



## Влияние трипсина, лидазы и флуимуцила на рост биоплёнок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате

Зайцев Е.М.<sup>✉</sup>, Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Бажанова И.Г.

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

### Аннотация

**Цель** работы — изучение влияния трипсина, лидазы (гиалуронидазы) и флуимуцила (N-ацетил-L-цистеин) на рост биоплёнок штаммов *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате.

**Материалы и методы.** В опытах использовали выделенные в России от больных коклюшем в 2001–2010 гг. штаммы основных сероваров *B. pertussis*: № 178 (серовар 1.2.0), № 287 (серовар 1.0.3) и № 317 (серовар 1.2.3), выращенных на плотной питательной среде. Интенсивность образования биоплёнок в жидкой питательной среде в присутствии трипсина, лидазы и флуимуцила в круглодонных полистироловых 96-луночных планшетах оценивали при окрашивании 0,1% раствором генциан-фиолетового.

**Результаты.** Трипсин подавлял рост биоплёнок и разрушал сформированные биоплёнки. Лидаза менее активно подавляла рост биоплёнок, не оказывая влияния на сформированные биоплёнки. Флуимуцил не влиял как на рост биоплёнок, так и на сформированные биоплёнки. При посеве надосадочных жидкостей из культур в присутствии препаратов, а также из лунок контроля культуры на плотную питательную среду был отмечен рост типичных для *B. pertussis* колоний.

**Заключение.** Различный эффект исследованных нами препаратов может быть связан с различным количеством содержанием мишеней для трипсина (протеины), лидазы (мукополисахариды, содержащие уроновые кислоты), флуимуцила (кислые мукополисахариды) в составе матрикса биоплёнок. Рост типичных по морфологическим свойствам колоний *B. pertussis* при посеве надосадков культур на плотную питательную среду свидетельствует о разрушении матрикса биоплёнок трипсином и лидазой при отсутствии влияния на планктонные клетки.

**Ключевые слова:** штаммы *B. pertussis*, биоплёнки, трипсин, флуимуцил, лидаза, матрикс

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Бажанова И.Г. Влияние трипсина, лидазы и флуимуцила на рост биоплёнок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):545–551.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-218>

Original article  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-218>

## Effect of trypsin, lidase and flumucil on the growth of *Bordetella pertussis* biofilms on an abiotic substrate

Evgeniy M. Zaytsev<sup>✉</sup>, Marina V. Britsina, Maria N. Ozeretskovskaya, Irina G. Bazhanova

I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

### Abstract

**Aim.** Study the effect of trypsin, lidase (hyaluronidase) and flumucil (N-acetyl-L-cysteine) on the growth of biofilms of *Bordetella pertussis* strains on the abiotic substrate.

**Materials and methods.** In the experiments, the strains of the main *B. pertussis* serotypes isolated in the Russian Federation from whooping cough patients in 2001–2010 were used: No. 178 (serotype 1.2.0), No. 287 (serotype 1.0.3) and No. 317 (serotype 1.2.3), grown on a dense nutrient medium. The intensity of biofilm formation in a liquid nutrient medium in the presence of trypsin, lidase and flumucil in round-bottomed polystyrene 96-well plates was estimated by staining with 0.1% gentian-violet solution.

**Results.** Trypsin suppressed the growth of biofilms and destroyed the formed biofilms. Lidase suppressed the growth of biofilms less actively, without affecting the formed biofilms. Fluimucil did not affect both the growth of biofilms and the formed biofilms. The growth of colonies typical for *B. pertussis* was noted when planting fluids from cultures in the presence of preparations, as well as from culture control wells on a dense nutrient medium.

**Conclusion.** The different effect of the drugs studied by us may be related to the different quantitative content of targets for trypsin (proteins), lidase (mucopolysaccharides, containing uronic acids), fluimucil (acid mucopolysaccharides) in the biofilm matrix. The growth of the typical morphological properties of the colony of *B. pertussis* during the sowing of culture seedlings on a dense nutrient medium testifies to the destruction of the biofilm matrix by trypsin and lidase in the absence of influence on plankton cells.

**Keywords:** *B. pertussis* strains, biofilms, trypsin, fluimucil, lidase, matrix

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Bazhanova I.G. Effect of trypsin, lidase and fluimucil on the growth of *Bordetella pertussis* biofilms on an abiotic substrate. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):545–551. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-218>

## Введение

Коклюш остаётся актуальной проблемой здравоохранения во всём мире, в том числе в странах с высоким уровнем вакцинации [1–3]. Одной из вероятных причин продолжающейся циркуляции возбудителя коклюша может быть формирование в респираторном тракте биоплёнок *B. pertussis*, отличающихся от планктонных клеток повышенной устойчивостью к иммунной системе хозяина, антибактериальным препаратам и другим факторам [4]. В связи с этим важной задачей является разработка методов, направленных на подавление роста биоплёнок *B. pertussis* и разрушение сформированных биоплёнок в макроорганизме [5]. Полимерный матрикс является важным структурным компонентом биоплёнок, защищающим бактерии от повреждающих факторов внешней среды [6]. Одним из подходов к борьбе с биоплёнками является поиск препаратов, способных разрушать их матрикс, что облегчает доступ антибактериальных препаратов к микробным клеткам и повышает их чувствительность к факторам иммунной системы.

Чувствительность биоплёнок *B. pertussis* к препаратам, способным разрушать компоненты матрикса в респираторном тракте и на абиотических субстратах, пока изучена недостаточно, по данной проблеме имеются лишь единичные публикации.

**Цель работы** — изучение влияния трипсина, лидазы и флуимуцила на рост биоплёнок *B. pertussis* на абиотическом субстрате.

## Материалы и методы

В работе использовали выделенные в России от больных коклюшем в 2001–2010 гг. штаммы № 178 (серовар 1.2.0), № 287 (серовар 1.0.3) и штамм № 317 (серовар 1.2.3). В опытах использовали трипсин кристаллический (ООО «Самсон-Мед»), лидазу (гиалуронидаза; АО «НПО «Микроген»), флуимуцил (N-ацетил-L-цистеин; «Zambon»). Контроль морфологических, серологических и культураль-

ных свойств штаммов проводили в соответствии с Методическими указаниями [7].

В качестве инокулята для получения биоплёнок использовали ночные культуры штаммов, выращенных на плотной питательной среде «Бордетелагар» (Питательная среда для культивирования и выделения коклюшного микроба сухая; ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии). Для образования биоплёнок бактерии культивировали в 96-луночных пластиковых планшетах («Медполимер») в жидкой синтетической питательной среде в соответствии с ранее описанным методом [8]. Культуры штаммов в жидкой синтетической питательной среде в концентрации 10 МОЕ (10 млрд микробных клеток/мл) в объёме 100 мкл вносили в лунки планшетов. После этого в лунки вносили по 100 мкл раствора ферментных препаратов и выдерживали планшеты в термостате при 37°C в течение 24 ч. Трипсин использовали в концентрациях 100, 10 и 1 мкг/мл, лидазу — 160, 80 и 40 МЕ/мл, флуимуцил — 1000, 100 и 10 мкг/мл. Для изучения влияния препаратов на сформированные биоплёнки в лунки планшетов вносили по 100 мкл культур штаммов при концентрации микробных клеток 10 МОЕ и 100 мкл питательной среды. Планшеты выдерживали в термостате при 37°C в течение 24 ч, после чего промывали лунки планшетов питательной средой, добавляли в лунки по 0,2 мл раствора препаратов в разных дозах в жидкой питательной среде и инкубировали планшеты в течение 2 ч при 37°C. После культивирования бактерий из лунок планшетов осторожно отбирали надосадочную жидкость в объёме 0,1 мл и высевали на косяки с плотной питательной средой («Бордетелагар»), которые инкубировали в термостате при 37°C в течение 2 сут. Интенсивность образования биоплёнок в планшетах оценивали окрашиванием 0,1% раствором генцианвиолета по показателям оптической плотности (ОП) окрашенного растворителя по отношению к негативному контролю (ОП<sub>к</sub> = 0,047),

как плотные ( $OP \geq 0,188$ ), умеренные ( $0,094 \leq OP < 0,188$ ), слабые ( $0,070 \leq OP < 0,094$ ), отсутствие биоплёнок ( $0,047 < OP < 0,070$ ). Результаты оценивали по значениям доз ферментов, которые определяли как наибольшие их разведения, подавляющие рост биоплёночных культур по сравнению с контролем (слабые биоплёнки или их отсутствие, а также умеренные биоплёнки, по значениям ОП статистически достоверно отличающиеся от контроля). Формирование плотных и умеренных биоплёнок в присутствии ферментов рассматривали как устойчивость к ферментам. Для достоверного обобщения результатов использовали 5 лунок на один опытный образец и рассчитывали среднюю величину ОП опытного образца и удвоенную ошибку. Сравнения проводили по *t*-критерию Стьюдента [9].

### Результаты

Контрольные культуры всех исследованных штаммов в данной серии опытов формировали умеренные биоплёнки. Все исследованные штаммы при формировании биоплёнок проявляли чувствительность к трипсину и лидазе (табл. 1, 2). Трипсин

в концентрации 100 мкг/мл полностью подавлял рост биоплёнок, а в концентрации 10 мкг/мл также полностью подавлял рост биоплёнок или значительно снижал интенсивность их образования (слабые биоплёнки). При концентрации трипсина 1 мкг/мл отмечен умеренный рост биоплёнок, однако по интенсивности образования данные биоплёнки статистически достоверно отличались от биоплёнок, полученных в контроле (культуры без добавления трипсина). Добавление трипсина к сформированным биоплёнкам приводило к их деструкции. При концентрации трипсина 100 мкг/мл отмечено отсутствие биоплёнок. Биоплёнки регистрировались как слабые у всех 3 штаммов при концентрации трипсина в дозе 10 мкг/мл. При концентрации трипсина 1 мкг/мл все штаммы образовывали умеренные биоплёнки. При этом отмечена статистически достоверная разница по сравнению с контролем.

Лидаза также подавляла образование биоплёнок всех штаммов. При концентрации 160 МЕ/мл формировались слабые биоплёнки, а при концентрации 80 МЕ/мл формировались слабые или умеренные биоплёнки, статистически достоверно

**Таблица 1.** Влияние препаратов на формирование биоплёнок штаммами *B. pertussis*

**Table 1.** Effect of drugs on biofilm formation by *B. pertussis* strains

Дозы препаратов Doses of drugs	Значения ОП/интенсивность биоплёнок   Optical density values/biofilm intensity		
	штаммы (серовар)   strains (serovar)		
	№ 317 (1.2.3)	№ 287 (1.0.3)	№ 178 (1.2.0)
Контроль культуры   Culture control	0,181 ± 0,007 умеренная   medium	0,160 ± 0,002 умеренная   medium	0,154 ± 0,001 умеренная   medium
Трипсин, мкг/мл   Trypsin, µg/ml			
100	0,045 ± 0,005* нет   no	0,041 ± 0,002* нет   no	0,041 ± 0,002* нет   no
10	0,061 ± 0,015* слабая   weak	0,054 ± 0,001* нет   no	0,071 ± 0,001* слабая   weak
1	0,113 ± 0,007* умеренная   medium	0,111 ± 0,001* умеренная   medium	0,095 ± 0,002* умеренная   medium
Лидаза, МЕ/мл   Lidaza, IU/ml			
160	0,084 ± 0,008* слабая   weak	0,084 ± 0,004* слабая   weak	0,079 ± 0,002* слабая   weak
80	0,087 ± 0,006* слабая   weak	0,096 ± 0,002* умеренная   medium	0,081 ± 0,004* слабая   weak
40	0,101 ± 0,007* умеренная   medium	0,115 ± 0,005* умеренная   medium	0,110 ± 0,002* умеренная   medium
Флуимуцил, мкг/мл   Fluimucil, µg/ml			
1000	0,157 ± 0,006 умеренная   medium	0,158 ± 0,003 умеренная   medium	0,153 ± 0,005 умеренная   medium
100	0,174 ± 0,008 умеренная   medium	0,159 ± 0,005 умеренная   medium	0,154 ± 0,007 умеренная   medium
10	0,172 ± 0,009 умеренная   medium	0,158 ± 0,007 умеренная   medium	0,152 ± 0,003 умеренная   medium

**Примечание.** Здесь и в табл. 2: \* — подавление роста биоплёнок (различия между опытными образцами и контролем статистически достоверны ( $p < 0,05$ )).

**Note.** Here and in the Table 2: \* — suppression of biofilm growth (differences between experimental samples and control are statistically significant ( $p < 0.05$ )).

**Таблица 2.** Влияние препаратов на сформированные биоплёнки штаммов *B. pertussis***Table 2.** The effect of drugs on the formed biofilms of *B. pertussis* strains

Дозы препаратов   Doses of drugs	Значения ОП/интенсивность биоплёнок   Optical density values/biofilm intensity		
	Штаммы (серовар)   Strains (serovar)		
	№ 317 (1.2.3)	№ 287 (1.0.3)	№ 178 (1.2.0)
Контроль культуры   Culture control	0,178 ± 0,010 умеренная   medium	0,158 ± 0,003 умеренная   medium	0,155 ± 0,002 умеренная   medium
Трипсин, мкг/мл   Trypsin, µg/ml			
100	0,070 ± 0,006* слабая   weak	0,041 ± 0,002* нет   no	0,039 ± 0,001* нет   no
10	0,078 ± 0,016* слабая   weak	0,086 ± 0,007* слабая   weak	0,079 ± 0,007* слабая   weak
1	0,110 ± 0,014* умеренная   medium	0,120 ± 0,005* умеренная   medium	0,115 ± 0,009* умеренная   medium
Лидаза, МЕ/мл   Lidaza, IU/ml			
160	0,161 ± 0,016 умеренная   medium	0,157 ± 0,001 умеренная   medium	0,142 ± 0,015 умеренная   medium
80	0,181 ± 0,008 умеренная   medium	0,159 ± 0,007 умеренная   medium	0,135 ± 0,013 умеренная   medium
40	0,179 ± 0,015 умеренная   medium	0,156 ± 0,005 умеренная   medium	0,145 ± 0,010 умеренная   medium
Флуимуцил, мкг/мл   Flumucil, µg/ml			
1000	0,191 ± 0,014 умеренная   medium	0,157 ± 0,007 умеренная   medium	0,152 ± 0,003 умеренная   medium
100	0,181 ± 0,015 умеренная   medium	0,159 ± 0,010 умеренная   medium	0,156 ± 0,007 умеренная   medium
10	0,179 ± 0,016 умеренная   medium	0,157 ± 0,003 умеренная   medium	0,154 ± 0,005 умеренная   medium

отличавшиеся от контроля (культуры без добавления лидазы). При концентрации 40 МЕ/мл все штаммы формировали умеренные биоплёнки. При этом отмечена статистически достоверная разница по сравнению с контролем. При добавлении лидазы в дозах 160, 80 и 40 МЕ/мл к сформированным биоплёнкам не выявлено статистически значимой разницы в образовании биоплёнок по сравнению с контролем.

Флуимуцил не оказывал влияния как на формирование биоплёнок всеми штаммами, так и на уже сформированные биоплёнки. При добавлении флуимуцила в концентрациях 1000, 100 и 10 мкг/мл формировались умеренные биоплёнки, как в контрольных культурах.

При посеве наодсадочных жидкостей из культур в присутствии препаратов, а также из лунок с контролем культуры на плотную питательную среду был отмечен рост типичных для *B. pertussis* мелких колоний размером 0,5–1,0 мм, выпуклых, круглых, с ровными краями, серого цвета, блестящих. Исследование морфологических свойств микробных клеток показало, что они представляют собой неподвижные, грамотрицательные, овоидной формы мелкие палочки, располагающиеся в мазках отдельно или парами.

## Обсуждение

Экзополимерный матрикс является важным структурным компонентом биоплёнок, защищающим бактерии от повреждающих факторов внешней среды, в том числе иммунной системы, антибиотиков [10]. Матрикс бактериальных биоплёнок включает экзополисахаридный компонент, липополисахариды, протеины, нуклеиновые кислоты, лектины и минералы. Различные виды бактерий и различные штаммы внутри одного и того же вида продуцируют различные типы матричных полимеров с различным химическим составом и физическим свойствам. Разрушая внеклеточный полимерный матрикс биоплёнок, можно добиться их повреждения, а также повысить эффективность антибиотиков. Каждый компонент матрикса может служить мишенью для веществ, способных вызывать их разрушение [11, 12]. Одним из подходов к разрушению биоплёнок является ферментативный гидролиз их матрикса. К ферментам, разрушающим матрикс биоплёнки, относятся протеазы, дезоксирибонуклеазы, а также гликозил-гидролазы, катализирующие гидролиз гликозидных связей в молекулах углеводов. Так, использование ДНКазы предотвращало образование биоплёнок представителями рода *Staphylococcus* и *Enterococcus in vitro* [13]. Показано, что обработка

биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa in vivo* и *ex vivo* гликозил-гидролазой приводила к разрушению матрикса и переходу микробных клеток в планктонное состояние, что сопровождалось повышением их чувствительности к антибиотикам [11, 14]. Протеолитические ферменты, катализирующие гидролиз белков, давно применяются при лечении пациентов с длительно незаживающими ранами и ожогами, в частности, в составе коммерческих препаратов «Трипсин», «Химотрипсин», «Лидаза», «Коллализин» и др. Недавно была показана возможность использования протеолитических ферментов для борьбы с бактериальными биоплёнками на поверхности ран, тканей, медицинских изделий [15].

Нами исследована чувствительность биоплёнок основных сероваров (1.0.3, 1.2.0 и 1.2.3) свежeweделенных штаммов коклюшного микроба к двум ферментным препаратам (трипсину, лидазе) и флуимуцилу. Использованные нами препараты отличались по влиянию на биоплёнки. Наибольшую активность проявлял трипсин, подавлявший рост биоплёнок и разрушавший сформированные биоплёнки. Лидаза менее активно подавляла рост биоплёнок, не оказывая влияния на сформированные биоплёнки. Флуимуцил не влиял на рост биоплёнок и на сформированные биоплёнки.

По отношению ко всем штаммам выявлена зависимость интенсивности роста биоплёнок от разведения концентрации препаратов. Снижение концентрации трипсина и лидазы сопровождалось усилением роста биоплёнок.

В целом мы не обнаружили существенных различий между исследованными штаммами *B. pertussis* основных сероваров по чувствительности к трипсину, лидазе и флуимуцилу.

Различный эффект исследованных нами препаратов можно объяснить механизмом их действия на матрикс биоплёнок *B. pertussis*, основными компонентами которого являются протеины, полисахаридный полимер, липополисахарид и экстрацеллюлярная ДНК [6]. Трипсин представляет собой эндогенный протеолитический фермент, разрывающий пептидные связи в молекуле белка, а также расщепляющий высокомолекулярные продукты распада белков и некоторые низкомолекулярные пептиды. Таким образом, подавление роста биоплёнок *B. pertussis* и разрушение сформированных биоплёнок трипсином можно объяснить протеолизом белков матрикса, что привело к его деградации. Лидаза (гиалуронидаза) расщепляет основной компонент межклеточного вещества соединительной ткани — мукополисахарид, в состав которого входят ацетилглюкозамин и глюкуроновая кислота. Гиалуроновая кислота является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса, содержится во многих биологических жидкостях (слюне, синовиальной жидкости и др.), а также продуциру-

ется некоторыми бактериями. Наличие уроновых кислот также выявлено в составе полисахаридного полимера биоплёнок *B. pertussis* [16]. Присутствие уроновых кислот в матриксе бактерий может играть важную роль в вирулентности, способствуя стабилизации гликозидных связей с помощью карбоновой кислоты и придавая биоплёночным бактериям более высокую устойчивость к кислотному гидролизу. Также важно отметить, что продукция экзополимеров, содержащая уроновые кислоты, бактериями, колонизирующими дыхательный и кишечный тракты, может способствовать их агрегированию и адгезии к клеткам респираторного тракта. Таким образом, эффект лидазы на биоплёнки можно объяснить расщеплением мукополисахаридов, содержащих уроновые кислоты, что приводило к разрушению матрикса.

Флуимуцил (N-ацетил-L-цистеин) широко используется в качестве муколитического агента для лечения заболеваний бронхолегочной системы. Действие флуимуцила обусловлено его способностью разрывать дисульфидные связи кислых мукополисахаридов. Препарат обладает способностью уменьшать адгезию некоторых возбудителей к слизистым оболочкам, а также оказывает прямое разрушающее воздействие на внеклеточный матрикс, что позволяет рассматривать его в качестве терапии инфекций, связанных с образованием биоплёнок. В частности, показана способность флуимуцила подавлять образование биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* и *Vibrio cholerae* [17]. Отсутствие влияния флуимуцила на биоплёнки *B. pertussis* может указывать на различия в содержании кислых мукополисахаридов в составе матрикса биоплёнок разных микроорганизмов. Рост типичных по морфологическим свойствам колоний *B. pertussis* при посеве на досадов биоплёночных культур на плотную питательную среду свидетельствует о разрушении матрикса биоплёнок трипсином и лидазой и отсутствии влияния на планктонные клетки. Разрушение матрикса вызывает дисперсию бактерий, т.е. переход в состояние, близкое к планктонному фенотипу, что делает их более восприимчивыми к факторам иммунной системы и антибактериальным препаратам. Однако в настоящее время иммунобиологические свойства диспергированных из биоплёнок клеток изучены недостаточно. Потенциально они способны к диссеминации, реколонизации, бактериемии и септицемии. В связи с этим важное значение имеет изучение комбинированного действия препаратов, разрушающих матрикс биоплёнок, с антибактериальными препаратами [14].

Полученные нами результаты открывают перспективы для изучения влияния ферментных препаратов на рост биоплёнок *B. pertussis* на экспериментальных животных, в том числе в сочетании с антибактериальными препаратами, для разработки эффективных препаратов для лечения коклюшной инфекции.

## ЛИТЕРАТУРА

- Nguyen V.T.N., Simon L. Pertussis: The whooping cough. *Prim. Care.* 2018; 45(3): 423–31. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.003>
- Polinori I., Esposito S. Clinical findings and management of pertussis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1183: 151–60. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2019\\_410](https://doi.org/10.1007/5584_2019_410)
- Ломоносова А.В. Причины и последствия несвоевременной вакцинации против коклюшной инфекции в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(5): 492–52. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-11>
- Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): ftv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
- Cattelan N., Yantorno O.M., Deora R. Structural analysis of *Bordetella pertussis* biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Bio Protoc.* 2018; 8(15): e2953. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.295>
- Conover M.S., Mishra M., Deora R. Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016861>
- МУК 4.2.2317-08. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракклюшных и бронхисептических бактерий. М.; 2009.
- Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерцовская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Культивирование биоплёнок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2019; 96(1): 49–53. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-49-53>
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях.* Ленинград; 1962.
- Uruén C., Chopo-Escuin G., Tommassen J., Mainar-Jaime R.C., Arenas J. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiotics (Basel).* 2020; 10(1): 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>
- Kovach K.N., Fleming D., Wells M.J., Rumbaugh K.P., Gordon V.D. Specific disruption of established *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using polymer-attacking enzymes. *Langmuir.* 2020; 36(6): 1585–95. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02188>
- Fleming D., Rumbaugh K. The consequences of biofilm dispersal on the host. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 10738. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29121-2>
- Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. *Микробные биоплёнки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии.* Витебск; 2017.
- Wille J., Coenye T. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora's box? *Biofilm.* 2020; 2: 100027. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2020.100027>
- Каюмов А.Р., Тризна Е.Ю., Шарафутдинов И.С., Байдамшина Д.Р., Рыжикова М.Н. *Биоплёнки как фактор патогенности Staphylococcus aureus: подходы к терапии.* Казань; 2017.
- Bosch A., Serra D., Prieto C., Schmitt J., Naumann D., Yantorno O. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006; 71(5): 736–47. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0202>
- Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Титова С.В., Корнеева Л.А. Действие N-ацетил-L-цистеина на биоплёнки холерного вибриона. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018; 95(2): 83–7. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-2-83-87>
- Polinori I., Esposito S. Clinical findings and management of pertussis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1183: 151–60. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2019\\_410](https://doi.org/10.1007/5584_2019_410)
- Lomonosova A.V. Causes and consequences of delayed vaccination against pertussis infection in the Russian Federation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(5): 492–52. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-11> (in Russian)
- Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): ftv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
- Cattelan N., Yantorno O.M., Deora R. Structural analysis of *Bordetella pertussis* biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Bio Protoc.* 2018; 8(15): e2953. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.295>
- Conover M.S., Mishra M., Deora R. Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016861>
- Guidelines MUK 4.2.2317-08. Selection, verification and storage of production strains of pertussis, parapertussis and bronchisepticose bacteria. Moscow; 2009. (in Russian)
- Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Cultivation of *Bordetella pertussis* biofilms on abiotic substrate. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2019; 96(1): 49–53. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-49-53> (in Russian)
- Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Research [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh].* Leningrad; 1962. (in Russian)
- Uruén C., Chopo-Escuin G., Tommassen J., Mainar-Jaime R.C., Arenas J. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiotics (Basel).* 2020; 10(1): 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>
- Kovach K.N., Fleming D., Wells M.J., Rumbaugh K.P., Gordon V.D. Specific disruption of established *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using polymer-attacking enzymes. *Langmuir.* 2020; 36(6): 1585–95. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02188>
- Fleming D., Rumbaugh K. The consequences of biofilm dispersal on the host. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 10738. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29121-2>
- Okulich V.K., Kabanova A.A., Plotnikov F.V. *Microbial Biofilms in Clinical Microbiology and Antibacterial Therapy [Mikrobynye bioplenki v klinicheskoy mikrobiologii i antibakterial'noy terapii].* Vitebsk; 2017. (in Belarusian)
- Wille J., Coenye T. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora's box? *Biofilm.* 2020; 2: 100027. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2020.100027>
- Kayumov A.R., Trizna E.Yu., Sharafutdinov I.S., Baydamshina D.R., Ryzhikova M.N. *Biofilms as a Pathogenicity Factor of Staphylococcus Aureus: Approaches to Therapy [Bioplenki kak faktor patogenosti Staphylococcus aureus: podkhody k terapii].* Kazan'; 2017. (in Russian)
- Bosch A., Serra D., Prieto C., Schmitt J., Naumann D., Yantorno O. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006; 71(5): 736–47. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0202>
- Duvanova O.V., Mishan'kin B.N., Titova S.V., Korneeva L.A. The effect of N-acetyl-L-cysteine on biofilm of *Vibrio cholerae*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2018; 95(2): 83–7. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-2-83-87> (in Russian)

## REFERENCES

- Nguyen V.T.N., Simon L. Pertussis: The whooping cough. *Prim. Care.* 2018; 45(3): 423–31. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.003>

### Информация об авторах

*Зайцев Евгений Михайлович*<sup>✉</sup> — д.м.н., зав. лаб. иммуномодуляторов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, [lab.immunomod@yandex.ru](mailto:lab.immunomod@yandex.ru), <https://www.orcid.org/0000-0002-4813-9074>

*Брицина Марина Васильевна* — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://www.orcid.org/0000-0002-3044-0790>

*Озеретковская Мария Николаевна* — к.м.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://www.orcid.org/0000-0001-9809-4217>

*Бажанова Ирина Глебовна* — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://www.orcid.org/0000-0003-1404-1498>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 12.05.2022;  
принята к публикации 19.07.2022;  
опубликована 31.10.2022

### Information about the authors

*Eugene M. Zaytsev*<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, [lab.immunomod@yandex.ru](mailto:lab.immunomod@yandex.ru), <https://www.orcid.org/0000-0002-4813-9074>

*Marina V. Britsina* — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://www.orcid.org/0000-0002-3044-0790>

*Maria N. Ozeretkovskaya* — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://www.orcid.org/0000-0001-9809-4217>

*Irina G. Bazhanova* — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of immunomodulators, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://www.orcid.org/0000-0003-1404-1498>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 12.05.2022;  
accepted for publication 19.07.2022;  
published 31.10.2022