанасьевская Е. В. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии с курсом КДЛ; Самарцев В. А. – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии № 1].

Выводы. Использованные препараты, в большей степени «Пронтосан®», показали высокую активность в «хирургических» концентрациях в отношении бактериальных биопленок, образованных *S. aureus*, вызывая изменение их структуры. Экспозиция с антисептиками приводила к снижению величины/массивности биопленки, образованной как на гидрофильной, так и гидрофобной поверхности. Оба исследованных препарата высокоактивны в отношении стафилококковых биопленок (с небольшим преимуществом «Пронтосана®»).

Ключевые слова. *Staphylococcus aureus*, биопленка, хлоргексидин, «Пронтосан®».

Aim. To study the morphological indices of the monospecific biofilm formed by *S. aureus* after chlorhexidine and “Prontosan®” exposure.

Materials and methods. The study objects included referent strain *S. aureus* ATCC®29213 and clinical isolates *S. aureus* ($n = 39$). Biofilm formation was investigated by O’Toole G.F. and Kolter R. (1998).

Results. Antiseptics chlorhexidine and “Prontosan®” caused changes in the structure of staphylococcal biofilm that was characterized by appearance of the areas of discharge and rise in surface roughness index as well as damages of cells which were manifested by decrease in diameter and number of viable bacteria. Antiseptic exposure led to decline in size/massiveness of biofilm formed both on hydrophilic and hydrophobic surface. [Me (Q1–Q3)] index characterizing the size of biofilm on the hydrophobic surface was 0,154 (0,095–0,287) after “Prontosan®” exposure, but after chlorhexidine exposure it was 0,165 (0,118–0,268) un. OP_{50} . Reliability of differences in the groups was indicated only for control/“Prontosan®” pair ($p = 0,000128$).

Conclusions. The used drugs, mostly “Prontosan®”, showed a high activity in “surgical” concentrations in relation to bacterial biofilms formed by *S. aureus* causing changes in its structure. Antiseptic exposure led to decrease in size/massiveness of biofilm formed both on hydrophilic and hydrophobic surfaces. Both drugs are high active in relation to staphylococcal biofilm with a slight benefit of “Prontosan®”.

Key words. *Staphylococcus aureus*, biofilm, chlorhexidine, prontosan.

ВВЕДЕНИЕ

Стафилококки общепризнанны наиболее значимыми микроорганизмами, вызывающими у человека заболевания, ассоциированные с биопленками [0]. Этот исключительный статус обусловлен их высокой встречаемостью в составе резидентной микрофлоры кожи и слизистых оболочек человека [11]. *Staphylococcus aureus* часто обнаруживается на катетерах и других внедренных в организм медицинских устройствах, а также при раневой, в том числе ожоговой, инфекции [2, 3, 10]. Считается, что до 80 % клинических изолятов *S. aureus* могут формировать биопленки [19]. Формирование «биофильма» начинается с прикрепления клеток бактерий к абиотической поверхности или связывания с белковыми факторами макроорганизма, такими как фибрин и коллаген (присутствуют в ране), фибриноген и фибронектин [12]. Рецепторы, опосредующие у стафилококков связывание с этими

факторами, были названы MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules – микробные поверхностные компоненты, распознающие адгезивные молекулы матрикса). Известно, что в «зрелых» биопленках бактерии защищены от влияния антибактериальных и антисептических препаратов, что часто является основной причиной их неэффективности [14]. Эти данные заставили по-новому рассматривать роль применяемых местно лечебных средств, особенно в хирургической практике, и стимулировали разработку и использование в клинике более эффективных, часто комбинированных композиций, содержащих в составе как бактерицидные вещества, так и компоненты, разрушающие защитный полисахаридный матрикс [5, 6]. Учитывая, что *S. aureus* является одним из наиболее частых возбудителей инфекций, связанных с биопленочным процессом, представляется важным оценить влияние на биопленку, образованную штаммами данного вида, хлор-

гексидина и «Пронтосана» – двух антисептиков, широко используемых в хирургической практике.

Цель работы – изучить морфометрические показатели моновидовой биопленки, образованной *S. aureus*, после воздействия хлоргексидина и «Пронтосана».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами для изучения служили референтный штамм *S. aureus* ATCC®29213 и клинические изоляты *S. aureus* ($n = 39$).

Биопленкообразование изучали согласно G. F. O'Toole и R. Kolter (1998) [15]. Для получения биопленок использовали полистироловые плоскодонные 96-луночные планшеты («Медполимер», Россия). Суточные культуры бактерий, выращенные на среде Луриа–Бертани (LB-среда), стандартизовали до 2,0 по McFarland, разводили в LB-бульоне 1:100 и вносили в лунки по 0,2 мл. Биопленки выращивали статически в термостате при температуре 37 °С в течение 24 ч. После удаления планктонной культуры в опытную часть лунок вносили раствор 0,5%-ного хлоргексидина биглюконата (ХГ) или «Пронтосан» (ПС, ундециленовый амидопропил-бетаин – 0,1 %, полиаминопропил бигуанид (полигександид) – 0,1 %), выдерживали 1 ч, 3-кратно отмывали 0,1 М фосфатно-буферной средой (ФБС, рН 7,2 ± 0,2). Выбранная концентрация хлоргексидина соответствовала наиболее часто используемой в хирургической практике. В контрольные лунки (без антисептика) на срок экспозиции добавляли ФБС. Биомассу биопленки оценивали по уровню экстракции этанолом 0,1%-ного водного раствора генцианвиолета, который измеряли на микропланшетном ридере Benchmark Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 580 нм в единицах оптической плотности (Ед, ОП₅₈₀). Степень биопленкообразования соответство-

вала интенсивности окрашивания содержимого лунок.

Во втором случае биопленки выращивали в чашках Петри на покровных стеклах (18×60 мм), погруженных в LB-бульон, при температуре 37 °С в течение 20 ч. Затем стекла 3-кратно отмывали в 0,01 М ФБС, заливали раствором хлоргексидина или «Пронтосана» (10 мл), выдерживали 1 ч, отмывали ФБС, просушивали препараты на воздухе в течение 20 мин. Изучение биопленок проводили с помощью комбинированной системы, состоящей из атомно-силового Asylum MFP-3D (Asylum Research Inc., США) и конфокального лазерного сканирующего микроскопов (Olympus FV1000, Япония), в лаборатории атомно-силовой и конфокальной микроскопии на базе *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Подсчет клеток и оценку их жизнеспособности выполняли после получения конфокальных лазерных сканирующих изображений, для чего биопленки предварительно окрашивали красителем Live/Dead® (Syto9/пропидиум йодид) BacLight™ Bacterial Viability Kits (Invitrogen, США) и 15 мин инкубировали в темноте. Количество жизнеспособных (зеленые) и нежизнеспособных (красные) клеток подсчитывали не менее чем в 5 полях после нанесения сетки на образец. Профили поверхности биопленок штаммов изучали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Сканирование осуществляли в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50–90 кГц и константой жесткости 0,5–4,4 Н/м. Для определения линейных размеров клеток (диаметр) и характеристики структуры поверхности биопленки (шероховатость) получали двух- и трехмерные топографические изображения бактерий. Толщину биопленки определяли путем построения профиля поверхности на основе АСМ-изображения и по-

слоистого сканирования слоев биопленки, предварительно окрашенной с помощью флюоресцирующей метки Live/Dead®. Обработку полученных изображений проводили с помощью программы Igor Pro 6.22A (WaveMetrics, США).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Excel 2003 и Statistica 6.0. Показатели представлены в виде средней арифметической и ее ошибки ($M \pm m$). В случае, если распределение данных в выборке не могло характеризоваться как нормальное, рассчитывали медиану (Me), квартили (Q_1 ; Q_3) и межквартильный размах. Для сравнения двух зависимых выборок применяли тест Уилкоксона. При $p < 0,05$ делался вывод о наличии статистически значимой разницы между сравниваемыми выборками.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования влияния антисептиков на биопленку, сформированную клиническими изолятами *S. aureus* на гидрофобной поверхности в лунках полистиролового планшета, показали, что биомасса 20-часовой биопленки уменьшалась после воздействия «Пронтосана®» у 29 штаммов (72,5 %), а хлоргексидина – только у 13 (32,5 %) культур. Показатель, характеризующий величину/массивность биопленки, в контрольных образцах (без действия антисептиков) варьировался в пределах от $0,083 \pm 0,014$ до $0,410 \pm 0,068$ ед. ОП₅₈₀, Me (Q_1 – Q_3) составили 0,201 (0,112–0,296) ед. ОП₅₈₀, тогда как после воздействия «Пронтосана®» – 0,154 (0,095–0,287), а хлоргексидина – 0,165 (0,118–0,268) ед. ОП (рис. 1). Достоверность отличий в группах выявлена только для пары контрольные образцы «Пронтосан®» ($p = 0,000128$). При сравнении массивности биопленки, образованной бактериями *S. aureus* ATCC, оказалось, что этот пока-

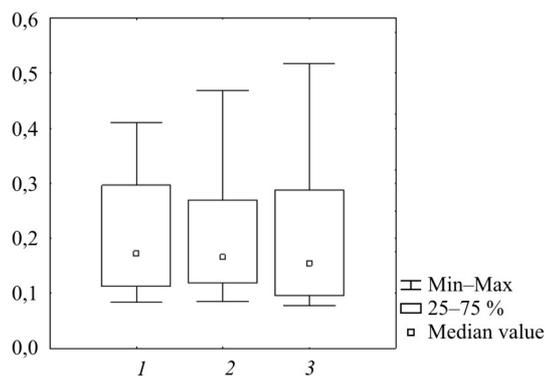


Рис. 1. Диаметр показателя биопленкообразующей способности нозокомиальных штаммов *S. aureus* без действия антисептиков (контрольные образцы) (1), после часового воздействия хлоргексидина (2) и «Пронтосана®» (3)

затель статистически значимо снижался только при воздействии «Пронтосана®».

При анализе изображений на стекле, полученных с помощью АСМ, выявлено, что моновидовая биопленка, образованная *S. aureus* ATCC, без обработки антисептиками представлена хорошо разросшимися кокками и имеет структуру плотно прилегающих друг к другу клеток (рис. 2). После часовой обработки биопленок обоими антисептиками появляются участки разряжения, более выраженные после контакта с «Пронтосаном®», один из компонентов которого обладает свойствами поверхностно-активного вещества, разрушая биопленочную структуру, обуславливая в том числе и неравномерное распределение компонентов матрикса в биопленке.

Действительно, как видно из таблицы, шероховатость поверхности биопленки (изменение высоты от среднего) существенно увеличивалась после экспозиции с хлоргексидином и «Пронтосаном®» в 1,5 и 3 раза соответственно. Воздействие антисептиков изменяло и размер клеток стафилококков: их диаметр становился достоверно меньше в обоих вариантах. Оценка жизнеспособности клеток с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показала,

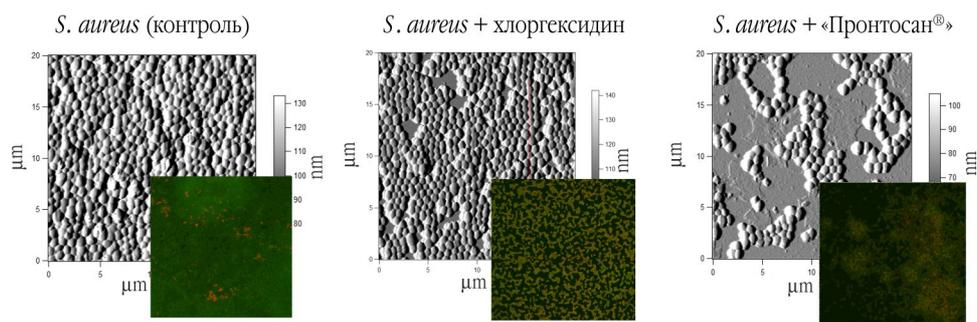


Рис. 2. АСМ-изображение 20-часовой биопленки, образованной штаммом *S. aureus* ATCC на стекле, и фото клеток (вставки), полученные путем сканирования среднего слоя биопленки, предварительно окрашенной с помощью флюоресцирующей метки Live/Dead®

что клетки в контрольной биопленке в основном живые, но после контакта с антисептиками большинство становилось поврежденными или они не визуализировались (см. таблицу). При сравнительном анализе количества жизнеспособных клеток в поверхностном и более глубоких слоях биопленки статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$) ни в одном из вариантов, что, скорее всего, связано с ее малой величиной (образование в течение 20 часов).

Оценка массивности/толщины биопленки, образованной бактериями *S. aureus* на стекле, путем послойного сканирования слоев биопленки и на основе АСМ-изображения показала, что экспозиция с антисептиками статистически значимо приводила к снижению данного параметра при обоих микроскопических подходах (см. таблицу). Существенное различие в контрольных образцах ($4,85 \pm 0,57$ против $19,45 \pm 0,5$ мкм) определяется методологией оценки: в первом случае толщину биопленки определяли только на основе клеточного компонента, а во втором – на основе построения профиля ее поверхности, когда учитывается и внеклеточный полимерный матрикс.

В многочисленных работах продемонстрирован выраженный антибактериальный эффект хлоргексидина и полигексанида, а также препаратов на его основе, таких как «Пронтосан®», в исследованиях *in vivo* [1, 6, 8].

Морфометрические показатели биопленки, образованной штаммом *S. aureus* ATCC, после экспозиции с антисептиками

Показатель	Вариант опыта			
	<i>S. aureus</i> (контроль)	<i>S. aureus</i> и ХГ	<i>S. aureus</i> и ПС	
Шероховатость, нм	$105 \pm 32,4$	$150 \pm 26,5^*$	$370 \pm 37,0^{*a}$	
Диаметр клеток, мкм	$1,12 \pm 0,08$	$0,86 \pm 0,1^*$	$0,85 \pm 0,04^*$	
Количество клеток на единицу площади ¹	Жизнеспособных	$36,4 \pm 4,6$	$3,4 \pm 1,7^*$	Нет ^{*a}
	Всего	Сплошь	Сплошь	$90,2 \pm 17,5^{*a}$
Толщина биопленки	ОП ₅₈₀ ²	$0,232 \pm 0,049$	$0,213 \pm 0,045$	$0,123 \pm 0,068^*$
	Значение по оси Y, мкм ³	$19,45 \pm 0,50$	$3,53 \pm 0,23^*$	$4,47 \pm 1,06^*$
	Значение по оси Y, мкм ⁴	$4,85 \pm 0,57$	$3,76 \pm 0,34^*$	$3,27 \pm 0,85^*$

Примечание: ¹ – подсчитывали не менее чем в 5 полях после нанесения сетки на фото, полученного путем сканирования среднего слоя биопленки, предварительно окрашенной с помощью флюоресцирующей метки Live/Dead; ² – определяли спектрофотометрическим методом по элюированию 0,1%-ного генцианвиолета (биопленка в планшете); ³ – определяли путем построения профиля на основе АСМ-изображения (биопленка на стекле); ⁴ – определяли путем послойного сканирования слоев биопленки, предварительно окрашенной с помощью флюоресцирующей метки Live/Dead® (биопленка на стекле); * – различия статистически значимы при сравнении с контрольными образцами ($p \leq 0,05$), ^a – различия статистически значимы при сравнении с воздействием ХГ.

Показано, что комбинация полигексанида с поверхностно-активным веществом позволила не только повысить его антимикробную активность, но и придать дополнительные положительные свойства, в том числе очистительную способность и активность в отношении микробных биопленок. Изучение биопленок *in vitro* позволяет провести качественный и количественный анализ влияния различных антибактериальных веществ на бактериальные биопленки на большом числе штаммов, более детально понять механизмы их действия, напрямую сравнить несколько препаратов между собой.

Полученные в работе данные согласуются с результатами многочисленных исследований, свидетельствующих о негативном влиянии антисептиков на биомассу биопленки, сформированную бактериями *S. aureus*. Показано, что величина/массивность биопленки уменьшалась у трети штаммов при действии хлоргексидина и почти у 2/3 изолятов – при действии «Пронтосана[®]». Тем не менее достоверность отличий в группах выявлена только для пары контрольные образцы/«Пронтосан[®]» ($p = 0,000128$).

Использование атомно-силовой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии позволило провести визуальную и количественную оценку влияния двух антисептиков на «биопленочный» фенотип *S. aureus*. Показано изменение морфологии клеток (они становятся меньше по размеру) и структурной организации бактериальных биопленок после действия антисептиков. Механизм действия хлоргексидина заключается во взаимодействии с фосфатными группами на бактериальной поверхности, вследствие чего возникает смещение осмотического равновесия, нарушение целостности мембраны клетки и ее гибель [0, 0]. Полигексанид принадлежит к той же группе, что и хлоргексидин, но отличается отсутствием двух фрагментов п-хлоранилина (отсутствуют токсические метаболиты) и количеством активных участков в молекуле,

а этот параметр имеет важное значение в антимикробной активности препарата [13]. При оценке действия двух антисептиков на жизнеспособность клеток в биопленке выявлено, что при экспозиции с хлоргексидином число живых клеток статистически значимо снизилось, а при экспозиции с «Пронтосаном[®]» их не было вообще. Тот факт, что не все клетки в составе биопленки погибают после воздействия на нее антибактериальных веществ, доказан многочисленными исследованиями. Так, в работе K. Smith и I. S. Hunter (2008) показано, что до 11 % бактерий *S. aureus* остаются в биопленках жизнеспособными. Авторы проверяли чувствительность «зрелых» биопленок к различным антисептикам, включая хлоргексидин, при этом биоцидный препарат был использован даже в более высокой концентрации (4 %), чем в нашем исследовании [18]. Устойчивость клеток к антибиотикам/антисептикам может быть связана с фильтрующей способностью матрикса, заполняющего межклеточные пространства и затрудняющего доставку антибиотика во внутренние слои биопленки [7, 17]. Более выраженный эффект влияния «Пронтосана[®]» на общее число клеток в биопленке и их жизнеспособность связан с действием амидопропил-бетаина, приводящего к ее «разрыхлению», уменьшению количества внеклеточного матрикса, что увеличивает доступ антисептика к клеткам биопленки.

Выводы

Одним из основных методов лечения хирургической раны является местное воздействие антисептиками, обуславливающее предупреждение бактериальной колонизации и/или микробную деконтаминацию раны. На современном этапе особое внимание уделяется препаратам, обладающим не только бактерицидными свойствами, но и способностью эффективно разрушать и удалять биологические пленки с раневой поверхности. Проведенное исследование позволило

получить информацию о влиянии на «зрелые» биопленки, сформированные референтным и клиническими штаммами *S. aureus*, двух наиболее часто применяемых в хирургической практике антисептиков – хлоргексидина и «Пронтосана®». Использованные препараты, в большей степени «Пронтосан®», показали высокую активность в «хирургических» концентрациях в отношении бактериальных биопленок, образованных *S. aureus*, вызывая изменение ее структуры, что характеризовалось появлением участков разрыхления и увеличением показателя шероховатости поверхности, а также повреждению клеток, которые проявлялись в уменьшении диаметра и снижении количества жизнеспособных бактерий. Экспозиция с антисептиками приводила к снижению величины/массивности биопленки, образованной как на гидрофильной, так и гидрофобной поверхности. По-видимому, оба препарата высокоактивны в отношении стафилококковых биопленок (с небольшим преимуществом «Пронтосана®»).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Алексеев А. А., Бобровников А. Э., Крутиков М. Г. Опыт применения полигексанида для местного лечения инфицированных ожоговых ран. *Consilium medicum. Хирургия* 2006; 1: 55–58.
2. Бережанский Б. В., Жевнерев А. А. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2006; 8 (2): 130–144.
3. Гординская Н. А., Сабирова Е. В., Абрамова Н. В. Фенотипические и молекулярно-генетические особенности возбудителей раневой ожоговой инфекции. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2012; (4): 342–346.
4. Зверьков А. В., Зузова А. П. Хлоргексидин: прошлое, настоящее и будущее одного из основных антисептиков. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2013; 15 (4): 279–285.
5. Крылов К. М., Крылов П. К. Современные возможности местного лечения ожогов. *Амбулаторная хирургия* 2010; 1 (37): 30–35.
6. Харитонов Ю. М., Фролов И. С. Новые технологии в лечении больных одонтогенной гнойной инфекцией. *Фундаментальные исследования* 2014; 7: 582–584.
7. Чеботарь И. В., Маянский Н. А., Кончакова Е. Д. Новый метод исследования антибиотикорезистентности бактериальных биопленок. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2012; 14 (4): 303–308.
8. Чмырёв И. В., Скворцов Ю. Р., Кичемасов С. Х. Использование «Пронтосана» после поздней некрэтомии при глубоких ожогах. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова* 2010; 5 (2): 49–54.
9. Шайхутдинова А. Р. Механизмы модуляции работы рецепторно-канального комплекса хлоргексидином. *Доклады академии наук* 2005; 402: 427–429.
10. Agarwal A., Singh K. P., Jain A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010; 58: 147–160.
11. Belkum A. Staphylococcal colonization and infection: homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2006; 19: 339–344.
12. Clarke S. R., Foster S. J. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv. Microb. Physiol.* 2006; 51: 187–224.
13. Hübner N. O., Kramer A. Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2010; 23: 17–27.
14. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Microbiol. Immunol.* 2008; 322: 107–131.

15. O'Toole G. F., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 1998; 30: 295–304.
16. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2008; 322: 207–228.
17. Singh R., Ray P., Das A., Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65: 1955–1958.
18. Smith K., Hunter I. S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* 2008; 57 (8): 966–793.
19. 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.

Материал поступил в редакцию 15.10.2014