

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ, ОБРАЗУЮЩИМИ БИОПЛЕНКУ

ОКУЛИЧ В.К.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г.Витебск,  
Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2016. – Том 15, №5. – С. 52-63.

## MICROBIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF INFECTIONS CAUSED BY OPPORTUNISTIC BACTERIA THAT FORM BIOFILM

OKULICH V.K.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2016;15(5):52-63.

---

### Резюме.

Цель – оценить способность условно-патогенных микроорганизмов образовывать бактериальные сообщества, установить их влияние на течение раневой инфекции и определить степень их разрушения антисептиками, сывороткой крови, иммуноглобулинами и ферментами экзополимерного матрикса биоплёнки.

Материал и методы. С помощью разработанных методов культивирования и исследования, микробных биоплёнок изучены свойства 77 клинических изолятов, выделенных от пациентов с хирургической инфекцией и 83 изолята от пациентов с хроническим периодонтитом. Для определения степени влияния образования бактериями биопленки на течение раневого процесса было проведено комплексное обследование 65 пациентов с гнойно-воспалительными процессами мягких тканей.

Результаты. Определен достоверно ( $p < 0,05$ ) более высокий уровень продукции биопленки среди изолятов синегнойной палочки, выделенных от пациентов с хирургической инфекцией, из изолятов одонтогенного происхождения лучше биопленку образуют *Streptococcus mutans* и эпидермальный стафилококк ( $p > 0,05$ ). С помощью предложенной экспериментальной модели установлено, что среди антисептиков наиболее сильно разрушает биопленку диметилсульфоксид, активность которого проявляется в первые секунды взаимодействия, и гиалуронидаза Ia типа (оптимальное время экспозиции 20 с). Впервые определена способность иммуноглобулинов с ферментативной активностью, а также сыворотки крови пациентов с инфекционными заболеваниями разрушать микробные биопленки. Установлено влияние способности выделенного возбудителя образовывать биопленки на клинические характеристики раны, а также длительность лихорадки и длительность пребывания в стационаре пациентов с гнойными ранами.

Заключение. В результате изучения микробиологических и иммунологических аспектов бактериальных инфекций определены наибольшие продуценты матрикса биопленки среди условно-патогенных бактерий. Установлено, что диметилсульфоксид и гиалуронидаза Ia типа наиболее эффективно разрушают биопленку. Определено влияние способности возбудителей хирургической инфекции формировать биопленки на динамику раневого процесса.

*Ключевые слова:* каталитические антитела, абзимы, биопленка, микрофлора, ферменты, антисептики, хирургическая инфекция.

### Abstract.

Objectives. To evaluate the ability of opportunistic bacteria to create microbial communities, i.e. biofilms, to establish their influence on wound infections and to assess the destructive capacity of antiseptics, enzymes, patients' sera, and immunoglobulins against exopolymeric biofilm matrix.

**Material and methods.** By means of the developed methods for biofilm study, 77 clinical isolates of bacteria from patients with surgical infections and 83 clinical isolates from patients with chronic periodontitis were investigated. To determine the influence of biofilm-producing capacity of bacteria on the clinical course of wound infections laboratory and clinical examination of 65 patients with suppurative surgical infections of soft tissues was conducted. **Results.** The significantly higher biofilm production ( $p < 0,05$ ) was established for *Pseudomonas aeruginosa* cultures isolated from patients with surgical infections. More active biofilm production was also determined for *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus epidermidis* species residing in the oral cavity ( $p > 0,05$ ). In conditions of our experimental model, dimethylsulfoxide was found to be the most efficient in biofilm disruption amongst the all studied antiseptics; its activity manifests itself in the first few seconds of biofilm treatment; the similar effects were also demonstrated by Ia type hyaluronidase (with optimal exposure time of 20 s). It was determined for the first time that immunoglobulins with enzymatic activity and the sera of patients with infectious diseases are capable of destroying the biofilm matrix. The impact of biofilm-producing capacity of isolated microbial pathogens on clinical characteristics of wounds as well as the length of patients' fever period and the duration of the hospital stay was determined.

**Conclusions.** As a result of the study of microbiological and immunological aspects of bacterial infections the most active producers of microbial biofilm that pertain to opportunistic microflora were identified. It was also found that dimethylsulfoxide and hyaluronidase of Ia type destroy the biofilm with the highest efficacy. The influence of biofilm-producing capacity of causative agents of surgical infections on the dynamics of the wound healing was established.

**Key words:** *catalytic antibodies, abzymes, biofilm, microflora, enzymes, antiseptic agents, surgical infection.*

Проблема лечения и профилактики инфекционных заболеваний является одной из приоритетных в здравоохранении. В настоящее время более 35% пациентов хирургического профиля страдают гнойно-воспалительными заболеваниями, вызванными условно-патогенными микроорганизмами; послеоперационные гнойные осложнения развиваются в среднем у 20% пациентов; в общей структуре летальности в хирургических стационарах количество смертельных случаев в связи с инфекционными осложнениями колеблется от 40% до 70%. [1]. Воспалительные заболевания периодонта, которые вызывают микроорганизмы ротовой полости, являются одной из актуальных проблем стоматологии и, по данным ВОЗ, заболеваемость гингивитом и периодонтитом достигает 80-100% [2].

В последние десятилетия постепенно на смену концепции планктонных форм микробного возбудителя заболеваний в хирургии и стоматологии пришли теории ассоциации микробных сообществ – биоплёнок (БП). В химическом отношении матрикс БП неоднороден и различается у разных микроорганизмов. Экстрацеллюлярный слой содержит до 40-95% полисахаридов. Концентрация других химических компонентов очень сильно варьирует. Доля белков может составлять до 60%, липидов до 40% и нуклеиновых кислот до 20%. Данные соединения находятся в гидратированном состоянии, так как 80-90% объема БП

занимает вода [3]. С помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии установлено, что структура БП не является гомогенным монослоем микробных клеток, а представляет сложную трехмерную биологическую структуру высшей организации жизнедеятельности микробов, в чем-то напоминающей многоклеточный организм, обладающий очень важной особенностью – успешно противостоять внешним факторам агрессии, в том числе ультрафиолетовому излучению, дегидратации, антибиотикам, дезинфектантам и факторам иммунной защиты человека [4, 5]. Многие аспекты функционирования данной многоуровневой системы, их поразительная устойчивость к физическим и биохимическим воздействиям, включающим антибиотико-резистентность [6], до сих пор остаются не изученными. Не полностью определены также факторы, способствующие разрушению БП.

Начиная с середины 80-х годов 20 века сформировалась новая область иммунологии, посвященная исследованию собственной каталитической активности иммуноглобулинов. Иммуноглобулины с ферментными свойствами получили название абзимы (от английской аббревиатуры antibody-enzyme), или каталитически активные антитела [7]. За прошедшее время был накоплен значительный объем материала по этой тематике. Тем не менее, биологическая и патогенетическая роль каталитических антител к настоящему времени остается

понятной не до конца. Большинство авторов в своих работах указывают на негативную роль абзимов в патогенезе различных заболеваний, но в ряде работ указывается на возможное протективное действие каталитических анти-тел [8, 9].

Цель исследования – оценить способность условно-патогенных микроорганизмов образовывать бактериальные сообщества, установить их влияние на течение раневой инфекции и определить степень их разрушения антисептиками, сывороткой крови, иммуноглобулинами и ферментами экзополимерного матрикса биоплёнки.

### Материал и методы

С помощью разработанных методов культивирования и исследования микробных биоплёнок изучены свойства 77 клинических изолятов, выделенных от пациентов в Республиканском научно-практическом центре «Инфекция в хирургии» (РНПЦИХ), а также штаммов *S.aureus* ATCC 6538, *P.aeruginosa* ATCC 9027, *E.coli* ATCC 8739.

С целью изучения продукции БП бактериями периодонтальной микрофлоры было обследовано 89 пациентов на кафедре терапевтической стоматологии УО «ВГМУ» с хроническим периодонтитом и 25 практически здоровых лиц, от которых выделено, идентифицировано и изучено 83 клинических изолята. Все пациенты проходили лечение на клинической базе кафедры терапевтической стоматологии УЗ «Витебская областная стоматологическая поликлиника».

Для определения способности штаммов и изолятов к образованию БП был использован разработанный ранее метод с применением 96-луночного полистиролового пластикового планшета [10], который основан на фиксации глютаральдегидом БП, образованной микроорганизмом в лунке планшета, с последующим окрашиванием ее раствором кристаллического фиолетового и экстракцией уксусной кислотой. Оптическая плотность измерялась на фотометре универсальном Ф300 при длине волны 620 нм. Для пересчета единиц оптической плотности в вес микробной БП в мкг на одну лунку 96-луночного полистиролового плоскодонного планшета использовалась следующая формула, которая получена путем

сопоставления оптической плотности различной концентрации раствора кристаллического фиолетового, окрашенного матрикса с массой высушенной неокрашенной БП.

$$X=226,28*[E_{\text{опт. плотность пробы}}-E_{\text{опт. плотность контроля}}]^{1,2755}$$

Для изучения влияния способности возбудителя раневой инфекции влиять на течение раневой инфекции обследовано 65 пациентов с гнойно-воспалительными процессами мягких тканей, проходивших курс стационарного лечения в РНПЦИХ на базе отделения гнойной хирургии УЗ «Витебская областная клиническая больница» в 2012-2015 годах. Пациенты были разделены на группы в зависимости от способности выделенных от них возбудителей формировать БП и получали стандартный комплекс лечебных мероприятий. В группе 1 (34 человека) выделенные возбудители хирургической инфекции не обладали способностью образовывать БП, в группе 2 (31 человек) выделенные возбудители обладали способностью формировать БП.

Средний возраст пациентов группы 1 составил 49 (27-58) лет. При этом женщин было 47% (16 человек), мужчин – 53% (18 человек). Средний возраст пациентов группы 2 составил 42 (25-64) года. При этом женщин было 11 человек (36,5%), мужчин – 20 человек (64,5%).

Для оценки динамики клинической картины определяли сроки очищения раны, появления грануляций, начала краевой эпителизации. Клиническая симптоматика изучалась субъективно и объективно по шкалам. Субъективная оценка: самочувствие (оценивал пациент по 5-балльной шкале, большему количеству баллов соответствовало лучшее состояние); наличие болевого синдрома по визуально-аналоговой шкале (оценка проводилась по адаптированной с изменениями числовой рейтинговой шкале The World Union of Wound Healing Societies, 2004). Объективная оценка: выраженность отека, гиперемии мягких тканей, количество раневого отделяемого (определял врач по адаптированной 10-балльной шкале) [11].

Сбор патологического материала из гнойных ран производили ватным тампоном, который помещали в стерильную пробирку или с использованием транспортной среды. Содержимое абсцессов, раневое отделяемое

помещали в пробирки с мясопептонным бульоном.

Для обнаружения различных видов стрептококков использовали кровяной агар и среду Шедлера, стафилококки выделяли на желточно-солевом агаре, для кишечной группы бактерий применяли среду Эндо или Левина. Культивирование стрептококков осуществлялось в капнофильных условиях в течение 24 часов с использованием анаэробстата.

Идентификацию аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов проводили с помощью тест-систем на автоматизированном биохимическом анализаторе АТВ Expression фирмы «bioMerieux». Для идентификации использовали стрипы: ID 32 STAPH – для стафилококков, ID 32 E – для энтеробактерий, ID 32 GN – для грамотрицательных палочек, rapid ID 32 STREP – для стрептококков.

Препараты иммуноглобулинов получали из сывороток крови пациентов с острыми и хроническими гнойно-воспалительными процессами (опытные группы), а также лиц с хирургической патологией без гнойных процессов и у доноров (контрольные группы). Все пациенты, составившие опытные и контрольную группы, прошли комплексное клиническое, инструментальное и лабораторное обследование.

При исследовании активности сыворотки крови и ферментативной активности иммуноглобулинов G в отношении матрикса БП исследованные пациенты были разделены на 4 клинические группы. I группа – пациенты с хроническими гнойно-воспалительными процессами (трофические язвы, пролежни); II – пациенты с распространенными острыми гнойно-воспалительными процессами (флегмоны мягких тканей); III – пациенты с локальными острыми гнойно-воспалительными процессами (абсцессы мягких тканей); IV – пациенты с тяжелой пневмонией.

Средний возраст пациентов группы I составил 69 (53-75) лет. При этом женщин было 46,15% (6 человек), мужчин – 53,85% (7 человек). Средний возраст пациентов группы II составил 57 (19-72) лет. При этом мужчин было 9 человек (71,82%), женщин – 2 человека (18,18%). Средний возраст пациентов группы III составил 42 (21-58) года. При этом женщин было 8 (80%), мужчин – 2 человека (20%).

Средний возраст пациентов группы IV составил 37 (28-55) года. При этом женщин было 3 (30%), мужчин – 7 человек (70%). Средний возраст доноров составил 40 (28-50) лет. При этом женщин было 8 человек (36,36%), мужчин – 14 человек (63,74%).

Кровь забиралась натощак с 8 до 9 часов утра из локтевой вены, центрифугировалась со скоростью 1500 оборотов в минуту в течение 10 минут; сыворотка отбиралась, замораживалась и хранилась при температуре -250°C.

Выделение иммуноглобулинов начинали в день забора сыворотки крови без предварительного замораживания. Очистка проводилась в несколько этапов риванол-сульфатным методом с использованием аффинной хроматографии на стафилококковом протеине А [12].

Биопленки получали после культивирования в течение 3 суток, используя штаммы коллекции ATCC, указанные выше, и клинический изолят *S. oralis*, выделенный от пациента с хроническим периодонтитом.

Для оценки способности антисептиков, ферментов, сывороток и IgG расщеплять экзополимерный матрикс БП использован разработанный ранее метод, основанный на расщеплении субстрата частиц матрикса БП диаметром 80-120 мкм, связанных с Конго-красным. Конго-красный (максимальный спектр поглощения 495 нм) переходит в раствор, изменяя его цвет с прозрачного на красный [13]. Для пересчета единиц оптической плотности в мкг/мл выделенного Конго-красного использовалась формула:

$$X = (0,101 + 11,04 * [E_{\text{опт. плотность пробы}} - E_{\text{опт. плотность контроля}}])^2$$

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета прикладных программ «Statistica» (Version 10, StatSoft Inc., США, лицензия №СТАФ999K347156W). Перед использованием методов описательной статистики определяли тип распределения количественных признаков с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для признаков с нормальным распределением рассчитывали среднюю арифметическую (M) и стандартное отклонение (σ). Для определения достоверности отличия групп использовался критерий Стьюдента. При парности наблюдений в выборках использовали критерий Вилкоксона. При распределении признака, от-



личном от нормального, вычисляли медиану (Me), нижний 25-й (LQ) и верхний 75-й квартили (UQ). Данные представляли в виде Me (LQ-UQ). Для оценки статистической значимости между несвязанными группами применялся непараметрический критерий Манна-Уитни (U). Корреляции вычислялись методом Пирсона.

## Результаты и обсуждение

Установлено, что большинство возбудителей хирургической инфекции и хронического периодонтита способны формировать биоплёнки. В ходе исследований произведена количественная оценка способности возбудителей инфекции формировать БП в 96-луночном полистироловом планшете, что представлено в таблице 1.

Согласно полученным результатам синегнойная палочка обладает наибольшей продуцирующей способностью БП. Данный микроорганизм достоверно ( $p < 0,05$ ) более высокий продуцент, чем золотистый и эпидермальный стафилококк. Среди штаммов одонтогенного происхождения лучше всего образуют БП *S. mutans* и эпидермальный стафилококк ( $p > 0,05$ ).

С использованием разработанной модели изучено действие наиболее часто используемых антисептиков на матрикс БП бактерий (*E. coli*, *S. aureus* и *S. oralis*), меченый Конго-красным (табл. 2). Все антисептики исследовались в 1/2 дифференцирующей концентрации при экспозиции 30 минут. Обнаружено, что наиболее активным в отношении матрикса биоплёнки *E. coli*, *S. oralis* и *S. aureus*, меченого Конго-красным, оказался диметилсульфоксид (димексид), соответственно  $3,83 \pm 0,75$ ,  $16,59 \pm 1,26$  и  $20,47 \pm 0,84$  мкг/мл. Несмотря на существенные различия в активности против БП в зависимости от вида продуцирующего микроорганизма, активность димексида во много раз превышает активность других соединений. Активность, равная или близкая к нулевому уровню в отношении матрикса БП, меченого Конго-красным, определена у таких антисептиков, как 3% перекись водорода, цетилпиридиния хлорид, 2% хлоргексидин биглюконат. Антисептики, у которых не было выявлено активности, в таблицу не включены: септомирин (мирамистин), стоматидин (гексетидин), хлоргексидина биглюконат 0,05%, «Белодез» (гипохлорит натрия 3%), фурациллин и йодиксин. В то же время «Инол» и изопропиловый спирт, которые обладают относительно

Таблица 1 – Качественные и количественные характеристики способности возбудителей инфекции формировать биопленку

Микроорганизм	n	Масса БП Me (LQ - UQ), мкг/лунку	min	max	% бактерий, не образующих БП
Изоляты, выделенные от пациентов с хирургической инфекцией					
<i>E. coli</i>	8	3,31 (0,48-11,39)	0,26	22,2	0
<i>P.aeruginosa</i>	16	11,55 (2,58-24,14)	0,98	98,5	0
<i>S.aureus</i>	41	3,38 (1,94-5,99)	0,4	65,6	0
<i>S. epidermitidis</i>	7	3,61 (0,67-8,71)	0,26	10,64	0
<i>Acinetobacter spp.</i>	7	4,8 (2,47-27,98)	1,4	48,9	0
Изоляты одонтогенного происхождения (периодонтальная микрофлора)					
<i>Streptococcus oralis</i>	26	9,6 (6,11-12,3)	1,34	35,1	19
<i>S. mutans</i>	3	10,8 (9,5-16,8)	9,5	22,9	0
<i>S. sanguis</i>	11	8,7 (4,9-16,1)	3,3	27,9	36,4
<i>S. mitis</i>	10	6,9 (5,5-10,2)	2,9	15,5	10
<i>S. anginosus</i>	7	8,7 (5,2-11,9)	4,8	20,5	28,6
<i>G. morbillorum</i>	7	6,3 (3,71-4,2)	2,3	38	14,3
<i>L. lactis</i>	6	5,4 (4,9-5,8)	4,8	20,5	33,3
<i>S. epidermitidis</i>	13	10,3 (8,1-11,3)	5,3	11,8	23

Таблица 2 – Способность антисептиков к разрушению экзополимерного матрикса биопленки *E. coli*, *S. aureus* и *S. oralis*

Антисептик	<i>E. coli</i> М±σ, мкг/мл	<i>S. aureus</i> М±σ, мкг/мл	<i>S. oralis</i> М±σ, мкг/мл
Диметилсульфоксид 25%	3,83 ±0,75	16,59 ±1,26	20,47 ±0,84
Перекись водорода 3%	-	0	0,158±0,01
Цетилпиридиния хлорид	-	-	0,23±0,02
«Белсол» (хлоргексидин биглюконат 2%)	-	0	0,05±0,02
«Инол» (73,8% этанол, 3,8% изопропиловый спирт)	-	0,409±0,0002	-
Изопропиловый спирт	-	0,9367±0,0005	-
«Септоцид-синерджи» (70% этанол, бигуаниды 3,5%)	-	0,120±0,003	-

высокой активностью против БП, оказывают раздражающее действие на кожу и не используются в качестве антисептиков для обработки ран и ротовой полости. Поэтому только 25% диметилсульфоксид может быть рекомендован с целью лечения пациентов с заболеваниями, ассоциированными с возбудителями, способными формировать биоплёнки.

Также была исследована способность аскорбиновой кислоты и ацетилцистеина разрушать матрикс БП. Активность препаратов составила 0,13±0,02 и 0,42±0,04 мкг/мл соответственно.

Представляется важным определить, какие ферменты, особенно присутствующие в биологических жидкостях человека, способны расщеплять матрикс БП. В связи с этим, была оценена способность сывороточного альбумина, лизоцима, гиалуронидазы Ia (тестикулярная) и IIIa (стрептококковая) типа [14], ДНКазы и некоторых других ферментов к расщеплению матрикса БП *S. aureus* и *S. oralis* (табл. 3). Наибольшую способность к разрушению матрикса БП *S. aureus* и *S. oralis* продемонстрировала гиалуронидаза Ia типа, причем эта активность, вероятно, связана с гидролизом β-N-ацетилгексозаминидных связей гиалуроновой кислоты в составе микробного сообщества. За счет различий в составе экзополимерного матрикса БП способность гиалуронидазы Ia типа к его разрушению различна. Менее устойчив матрикс, образуемый *S. aureus*, чем *S. oralis*, а на БП, образуемую *E. coli*, тестикулярная гиалуронидаза не оказывает значительного разрушительного эффекта. Нормальный человеческий альбумин проде-

монстрировал высокую способность к разрушению матрикса БП. Против БП, образуемой *S. aureus*, *S. oralis*, активность оказалась практически одинаковой, а против БП, образуемой *E. coli*, – более низкой. Среди протеолитических ферментов наибольшую активность демонстрирует протеиназа К, но ее уровень значителен только против БП, образуемой *S. oralis*, что тоже демонстрирует различия в составе биопленки по содержанию белков в зависимости от образующего матрикса микроорганизма. Низкий уровень активности лизоцима свидетельствует о незначительной доле или полном отсутствии пептидогликана в составе экзополимерного матрикса БП *S. aureus* и *S. oralis*. Значительные различия в способности к разрушению матрикса биопленки, образуемыми *E. coli*, *S. aureus* и *S. oralis*, демонстрируют и другие ферменты, но, учитывая их общий низкий уровень, они малопригодны для практического применения.

Ферменты, которые показали наибольшие значения активности при расщеплении БП *S. oralis*, были исследованы в комбинации для выявления их возможного сочетанного применения (табл. 4). Из полученных данных следует, что при комбинации ферментов происходит снижение их активности.

Для определения времени экспозиции и концентрации было изучено действие ферментов и антисептиков на протяжении 24 часов. Установлено, что ДНКазы и гиалуронидаза Ia типа обладают максимальной активностью при экспозиции 20 с в концентрации 1,5 мкг/мл и 0,75 мкг/мл соответственно, в то же время активность диметилсульфоксида оказывается

Таблица 3 – Способность ферментов к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *E. coli*, *S. aureus*, *S. oralis*

Фермент	<i>E. coli</i> М±σ, мкг/мл	<i>S. aureus</i> М±σ, мкг/мл	<i>S. oralis</i> М±σ, мкг/мл
Альбумин (0,1 мг в пробе)	2,1 ± 0,46	3,1 ± 0,22	3,1 ± 0,41
Трипсин (bovine pancreas)	0,034 ± 0,0005	0,061 ± 0,03	0,37 ± 0,06
Пепсин (человеческий)	0,018 ± 0,004	0,058 ± 0,019	0,14 ± 0,029
Альфа-амилаза (porcine pancreas)	0,044 ± 0,02	0,039 ± 0,02	0,12 ± 0,08
Гиалуронидаза Ia (тестикулярного типа)	0,056 ± 0,027	5,86 ± 0,85	1,66 ± 0,2
Гиалуронидаза IIIa (стрептококковая)	0,055 ± 0,06	0,41 ± 0,11	0,1 ± 0,04
Лизоцим (human)	-	0,0126 ± 0,0126	0,013 ± 0,012
Пероксидаза (horseradish)	0,037 ± 0,023	0,23 ± 0,13	0,054 ± 0,06
Протеиназа К (tritrachium album)	0,53 ± 0,1	0,312 ± 0,07	2,26 ± 0,07
Рибонуклеаза (bovine pancreas)	-	0,0126 ± 0,045	0,014 ± 0,011
ДНКаза	0,021 ± 0,004	0,34 ± 0,14	0,18 ± 0,1
Папаин (Carica papaya)	0,05 ± 0,03	0,02 ± 0,007	0

Таблица 4 – Влияние комбинации ферментов на способность расщеплять экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis*

Фермент	М± σ, мкг/мл
ДНКаза + Гиалуронидаза Ia типа	0,45 ± 0,02
Протеиназа К + Гиалуронидаза Ia типа	0,31 ± 0,01
Протеиназа К + -ДНКаза	0,13 ± 0,02
Протеиназа К + Гиалуронидаза Ia типа + ДНКаза	0,086 ± 0,02

наибольшей в концентрации 25% и проявляется в первые секунды взаимодействия.

С целью изучения гуморального иммунного ответа макроорганизма на БП изучено влияние иммуноглобулинов и сывороток крови на матрикс БП (табл. 5).

При исследовании способности сывороток крови разрушать экзополимерный матрикс БП *S. aureus* в опытных группах между собой и донорами оказалось, что наименьший уровень активности наблюдался у сывороток пациентов с локальными острыми распространенными гнойно-воспалительными процессами и в группе пациентов с тяжелыми пневмониями.

Результаты оценки способности сывороток разрушать матрикс БП *P. aeruginosa* в целом имели ту же тенденцию, что и результаты, полученные для БП *S. aureus*. При сравнении данных в группах пациентов получены сходные результаты с результатами при реакции с матриксом БП, образованной стафилококком. Результаты представлены в таблице 6.

При анализе результатов выявлена до-

стоверная корреляция уровней активности сывороток по отношению к матриксу БП *S. aureus* и *P. aeruginosa* в группе практически здоровых людей и в совокупности пациентов 1, 2, 3, 4 групп. В отдельных опытных группах такой корреляции обнаружить не удалось.

При сопоставлении способности сывороток крови к разрушению экзополимерного матрикса БП и клинко-лабораторными проявлениями заболеваний в группе пациентов с локальными гнойно-воспалительными процессами выявлены достоверные ( $p < 0,01$ ) сильные отрицательные корреляции с длительностью гипертермии ( $r = -0,76$ ,  $n = 10$ ) и с площадью раневого дефекта ( $r = -0,73$ ,  $n = 10$ ). В других группах достоверных корреляций не обнаружено. Не обнаружено связи уровня способности сыворотки к расщеплению БП с видом микроорганизма, вызвавшего гнойно-воспалительный процесс, полом и возрастом пациента. Полученные данные свидетельствуют о том, что способность сывороток крови к разрушению матрикса биопленок является одним из факторов гуморальной неспецифиче-

Таблица 5 – Способность сывороток крови разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. aureus*

Группа	n	Me (LQ - UQ), мкг/мл	Достоверность отличий
1. Хронические гнойно-воспалительные процессы	13	9,5 (7,2-14,8)	$p_{1-5} < 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,01$ $p_{2-5} < 0,001$ $p_{4-3} < 0,01$ $p_{4-5} < 0,001$
2. Распространенные острые гнойно-воспалительные процессы	11	7,4 (5,1- 9,1)	
3. Локальные острые гнойно-воспалительные процессы	10	15,2 (9,4-17,8)	
4. Тяжелые пневмонии	10	7,2 (2,5 - 10,3)	
5. Доноры	21	12,3 (11,5-16,2)	

Таблица 6 – Способность сывороток крови разрушать экзополимерный матрикс биопленки *P. aeruginosa*

Группа	n	Me (LQ - UQ), мкг/мл	Достоверность отличий
1. Хронические гнойно-воспалительные процессы	8	12,7 (10,8 - 13,4)	$p_{1-5} < 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$ $p_{4-3} < 0,005$ $p_{4-5} < 0,001$
2. Распространенные острые гнойно-воспалительные процессы	5	12,1 (7,6 - 14,9)	
3. Локальные острые гнойно-воспалительные процессы	8	15,5 (11,7- 17,7)	
4. Тяжелые пневмонии	9	10,6 (6,12 - 11,3)	
5. Доноры	13	15,5 (13,9 - 17)	

ской резистентности, снижение которого способствует развитию инфекционных процессов.

Выборочно выполнено определение способности сывороток крови расщеплять суспензии матрикса БП после прогревания при температуре 56°C в течение 1 часа для инактивации системы комплемента. Оказалось, что активность сывороток при этом не снижалась (от 13,31±4,25 мкг/мл до 15,32±4,61 мкг/мл;  $p > 0,05$ ), что свидетельствует о незначительном влиянии активации системы комплемента по альтернативному пути на расщепление матрикса биопленок.

В результате проведенного исследования установлено, что препараты иммуноглобулинов доноров и пациентов с хирургической инфекцией способны расщеплять экзополимерный матрикс БП *S. aureus*.

Максимальная активность IgG наблюдалась в группе пациентов с тяжелыми пневмониями – 0,111 (0,032-0,227) мкг/мл, где она была достоверно выше, чем в группах пациентов с хроническими – 0,032 (0-0,071) мкг/мл и распространенными гнойно-воспалительными процессами – 0 (0-0,054) мкг/мл. В целом, активность IgG была не очень высокая. Результаты

представлены в таблице 7. Не обнаружено корреляций способности IgG к расщеплению матрикса БП *S. aureus* с клинико-лабораторными проявлениями заболеваний. Выявлено, что у IgG пациентов с инфекционным процессом, у которых был выделен в качестве возбудителя *S. aureus*, уровень способности разрушать матрикс БП – 0 (0-0,028) мкг/мл был достоверно ( $p < 0,01$ ) ниже, чем у IgG пациентов, у которых была выделена другая микрофлора – 0,04 (0,018-0,09) мкг/мл.

Определена также способность препаратов поликлональных иммуноглобулинов G расщеплять экзополимерный матрикс биопленок псевдомонад.

В результате было выявлено, что у пациентов с хирургической инфекцией способность IgG расщеплять экзополимерный матрикс БП *P. aeruginosa* оказалась достоверно ниже ( $p < 0,01$ ), чем у доноров, соответственно 0,01 (0-0,012) мкг/мл,  $n=31$  и 0,07 (0,04-0,1) мкг/мл,  $n=15$ . При делении пациентов на группы с острой и хронической хирургической инфекцией уровень активности препаратов иммуноглобулинов G в обеих группах был достоверно ниже, чем в группе доноров (табл. 8).



Таблица 7 – Способность IgG разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. aureus*

Группа	n	Me (LQ - UQ), мкг/мл	Достоверность отличий
1. Хронические гнойно-воспалительные процессы	10	0,032 (0 - 0,071)	p <sub>1-4</sub> <0,05 p <sub>2-4</sub> <0,01
2. Распространенные острые гнойно-воспалительные процессы	9	0 (0 - 0,054)	
3. Локальные острые гнойно-воспалительные процессы	8	0,036 (0 - 0,071)	
4. Тяжелые пневмонии	7	0,111 (0,032-0,227)	
5. Доноры	22	0,04 (0 - 0,118)	

Примечание: между остальными группами достоверных отличий не выявлено (p>0,05).

Таблица 8 – Уровень активности иммуноглобулинов расщепляющих экзополимерный матрикс *P.aeruginosa*

Группа	n	Me (LQ - UQ), мкг/мл	Достоверность отличий
1. Острая хирургическая инфекция	21	0,035 (0 - 0,126)	p <sub>1-3</sub> <0,001
2. Хроническая хирургическая инфекция	10	0,015 (0 - 0,04)	p <sub>2-3</sub> <0,01
3. Доноры	15	0,077 (0,049 - 0,104)	p <sub>1,2</sub> >0,05

Полученные данные подтверждаются количеством в группах пациентов препаратов иммуноглобулинов G с достоверно положительной активностью, то есть уровнем активности, достоверно превышающим уровень спонтанного распада субстрата в контрольных пробах. В группе доноров достоверно положительная активность выявлена в препаратах иммуноглобулинов G у 14 человек из 15, что достоверно выше (p<0,001), чем у пациентов с хирургической инфекцией – 10 препаратов из 21.

При сравнении активности иммуноглобулинов G в группах пациентов с острой и хронической хирургической инфекцией в первой группе она оказалась значительно выше 0,035 (0 - 0,126) мкг/мл, чем у пациентов с хроническими процессами 0,015 (0-0,04), но это отличие было недостоверным (p>0,05). Полученные данные подтверждаются процентным соотношением пациентов с достоверно положительной активностью иммуноглобулинов при хронической инфекции 1 из 10 и острой 9 из 21 (p<0,05). При сравнении отдельно групп пациентов с острой и хронической хирургической инфекцией количество препаратов IgG с достоверно положительной активностью в обоих случаях было достоверно ниже, чем в группе доноров (соответственно p<0,01 и p<0,0001). Отсюда вероятно предположить, что сниженный уровень активности является predisposing фактором для развития инфекцион-

ного процесса, поскольку при этом снижается доступность бактерий, образующих БП, для факторов иммунной системы, что облегчает процесс инвазии и агрессии микроорганизма.

В ходе проведенного исследования изучена динамика раневого процесса и клинических показателей пациентов с гнойными ранами в зависимости от способности возбудителя образовывать БП. Длительность лихорадки у пациентов контрольной группы, первой и второй подгрупп с гнойными ранами составила 0 (0-3) суток и 3 (2-8) суток, соответственно (p<0,001). Средняя длительность госпитализации в исследуемых подгруппах также статистически значимо отличалась в зависимости от способности возбудителя образовывать БП. В первой подгруппе средний койко-день составил 11 (8-18) суток, во второй – 21 (11-38) сутки (p<0,001).

Очищение гнойной раны у пациентов контрольной группы первой подгруппы происходило в среднем на 5,5 (4-7) сутки, тогда как у пациентов второй подгруппы очищение раны происходило только на 9,5 (4-16) сутки, различия статистически достоверны (p<0,05). У пациентов первой подгруппы появление грануляций в ране наблюдалось на 4,5 (4-7) сутки, тогда как во второй подгруппе признаки грануляции появлялись лишь на 6,5 (4-14) сутки (p<0,05). Начало краевой эпителизации при выявлении способности возбудителя к фор-

мированию БП также наступало позже, чем в случае отсутствия у возбудителя способности образовывать БП, соответственно, во второй подгруппе эпителизация появлялась на 9 (4-16) сутки, в первой - на 7 (5-8) сутки ( $p < 0,05$ ).

Самочувствие пациентов первой и второй подгрупп контрольной группы в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалось: 3 (3-3) балла в первой подгруппе и 3 (3-4) балла во второй ( $p > 0,05$ ). Такая же ситуация наблюдалась и на пятые сутки госпитализации - 4 (4-4) в первой подгруппе и 4 (4-3) балла во второй ( $p > 0,05$ ). Однако на 10-е сутки лечения самочувствие пациентов первой подгруппы контрольной группы статистически значимо было лучше, чем у пациентов второй подгруппы: 4 (4-5) балла и 4 (3-4) балла соответственно ( $p < 0,01$ ).

Выраженность болевого синдрома у пациентов первой и второй подгрупп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалась: 8 (8-8) баллов в первой подгруппе и 8 (7-8) баллов во второй ( $p > 0,05$ ). Такая же ситуация наблюдалась и на пятые сутки госпитализации: 6 (6-7) баллов в первой подгруппе и 7 (5-8) баллов – во второй ( $p > 0,05$ ). Однако на 10-е сутки лечения выраженность болевого синдрома у пациентов первой подгруппы контрольной группы статистически значимо была ниже ( $p < 0,01$ ), чем у пациентов второй подгруппы, 5 (4-5) баллов и 6 (5-7) баллов соответственно.

Выраженность отёка у пациентов первой и второй подгрупп контрольной группы в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалась: 8 (7-8) баллов в первой подгруппе и 8 (7-8) баллов во второй ( $p > 0,05$ ). Такая же ситуация наблюдалась и на пятые сутки госпитализации: 6 (5-7) баллов в первой подгруппе и 6 (5-7) баллов – во второй ( $p > 0,05$ ). В то же время на 10-е сутки лечения выраженность отёка у пациентов первой подгруппы контрольной группы статистически значимо была ниже ( $p < 0,05$ ), чем у пациентов второй подгруппы: 4 (3-5) балла и 5 (4-7) баллов соответственно.

Выраженность гиперемии мягких тканей у пациентов первой и второй подгрупп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалась: 8 (7-8) баллов в первой подгруппе и 8 (7-8) баллов во второй ( $p > 0,05$ ). Такая же ситуация наблюдалась и на пятые

сутки госпитализации: 6 (4-6) баллов в первой подгруппе и 6 (5-7) баллов во второй ( $p > 0,05$ ). При этом на 10-е сутки лечения выраженность гиперемии у пациентов первой подгруппы контрольной группы была значительно ниже ( $p < 0,05$ ), чем у пациентов второй подгруппы: 4 (3-5) балла и 5 (4-6) баллов соответственно.

Количество раневого отделяемого у пациентов первой и второй подгрупп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалось: 8 (7-8) баллов в первой подгруппе и 7 (6-8) баллов во второй ( $p > 0,05$ ). Такая же ситуация наблюдалась и на пятые сутки госпитализации: 5 (4-7) в первой подгруппе и 5 (4-7) баллов во второй ( $p > 0,05$ ). Однако на 10-е сутки лечения количество раневого отделяемого у пациентов первой подгруппы контрольной группы статистически значимо было меньше ( $p < 0,05$ ), чем у пациентов второй подгруппы: 3 (2,5-4,5) балла и 5 (3-7) баллов соответственно.

Полученные результаты указывают на отсутствие отличий в клинической картине до лечения и в первые сутки лечения, что не позволяет назначить терапию с учётом способности возбудителей образовывать биоплёнку, основываясь только на клинических показателях. Однако наличие статистически значимых отличий на 10-е сутки указывает на недостаточную эффективность лечения пациентов с хирургической инфекцией мягких тканей, возбудители которой способны формировать биоплёнку.

Таким образом, полученные данные указывают, что клинические характеристики раны, а также длительность лихорадки и длительность пребывания в стационаре пациентов с гнойными ранами зависят от способности выделенного возбудителя образовывать микробное сообщество – БП. В случае, если возбудитель обладает способностью формировать БП, сроки очищения раны, появления грануляций и начала краевой эпителизации достоверно увеличиваются. Период лихорадки и длительность госпитализации достоверно больше у пациентов, выделенный возбудитель которых способен образовывать БП.

Использование клинического принципа для лечения гнойных ран в зависимости от способности возбудителей формировать БП имеет ограничения. Полученные результаты указывают на отсутствие влияния способно-

сти формировать БП на динамику раневого процесса до лечения и в первые сутки лечения, что не позволяет назначить терапию с учётом способности возбудителей образовывать биоплёнку, основываясь только на клинических показателях.

## Заключение

1. Установлено, что среди изолятов, выделенных от пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями, синегнойная палочка достоверно ( $p < 0,05$ ) более высокий продуцент матрикса биопленки, чем золотистый и эпидермальный стафилококк. Наибольшим уровнем продукции биопленки из изолятов одонтогенного происхождения обладают *Streptococcus mutans* и эпидермальный стафилококк, однако различия по сравнению с другими бактериями недостоверны ( $p < 0,05$ ).

2. С помощью предложенной экспериментальной модели биопленки, меченой Конго-красным, обнаружено, что среди антисептиков, широко распространенных в клинической практике, наиболее эффективен в отношении биопленки, образованной *E. coli*, *S. aureus* и *S. oralis*, 25% диметилсульфоксид, активность которого проявляется в первые секунды взаимодействия. Среди исследованных ферментов наибольшая активность наблюдалась у гиалуронидазы Ia типа, оптимальное время экспозиции 20 с.

3. При исследовании способности сывороток крови разрушать экзополимерный матрикс биопленки *Staphylococcus aureus* оказалось, что она была достоверно ( $p < 0,01$ ) ниже у пациентов с гнойно-воспалительными процессами, чем у доноров. Та же закономерность отмечалась при изучении воздействия на биопленку *Pseudomonas aeruginosa*. У пациентов с инфекционными процессами уровень активности сыворотки крови был достоверно ( $p < 0,01$ ) ниже, чем у доноров, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что способность сывороток крови к разрушению матрикса биопленок является одним из факторов гуморальной неспецифической резистентности, снижение которого способствует развитию инфекционных процессов.

4. Впервые выявлена способность препаратов поликлональных иммуноглобулинов класса G разрушать бактериальную

биопленку. Ферментативная активность иммуноглобулинов G против матрикса биопленки, учитывая ее строение, вероятно, связана с расщеплением гиалуроновой кислоты матрикса за счет гиалуронидазной активности, и в меньшей степени за счет протеолитической активности.

5. Клинические характеристики раны, а также длительность лихорадки и длительность пребывания в стационаре пациентов с гнойными ранами зависят от способности выделенного возбудителя образовывать микробное сообщество – биопленку. В случае, если возбудитель обладает способностью формировать биоплёнку, сроки очищения раны увеличиваются на 4 суток ( $p < 0,05$ ), появления грануляций – на 2 суток ( $p < 0,05$ ), начало краевой эпителизации – на 2 суток ( $p < 0,05$ ), при этом период лихорадки увеличивается на 3 суток ( $p < 0,001$ ), а длительность госпитализации пациентов на 10 суток ( $p < 0,001$ ).

## Литература

1. Косинец, А. Н. Инфекция в хирургии : учеб. для слушателей системы доп. образования взрослых по мед. специальностям / А. Н. Косинец, В. А. Косинец, Ю. В. Стручков. – 2-е изд., перераб. и доп. – Минск : Беларусьская Энциклопедия имени Петруся Бровки, 2012. – 495 с.
2. Манак, Т. Н. Микрофлора полости рта и ее роль в развитии заболеваний пародонта / Т. Н. Манак // Стоматол. журн. – 2012. – Т. 13, № 3. – С. 178–181.
3. Moons, P. Bacterial interactions in biofilms / P. Moons, C. W. Michiels, A. Aertsen // Crit. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 35, N 3. – P. 157–168.
4. Действие антисептиков на бактериальные биопленки у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта / Д. С. Щербакова [и др.] // Пародонтология. – 2011. – № 4. – С. 65–69.
5. An immunoproteomic approach for characterization of dormancy within *Staphylococcus epidermidis* biofilms / V. Carvalhais [et al.] // Mol. Immunol. – 2015 Jun. – Vol. 65, N 2. – P. 429–435.
6. Антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий / И. В. Чеботарь [и др.] // Клини. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 51–58.
7. Catalytic Antibodies / ed. E. Keinan. – Weinheim, Germany : Wiley-VCH, 2005. – 616 p.
8. Constitutive production of catalytic antibodies to a *Staphylococcus aureus* virulence factor and effect of infection / E. L. Brown [et al.] // J. Biol. Chem. – 2012 Mar. – Vol. 287, N 13. – P. 9940–9951.
9. Nature and nurture of catalytic antibodies / S. Paul [et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. – 2012. – Vol. 750. – P. 56–75.

10. Метод лечения гнойных ран мягких тканей, вызванных возбудителями, способными формировать биоплёнку : инструкция по применению №076-0714 : утв. МЗ РБ 10.09.2014 г. / В. И. Петухов [и др.] ; Витеб. гос. мед. ун-т. – Витебск : ВГМУ, 2014. – 10 с.
11. Бледнов, А. В. Результаты применения перевязочных средств «Комбиксин» и «Диосепт» в клинике (клинические испытания перевязочных средств) / А. В. Бледнов // Новости хирургии. – 2007. – Т. 15, № 2. – С. 90–97.
12. Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля. – М. : Медицина, 1987. – 472 с.
13. Оценка способности сывороток крови, иммуноглобулинов G пациентов с гнойно-воспалительными процессами и ряда ферментов к разрушению экзополимерного матрикса биопленок / В. К. Окулич [и др.] // Хирургия. Восточ. Европа. – 2014. – № 3. – С. 9–17.
14. Meyer, K. Hyaluronidases / K. Meyer // The Enzymes / ed. P. D. Boyer. – New York : Academic Press, 1971. – Vol. 5. – P. 307–320.

Поступила 08.08.2016 г.

Принята в печать 13.10.2016 г.

## References

1. Kosinets AN, Kosinets VA, Struchkov YuV. Infection in surgery: ucheb dlia slushatelei sistemy dop obrazovaniia vzroslykh po med spetsial'nostiam. 2-e izd pererab i dop. Minsk, RB: Belarusaia Entsiklapediia imia Petrusia Broŭki; 2012. 495 p. (In Russ.)
2. Manak TN. Microflora of an oral cavity and its role in development of diseases of a periodontium. Stomatol Zhurn. 2012;13(3):178-81. (In Russ.)
3. Moons P, Michiels CW, Aertsen A. Bacterial interactions in biofilms. Crit Rev Microbiol. 2009;35(3):157-68. doi: 10.1080/10408410902809431
4. Shcherbakova DS, Levkovich DV, Orekhova LYu, Domorad AA, Tets VV. The effect of antibiotics on bacterial biofilms in patients with inflammatory periodontal diseases. Parodontologiya. 2011;(4):65-9. (In Russ.)
5. Carvalhais V, Cerveira F, Vilanova M, Cerca N, Vitorino R. An immunoproteomic approach for characterization of dormancy within Staphylococcus epidermidis biofilms. Mol Immunol. 2015 Jun;65(2):429-35. doi: 10.1016/j.molimm.2015.02.024
6. Chebotar IV, Mayanskiy AN, Konchakova ED, Lazareva AV, Chistyakova VP. Antibiotic resistance of the biofilm bacteria. Klin Mikrobiologiya i Antimikrob Khimioterapiia. 2012;14(1):51-8. (In Russ.)
7. Keinan E, ed. Catalytic Antibodies. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2005. 616 p. doi: 10.1002/3527603662
8. Brown EL, Nishiyama Y, Dunkle JW, Aggarwal S, Planque S, Watanabe K, et al. Constitutive production of catalytic antibodies to a Staphylococcus aureus virulence factor and effect of infection. J Biol Chem. 2012 Mar;287(13):9940-51. doi: 10.1074/jbc.M111.330043
9. Paul S, Planque SA, Nishiyama Y, Hanson CV, Massey RJ. Nature and nurture of catalytic antibodies. Adv Exp Med Biol. 2012;750:56-75. doi: 10.1007/978-1-4614-3461-0\_5
10. Petukhov VI, Okulich VK, Bulavkin VP, Kabanova AA, Plotnikov FV; Viteb Gos Med Un-t. The method of treatment of purulent wounds of soft tissues caused by pathogens that can form a biofilm: instruktsiia po primeneniiu №076-0714: utv 10.09.2014 g. Vitebsk, RB: VGMU; 2014. 10 c. (In Russ.)
11. Blednov AV. The results of the application of dressings («Kombiksin» and «Diosept») in clinic conditions (clinical trials of dressings). Novosti Khirurgii. 2007;15(2):90-7. (In Russ.)
12. Frimel G, red. Immunological methods. Moscow, RF: Meditsina; 1987. 472 p. (In Russ.)
13. Okulich VK, Senkovich SA, Plotnikov FV, Kabanova AA. Assessment of the ability of the blood serum, immunoglobulin G in patients with purulent-inflammatory processes and a number of enzymes to the destruction of the exopolymeric biofilm matrix. Khirurgiya Vostochn Evropa. 2014;(3):9-17.
14. Boyer PD, ed. The Enzymes. New York: Academic Press; 1971. Vol 5, Meyer K. Hyaluronidases; p. 307-20.

Submitted 08.08.2016

Accepted 13.10.2016

## Сведения об авторах:

Окулич В.К. – к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

## Information about authors:

Okulich V.K. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Clinical Microbiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра клинической микробиологии. E-mail: vokul@mail.ru – Окулич Виталий Константинович.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210023, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Clinical Microbiology. E-mail: vokul@mail.ru – Okulich Vitali K.