<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-6-97-103>

Синергический эффект ферментных препаратов и гентамицина на биоплёнки *Bordetella pertussis*

Е. М. Зайцев*, М. В. Брицина, М. Н. Озерецковская, И. Г. Бажанова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва

Резюме

Актуальность. Рост заболеваемости коклюшем, высокий удельный вес тяжёлых форм заболевания, снижение чувствительности циркулирующих штаммов *B. pertussis* к антибиотикам требуют разработки более эффективных средств этиотропной терапии, в том числе способных влиять на биоплёночные формы возбудителя коклюша, отличающихся от планктонных клеток повышенной устойчивостью к иммунной системе хозяина и антибактериальным препаратам. **Цель.** Изучение влияния трипсина и лидазы в сочетании с гентамицином на рост биоплёнок штаммов *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате. **Материалы и методы.** В опытах использовали выделенные в РФ от больных коклюшем в 2001–2010 гг. штаммы *B. pertussis*: № 178 (серовар 1.2.0), № 287 (серовар 1.0.3) и № 317 (серовар 1.2.3), выращенные на плотной питательной среде. Интенсивность образования биоплёнок в жидкой питательной среде в присутствии трипсина (10 мкг/мл), лидазы (20 МЕ/мл), гентамицина (2,0 мг/мл, 0,4 мг/мл и 0,08 мг/мл) и их сочетаний в круглодонных полистироловых 96-луночных планшетах оценивали окрашиванием 0,1% раствором генциан-фиолетового. **Результаты.** Гентамицин частично подавлял формирование биоплёнок и вызывал частичное разрушение сформированных биоплёнок при отсутствии роста микробных колоний при посеве надосадочных жидкостей из биоплёночных культур на плотную питательную среду. Минимальная подавляющая концентрация гентамицина (МПК) составила 2 мг/мл. Трипсин полностью подавлял рост биоплёнок и вызывал полное разрушение сформированных биоплёнок. Лидаза также подавляла рост биоплёнок, однако менее эффективно влияла на сформированные биоплёнки. При посеве надосадочных жидкостей из биоплёночных культур в присутствии трипсина и лидазы на плотную питательную среду был отмечен рост типичных для *B. pertussis* колоний. Трипсин в сочетании со всеми исследованными концентрациями гентамицина полностью подавлял рост биоплёнок (МПК 0,08 мг/мл), а в сочетании с гентамицином в концентрации 2,0 мг/мл вызывал полное разрушение биоплёнок при отсутствии микробного роста на плотной питательной среде. Лидаза в сочетании со всеми исследованными концентрациями гентамицина также подавляла формирование биоплёнок (МПК 0,08 мг/мл), а в сочетании с гентамицином в концентрации 2,0 мг/мл вызывала частичное разрушение сформированных биоплёнок при отсутствии микробного роста на плотной питательной среде. **Заключение.** Выявлен синергический эффект комбинаций трипсина и лидазы с гентамицином на растущие и сформированные биоплёнки штаммов *B. pertussis*. Совместное использование трипсина или лидазы с гентамицином позволило снизить его МПК для растущих биоплёнок в 25 раз. Наиболее выраженным эффектом в отношении сформированных биоплёнок отличалась комбинация трипсина с гентамицином в концентрации 2 мг/мл, вызывавшая их полное разрушение и гибель планктонных клеток. Эффект комбинации лидазы с гентамицином на сформированные биоплёнки был менее выраженным.

Ключевые слова: штаммы *B. pertussis*, биоплёнки, планктонные клетки, трипсин, лидаза, гентамицин

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Зайцев Е. М., Брицина М. В., Озерецковская М. Н. и др. Синергический эффект ферментных препаратов и гентамицина на биоплёнки *Bordetella pertussis*. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2022;21(6): 97–103. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-6-97-103>

Synergistic Effect of Enzyme Preparations and Gentamycin on Biofilms of *Bordetella pertussis*

EM Zaitsev**, MV Britsina, MN Ozeretskovskaya, IG Bazhanova

Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia

Abstract

Relevance. An increase in the incidence of whooping cough, a high proportion of severe forms of the disease, and a decrease in the sensitivity of circulating strains of *B. pertussis* to antibiotics require the development of more effective etiotropic therapies, including those capable of influencing biofilm forms of the whooping cough pathogen, which differ from planktonic cells by increased resistance to the host immune system and antibacterial drugs.

* Для переписки: Зайцев Евгений Михайлович, д. м. н., заведующий лабораторией иммуномодуляторов, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Россия, 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а. +7 (495) 916-22-63, lab.immunomod@yandex.ru. ©Зайцев Е. М. и др.

** For correspondence: Zaitsev Evgeny M., Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Immunomodulators, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 5a Maly Kazenny Pereulok, Moscow, 105064, Russia. +7 (495) 916-22-63, lab.immunomod@yandex.ru. ©Zaitsev EM, et al.

Aim of the work is to study the effect of trypsin and lidase in combination with gentamycin on the growth of biofilms of *Bordetella pertussis* strains on an abiotic substrate. **Materials and methods.** In the experiments *B. pertussis* strains 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 (10 mcg/ml), lidase (20 IU/ml), gentamycin (2.0 mg/ml, 0.4 mg/ml and 0.08 mg/ml) and their combinations in round-bottomed polystyrene 96-well plates was evaluated by staining with 0.1% gentian-violet solution. **Results.** Gentamycin partially suppressed the formation of biofilms and caused partial destruction of the formed biofilms in the absence of growth of microbial colonies when sowing supernatants from biofilm cultures on a dense nutrient medium. The minimum suppressive concentration of gentamycin (MSC) was 2 mg/ml. Trypsin completely suppressed the growth of biofilms and caused the complete destruction of the formed biofilms. Lidase also suppressed the growth of biofilms, but less effectively affected the formed biofilms. The growth of colonies typical of *B. pertussis* was noted when sowing supernatants from biofilm cultures in the presence of trypsin and lidase on a dense nutrient medium. Trypsin in combination with all the studied concentrations of gentamycin completely suppressed the growth of biofilms (MSC 0.08 mg/ml), and in combination with gentamycin at a concentration of 2.0 mg/ml caused complete destruction of biofilms in the absence of microbial growth on a dense nutrient medium. Lidase in combination with all the studied concentrations of gentamycin also suppressed the formation of biofilms (MSC 0.08 mg/ml), and in combination with gentamycin at a concentration of 2.0 mg/ml caused partial destruction of the formed biofilms in the absence of microbial growth on a dense nutrient medium. **Conclusion.** The synergistic effect of the combination of trypsin and lidase with gentamycin on growing and formed biofilms of *B. pertussis* strains was revealed. The combined use of trypsin or lidase with gentamycin reduced its MSC for growing biofilms by 25 times. The most pronounced effect on the formed biofilms was the combination of trypsin with gentamycin at a concentration of 2 mg/ml, which caused their complete destruction and death of planktonic cells. The effect of the combination of lidase with gentamycin on the formed biofilms was less pronounced.

Keywords: *B. pertussis* strains, biofilms, planktonic cells, trypsin, lidase, gentamycin
No conflict of interest to declare.

For citation: Zaitsev EM, Britsina MV, Ozeretskoykaya MN, et al. Synergistic effect of enzyme preparations and gentamycin on biofilms of *Bordetella pertussis*. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(6): 97–103 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-6-97-103>

Введение

Коклюш остается актуальной проблемой здравоохранения во всем мире, в том числе в странах с высоким охватом вакцинацией, где с 1990 гг. отмечается рост заболеваемости, в том числе в тяжелой форме, и летальности [1–3]. В последние годы наметилась тенденция к снижению чувствительности циркулирующих штаммов *B. pertussis* к антибиотикам, в том числе к макролидам [4]. Наряду с другими факторами, одной из вероятных причин продолжающейся циркуляции возбудителя коклюша может быть персистенция в респираторном тракте биоплёнок *B. pertussis*, отличающихся от планктонных клеток повышенной устойчивостью к иммунной системе хозяина и антибактериальным препаратам [5]. Рост заболеваемости коклюшем, высокий удельный вес тяжелых форм заболевания, снижение чувствительности циркулирующих штаммов *B. pertussis* к антибиотикам требуют разработки более эффективных средств этиотропной терапии, в том числе способных влиять на биоплёночные формы возбудителя коклюша. Полимерный матрикс является важным структурным компонентом биоплёнок, защищающим бактерии от повреждающих факторов внешней среды. Перспективным направлением борьбы с биоплёнками целого ряда возбудителей является использование ферментных препаратов, разрушающих их матрикс, в комбинации с антибиотиками [6].

Чувствительность биоплёнок *B. pertussis* к ферментным препаратам в сочетании с антибиотиками практически не изучена, в доступной литературе отсутствуют публикации по данной проблеме.

Цель работы – изучение влияния трипсина и лидазы в сочетании с гентамицином на рост биоплёнок *B. pertussis* на абиотическом субстрате.

Материалы и методы

В работе использовали выделенные в РФ от больных коклюшем в 2001–2010 гг.: штаммы *B. pertussis* № 178 (серовар 1.2.0), № 287 (серовар 1.0.3) и № 317 (серовар 1.2.3). В опытах использовали трипсин кристаллический, производитель ООО «Самсон–Мед», Россия; лидазу (гиалуронидаза), производитель АО «НПО «Микроген», Россия; гентамицина сульфат, раствор для инъекций (40 мг/мл), производитель РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь. Контроль морфологических, серологических и культуральных 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), производитель ФБУН ГНЦПМБ, г. Оболенск). Для образования биоплёнок бактерии культивировали в 96-луночных пластиковых планшетах (фирмы «Nunc», Дания) 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 0,1 мл вносили в лунки планшетов, затем в лунки добавляли: гентамицин в дозах 2 мг/мл, 0,4 мг/мл и 0,08 мг/мл в объёме 0,1 мл; трипсин в дозе 10 мкг/мл в объёме 0,1 мл; лидазу в дозе 20 МЕ/мл в объёме 0,1 мл; смесь гентамицина в дозах 2 мг/мл, 0,4 мг/мл и 0,08 мг/мл с ферментами (трипсин в дозе 10 мкг/мл и лидаза в дозе 20 МЕ/мл) в объёме 0,1 мл. Планшеты выдерживали в термостате при 37 °C в течение 24 ч., после чего из лунок каждого образца 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 3 суток. Для изучения влияния препаратов на сформированные биоплёнки в лунки планшетов вносили по 0,1 мл культур штаммов при концентрации микробных клеток 10 МОЕ и 0,1 мл жидкой питательной среды. Планшеты выдерживали в термостате при температуре 37 °C 24 ч., после чего трижды промывали лунки планшет питательной средой, добавляли в лунки по 0,2 мл раствора препаратов в жидкой питательной среде в дозах, как было описано выше, и выдерживали планшеты в течение 2 ч. при 37 °C. После этого из лунок каждого образца 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 3 суток. Интенсивность образования биоплёнок в планшетах оценивали окрашиванием 0,1% раствором генциан-фиолета по показателям оптической плотности (ОП) окрашенного растворителя по отношению к негативному контролю ($OP_k = 0,047$), 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 использованных препаратов и их комбинаций, которые полностью подавляли рост биоплёнок по сравнению с контролем (отсутствие биоплёнок), а также вызывали значительное снижение интенсивности их роста (слабые биоплёнки). Для достоверного обобщения результатов использовали 4 лунки на один опытный образец и рассчитывали среднюю величину оптической плотности опытного образца и удвоенную ошибку. Сравнения проводили по критерию t Стьюдента [9].

Результаты и обсуждение

Результаты изучения влияния гентамицина, трипсина и лидазы на формирование биоплёнок штаммами *B. pertussis* представлены в таблице 1.

Контрольные культуры всех исследованных штаммов в данной серии опытов формировали умеренные биоплёнки. Все исследованные штаммы при формировании биоплёнок проявляли чувствительность

к трипсину, лидазе, гентамицину и комбинациям ферментных препаратов с гентамицином.

Трипсин и лидаза полностью подавляли рост биоплёнок. При посеве надосадочных жидкостей из культур в присутствии препаратов, а также из лунок с контролем культуры на плотную питательную среду был отмечен сплошной рост *B. pertussis*. Исследование морфологических свойств микробных клеток показало, что они представляют собой неподвижные, грамотрицательные, овоидной формы мелкие палочки, располагающиеся в мазках отдельно или парами, что характерно для коклюшного микроба.

Гентамицин в концентрации 2 мг/мл полностью подавлял рост биоплёнок (отсутствие биоплёнок), а в концентрации 0,4 мг/мл и 0,08 мг/мл вызывал значительное снижение ($p < 0,05$) интенсивности их роста (слабые биоплёнки). Таким образом, минимальная подавляющая концентрация (МПК) гентамицина составляла 2 мг/мл.

При посеве надосадочных жидкостей из культур со всеми исследованными концентрациями гентамицина на плотную питательную среду не было выявлено роста коклюшного микроба, что указывает на отсутствие жизнеспособных планктонных клеток.

Комбинации трипсина и лидазы со всеми рассматриваемыми концентрациями гентамицина полностью подавляли рост биоплёнок при отсутствии роста коклюшного микроба при посеве надосадочных жидкостей на плотную питательную среду. МПК гентамицина в комбинации с трипсином и лидазой составила 0,08 мг/мл.

В дальнейших опытах было изучено влияние гентамицина, трипсина и лидазы на сформированные биоплёнки, результаты которых представлены в таблице 2.

Трипсин вызывал значительное снижение ($p < 0,05$) плотности сформированных биоплёнок (слабые биоплёнки). Лидаза также вызывала снижение плотности биоплёнок (умеренные биоплёнки), однако менее выраженное по сравнению с трипсином ($p < 0,05$). При этом при посеве надосадочных жидкостей культур с трипсином и лидазой был отмечен сплошной рост микробов *B. pertussis*.

Гентамицин в концентрации 2 мг/мл и 0,4 мг/мл вызывал статистически значимое уменьшение ($p < 0,05$) плотности биоплёнок (слабые и умеренные биоплёнки) при отсутствии роста микробов на плотной питательной среде. В концентрации 0,08 мг/мл гентамицин вызывал снижение плотности биоплёнок (умеренные биоплёнки), однако оно не было статистически значимым по сравнению с контролем ($p > 0,05$). При посеве надосадочных жидкостей на плотную питательную среду был отмечен рост типичных для *B. pertussis* мелких колоний (86 ± 10 ; 83 ± 9 ; 101 ± 15 колоний у разных штаммов), размером 0,5 – 1,0 мм, выпуклых, круглых, с ровными краями, серого цвета, блестящих.

Таблица 1. Влияние гентамицина, трипсина и лидазы на рост биоплёнок разных штаммов *B. pertussis*
Table 1. The effect of gentamicin, trypsin and lidase on the growth of biofilms of different strains of *B. pertussis*

Оптическая плотность/ Интенсивность биоплёнок/Микробный рост на плотной питательной среде. Optical density/Intensity of biofilms/Microbial growth on a dense nutrient medium.			
Штаммы Strains	№ 317	№ 287	№ 178
Контроль культуры Culture control	0,156 ± 0,019/ умеренные/ сплошной moderate/ solid	0,152 ± 0,020/ умеренные/ сплошной moderate/ solid	0,155 ± 0,008/ умеренные/ сплошной moderate/ solid
Культура + гентамицин (2мг/мл) Culture + gentamicin (2 mg/ml)	0,068 ± 0,006/ нет/нет no/no	0,063 ± 0,007/ нет/нет no/no	0,064 ± 0,006/ нет/нет no/no
Культура+ гентамицин (0,4мг/мл) Culture + gentamicin (0,4 mg/ml)	0,087 ± 0,004/ слабые/нет weak/no	0,083 ± 0,008/ слабые/нет weak/no	0,078 ± 0,006 слабые/нет weak/no
Культура+ гентамицин(0,08мг/мл) Culture + gentamicin (0,08 mg/ml)	0,089 ± 0,004 слабые/нет weak/no	0,089 ± 0,012/ слабые/нет weak/no	0,086 ± 0,008/ слабые/нет weak/no
Культура+ трипсин (10мкг/мл) Culture+ trypsin (10mcg/ml)	0,056 ± 0,004/ нет/ сплошной no/solid	0,057 ± 0,003/ нет/сплошной no/solid	0,055 ± 0,003/ нет/сплошной no/solid
Культура+ гентамицин (2мг/мл) + трипсин (10мг/мл) Culture+ gentamicin (2 mg/ml) + trypsin (10 mg/ml)	0,050 ± 0,002/ нет/нет no/no	0,050 ± 0,002/ нет/нет no/no	0,048 ± 0,002/ нет/нет no/no
Культура + гентамицин (0,4мг/мл) + трипсин (10мкг/мл) Culture + gentamicin (0.4 mg/ml) + trypsin (10 mcg/ml)	0,058 ± 0,006/ нет/нет no/no	0,054 ± 0,001/ нет/нет no/no	0,053 ± 0,001/ нет/нет no/no
Культура + гентамицин (0,08мг/мл) + трипсин (10мкг/мл) Culture + gentamicin (0.08 mg/ml) + trypsin (10 mcg/ml)	0,060 ± 0,001/ нет/нет no/no	0,063 ± 0,001 нет/нет no/no	0,061 ± 0,001 нет/нет no/no
Культура+ лидаза (20МЕ/мл) Culture+ lidase (20 IU/ml)	0,069 ± 0,009 нет/сплошной no/solid	0,068 ± 0,005 нет/сплошной no/solid	0,066 ± 0,002 нет/сплошной no/solid
Культура + гентамицин (2мг/мл) + лидаза (20МЕ/мл) Culture + gentamicin (2 mg/ml) + lidase (20 IU/ml)	0,057 ± 0,004 нет/нет no/no	0,063 ± 0,007 нет/нет no/no	0,062 ± 0,007 нет/нет no/no
Культура + (0,4мг/мл) + лидаза (20МЕ/мл) Culture + (0,4 mg/ml) + lidase (20 IU/ml)	0,064 ± 0,004 нет/нет no/no	0,067 ± 0,002 нет/нет no/no	0,065 ± 0,003 нет/нет no/no
Культура + гентамицин (0,08мг/мл) + лидаза (20МЕ/мл) Culture + gentamicin (0,08 mg/ml) + lidase (20 IU/ml)	0,078 ± 0,003 слабые/нет weak/no	0,075 ± 0,004 слабые/нет weak/no	0,077 ± 0,002 слабые/нет weak/no

Комбинация трипсина с гентамицином в концентрации 2 мкг/мл приводила к полному разрушению сформированных биоплёнок при отсутствии микробного роста на плотной питательной среде. Трипсин в комбинации с гентамицином в концентрации 0,4 мкг/мл вызывал значительное ($p < 0,05$) снижение плотности биоплёнок (слабые биопленки) при отсутствии роста коклюшных микробов на плотной питательной среде. Комбинация трипсина с гентамицином в концентрации 0,08 мкг/мл

также снижала плотность биоплёнок (слабые биоплёнки). При посеве надосадочных жидкостей на плотную питательную среду был зарегистрирован рост типичных для *B. pertussis* колоний (174 ± 16 ; 202 ± 8 ; 194 ± 12 колоний).

Комбинация лидазы с гентамицином в концентрации 2 мкг/мл и 0,4 мкг/мл вызывала выраженное снижение ($p < 0,05$) плотности сформированных биоплёнок (слабые и умеренные биоплёнки) при отсутствии роста коклюшных микробов

Таблица 2. Влияние гентамицина, трипсина и лидазы на сформированные биоплёнки разных штаммов *B. pertussis*
Table 2. Effect of gentamicin, trypsin and lidase on the formed biofilms of different strains of *B. pertussis*

Оптическая плотность/ Интенсивность биоплёнок/Микробный рост на плотной питательной среде Optical density/Intensity of biofilms/Microbial growth on a dense nutrient medium.			
Штаммы Strains	№ 317	№ 287	№ 178
Контроль культуры (биоплёнки) Culture control (biofilms)	0,155 ± 0,015 умеренные/ сплошной moderate/ solid	0,159 ± 0,016 умеренные/ сплошной moderate/ solid	0,157 ± 0,006 Умеренные / сплошной moderate/ solid
Биоплёнки+ гентамицин (2мг/мл) Biofilms+ gentamicin (2 mg/ml)	0,076 ± 0,014 слабые/нет weak/no	0,098 ± 0,006 умеренные/нет moderate/no	0,108 ± 0,003 умеренные/ нет moderate/no
Биоплёнки+ гентамицин (0,4мг/мл) Biofilms+ gentamicin (0,4 mg/ml)	0,099 ± 0,022 умеренные/ нет moderate/no	0,100 ± 0,006 умеренные/нет moderate/no	0,100 ± 0,010 умеренные/ нет moderate/no
Биоплёнки+ гентамицин (0,08мг/мл) Biofilms+ gentamicin (0,08 mg/ml)	0,140 ± 0,022 умеренные/ 86 ± 10* moderate/ 86 ± 10*	0,131 ± 0,019 умеренные/ 83 ± 9 * moderate/ 83 ± 9 *	0,125 ± 0,025 умеренные/ 101 ± 5 * moderate/ 101 ± 5 *
Биоплёнки+ трипсин (10мг/мл) Biofilms+ trypsin (10mg/ml)	0,089 ± 0,012 слабые/ сплошной weak/ solid	0,087 ± 0,004 слабые/ сплошной weak/ solid	0,086 ± 0,003 слабые/ сплошной weak/ solid
Биоплёнки+ гентамицин (2мг/мл) + трипсин (10мкг/мл) Biofilms+ gentamicin (2 mg/ml) + trypsin (10 mcg/ml)	0,069 ± 0,009 нет/нет no/no	0,067 ± 0,005 нет/нет no/no	0,068 ± 0,005 нет/нет no/no
Биоплёнки+ гентамицин (0,4мг/мл) + трипсин (10мкг/мл) Biofilms + gentamicin (0,4 mg/ml) + trypsin (10 mcg/ml)	0,077 ± 0,015 слабые/нет weak/no	0,076 ± 0,004 слабые/нет weak/no	0,075 ± 0,006 слабые/нет weak/no
Биоплёнки + гентамицин (0,08мкг/мл) + трипсин (10мкг/мл) Biofilms + gentamicin (0,08mg/ml) +trypsin (10 mcg/ml)	0,082 ± 0,011 слабые /174 ± 6* weak /174 ± 6*	0,079 ± 0,013 слабые/202 ± 8* weak/ 202 ± 8 *	0,080 ± 0,006 слабые/194 ± 12* weak/194 ± 12*
Биоплёнки + лидаза (20МЕ/мл) Biofilms + lidase (20 IU/ml)	0,109 ± 0,012 умеренные/ сплошной moderate/ solid	0,107 ± 0,001 умеренные/ сплошной moderate/ solid	0,110 ± 0,008 умеренные/ сплошной moderate/ solid
Биоплёнки + гентамицин (2мг/мл) + лидаза(20МЕ/мл) Biofilms + gentamicin (2 mg/ml) + lidase (20 IU/ml)	0,088 ± 0,014 слабые/нет weak/no	0,092 ± 0,006 слабые/нет weak/no	0,083 ± 0,005 слабые/нет weak/no
Биоплёнки + гентамицин (0,4мг/мл) + лидаза (20МЕ/мл) Biofilms + gentamicin (0,4 mg/ml) + lidase (20 IU/ml)	0,095 ± 0,012 умеренные/ нет moderate/no	0,097 ± 0,014 умеренные/нет moderate/no	0,094 ± 0,005 умеренные/ нет moderate/no
Биоплёнки + гентамицин (0,08мг/мл) + лидаза (20МЕ/мл) Biofilms + gentamicin (0,08 mg/ml) +lidase (20 IU/ml)	0,104 ± 0,011 умеренные/ 135 ± 8* moderate/135± 8*	0,102 ± 0,006 умеренные/ 96 ± 16* moderate/ 96 ± 16*	0,105 ± 0,007 умеренные/ 155 ± 19* moderate/ 155 ± 19*

Примечание: *количество отдельных колоний.
 Note: *the number of individual colonies.

на плотной питательной среде. Комбинация лидазы с гентамицином в концентрации 0,08 мкг/мл также вызывала снижение ($p < 0,05$) плотности биопленок (умеренные биоплёнки), однако был отмечен рост отдельных колоний *B. pertussis* на плотной питательной среде (135 ± 8; 96 ± 16; 155 ± 19 колоний).

Эффективность комбинированного действия ферментных препаратов, разрушающих матрикс биоплёнок, с антибиотиками показана в отношении ряда возбудителей. В частности, установлено,

что стафилокиназа подавляла рост грибково-бактериальных полимикробных биоплёнок (*C. albicans* и *S. aureus*), а также оказывала заметное влияние на зрелые биоплёнки самостоятельно или в сочетании с ванкомицином и флуконазолом [10]. При использовании ацетилцистеина в комбинации с амоксициллином/клавуланатом и амилазой было зарегистрировано значительное снижение жизнеспособности биоплёнок у всех из 12 исследованных штаммов *S. aureus in vitro* [11]. Гликозидгидролазы (смесь α -амилазы и целлюлазы) разрушали

биоплёнки *S. aureus* и *P. aeruginosa* in situ на модели инфицированных ран у мышей, однако вызывали быструю септицемию в течение 15 часов. Как местное, так и системное введение меропенема предотвращало дисперсию микробных клеток и защищало мышей от септицемии [12].

Для ферментативного разрушения матрикса биоплёнок штаммов *B. pertussis* мы использовали трипсин и лидазу, а в качестве антибактериального средства – гентамицин, обладающий высокой эффективностью в отношении грамотрицательных аэробных микроорганизмов, в том числе и в отношении *B. pertussis* [4]. Гентамицин значительно подавлял рост биоплёнок и вызывал частичное разрушение сформированных биоплёнок, приводя при этом к гибели планктонные клетки, о чём свидетельствует отсутствие микробного роста при посеве надосадочных жидкостей биоплёночных культур на плотную питательную среду. Минимальная подавляющая концентрация гентамицина составила 2 мг/мл. Трипсин и лидаза полностью подавляли рост биоплёнок и частично разрушали сформированные биоплёнки, но не оказывали влияния на жизнеспособность планктонных микробных клеток. Трипсин в сочетании со всеми исследованными концентрациями гентамицина полностью подавлял рост биоплёнок, а в сочетании с гентамицином в концентрации 2,0 мг/мл вызывал полное разрушение биоплёнок и гибель планктонных клеток. Лидаза в сочетании со всеми исследованными концентрациями гентамицина также полностью подавляла формирование биоплёнок, а в сочетании с гентамицином в концентрации 2,0 мг/мл и 0,4 мг/мл приводила к частичному разрушению сформированных биоплёнок при отсутствии жизнеспособных планктонных клеток. МПК гентамицина в комбинации с трипсином и лидазой составила 0,08 мг/мл. Таким образом, добавление трипсина и лидазы позволило снизить МПК гентамицина для растущих биоплёнок в 25 раз. Наиболее выраженным эффектом в отношении сформированных биоплёнок отличалась комбинация трипсина с гентамицином в концентрации 2 мг/л, вызывавшая их полное разрушение и гибель планктонных клеток. По сравнению с трипсином, влияние лидазы на сформированные биоплёнки было менее выраженным.

Приведённые данные позволяют сделать вывод о синергическом эффекте комбинаций трипсина и лидазы с гентамицином на растущие и сформированные биоплёнки исследованных штаммов *B. pertussis*. Трипсин и лидаза вызывали деструкцию биоплёнок за счёт разрушения соответствующих компонентов матрикса: протеолизом белков трипсином и расщеплением мукополисахаридов, содержащих уроновые кислоты лидазой. Полная или частичная деструкция биоплёнок сопровождалась переходом биоплёночных микробных клеток в планктонное состояние, что повышало их чувствительность к гентамицину.

По отношению ко всем штаммам выявлена зависимость интенсивности роста биоплёнок от концентрации гентамицина. Снижение концентрации гентамицина сопровождалось усилением роста биоплёнок и менее выраженным эффектом на сформированные биоплёнки. В целом мы не обнаружили существенных различий между исследованными штаммами *B. pertussis* основных сероваров по чувствительности к трипсину, лидазе, гентамицину и их комбинациям.

Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов о синергическом эффекте комбинаций ферментных препаратов с антибиотиками на микробные биоплёнки. Так, установлено, что комбинация трипсина и ДНКазы I в сочетании с меропенемом и амикацином вызывала разрушение двухвидовых биоплёнок (*S. aureus* – *P. aeruginosa*) в моделированных инфицированных ранах. При этом отмечено снижение минимальных концентраций антибиотиков, вызывавших разрушение биоплёнок, по меньшей мере в 2,5 раза [13]. Комбинация смеси ферментов (эндо-1,4-β-d-глюканаза, β-1,6-гексозаминидаза и неспецифическая эндонуклеаза РНК/ДНК) с антибиотиками разных классов оказала синергический эффект против биоплёнок *S. aureus*, *S. epidermidis* и *E. coli in vitro* [14]. При использовании протеиназы K в комбинации с антибиотиками наблюдался синергический эффект против всех изолятов *S. aureus*, образующих биоплёнки [15]. Также показано, что добавление ДНКазы усиливало действие антибиотиков на биоплёнки, образованные различными грамположительными и грамотрицательными бактериями, что приводило к уменьшению биомассы биоплёнок, изменению их архитектуры, морфологии и количества КОЕ [16].

Полученные результаты открывают перспективы для изучения влияния ферментных препаратов в сочетании с антибиотиками на рост биоплёнок *B. pertussis* у экспериментальных животных для разработки эффективных препаратов для этиотропного лечения коклюшной инфекции.

Заключение

1. Комбинации трипсина и лидазы с гентамицином оказывали синергический эффект на растущие и сформированные биоплёнки штаммов *B. pertussis*.
2. Добавление трипсина и лидазы позволило снизить МПК гентамицина для растущих биоплёнок с 2 мг/мл до 0,08 мг/мл.
3. Наиболее выраженным эффектом в отношении сформированных биоплёнок отличалась комбинация трипсина с гентамицином в концентрации 2 мкг/л, вызывавшая их полное разрушение и гибель планктонных клеток.
4. Эффект комбинации лидазы с гентамицином на сформированные биоплёнки был менее выраженным по сравнению с комбинацией трипсина с гентамицином.

Литература

1. Ломоносова А. В. Причины и последствия несвоевременной вакцинации против коклюшной инфекции в Российской Федерации. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020 Т. 97, №5. С. 492–502. DOI:https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-11.
2. Yeung K.H.T., Duclos P., Nelson E.A.S., et al. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect. Dis.* 2017;1(9):974–980. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30390-0.
3. Fullen A.R., Yount K.S., Dubey P., et al. Whoop! There it is: The surprising resurgence of pertussis. *PLoS Pathog.* 2020;16(7):1008625. doi:10.1371/journal.ppat.1008625.
4. Борисова О. Ю., Аleshkin A. В., Ивашинникова Г. А. и др. Чувствительность штаммов *Bordetella pertussis* к антибактериальным препаратам. *Детские инфекции.* 2013 № 2. С. 46–50.
5. Cattelan N., Dubey P., Arnal L., et al. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016;74(1):ftv 108. DOI: 10.1093/femspd/ftv108.
6. Wille J., Coenye T. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora's box? *Biofilm.* 2020;2:100027. DOI: 10.1016/j.biofilm.2020.100027.
7. МУК 4.2.2317-08 Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий. Москва. 2009.
8. Зайцев Е. М., Брицина М. В., Озерецковская М. Н. и др. Культивирование биопленок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2019 № 1. С. 49–53. DOI:10.36233/0372-9311-2019-1-49-53.
9. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград. 1962.
10. Liu H., Chen H., Sun Y., et al. Characterization of the mechanism and impact of staphylokinase on the formation of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. *J. Med. Microbiol.* 2019;68(3):355–367. doi:10.1099/jmm.0.000914.
11. Manoharan A., Das T., Whiteley G.S., et al. The effect of N-acetylcysteine in a combined antibiofilm treatment against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020;75(7):1787–1798. doi: 10.1093/jac/dkaa093.
12. Fleming D., Rumbaugh K. The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Sci Rep.* 2018;8(1):10738. doi: 10.1038/s41598-018-29121-2.
13. Pirlar R.F., Emanini M., Beigverdi R., et al. Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the wound-like medium. *PLoS One.* 2020;15(6):0235093. doi: 10.1371/journal.pone.0235093.
14. Poilvache H., Ruiz-Sorribas A., Cornu O., et al. In Vitro Study of the Synergistic Effect of an Enzyme Cocktail and Antibiotics against Biofilms in a Prosthetic Joint Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2021;65(4):01699–20. doi: 10.1128/AAC.01699-20.
15. Shukla S.K., Rao T.S. *Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins. *Indian J. Med. Res.* 2017;146 (Supplement):S1–S8. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_410_15/.
16. Tetz G.V., Artemenko N.A., Tetz V.V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2009;53(3):1204–1209. doi:10.1128/AAC.00471-08.

References

1. Lomonosova AV. Causes and consequences of delayed vaccination against pertussis infection in the Russian Federation. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2020;97(5):492–502 (In Russ). DOI:https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-11.
2. Yeung K.H.T., Duclos P., Nelson E.A.S., et al. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect. Dis.* 2017;1(9):974–980. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30390-0.
3. Fullen A.R., Yount K.S., Dubey P., et al. Whoop! There it is: The surprising resurgence of pertussis. *PLoS Pathog.* 2020;16(7):1008625. doi:10.1371/journal.ppat.1008625.
4. Борисова О.Ю., Аleshkin AV, Ivashinnikova GA, et al. Sensitivity of *Bordetella pertussis* strains to antibacterial drugs. *Childhood infections.* 2013;2:46–50 (In Russ).
5. Cattelan N, Dubey P, Arnal L et al. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016;74(1): ftv 108. DOI: 10.1093/femspd/ftv108
6. Wille J., Coenye T. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora's box? *Biofilm.* 2020;2:100027. DOI: 10.1016/j.biofilm.2020.100027.
7. МУК 4.2.2317-08 Selection, verification and storage of production strains of pertussis, parapertussis and bronchisepticose bacteria. Moscow. 2009 (In Russ).
8. Zaitsev EM, Britsina MV, Ozeretskoykaya MN, et al. Cultivation of *Bordetella pertussis* biofilms on abiotic substrate. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2019;(1):49–53 (In Russ). DOI:10.36233/0372-9311-2019-1-49-53.
9. Ashmarin IP, Vorobyev AA. Statistical methods in microbiological research. Leningrad. 1962 (In Russ).
10. Liu H., Chen H., Sun Y., et al. Characterization of the mechanism and impact of staphylokinase on the formation of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. *J. Med. Microbiol.* 2019;68(3):355–367. doi:10.1099/jmm.0.000914.
11. Manoharan A., Das T., Whiteley G.S., et al. The effect of N-acetylcysteine in a combined antibiofilm treatment against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020;75(7):1787–1798. doi: 10.1093/jac/dkaa093.
12. Fleming D., Rumbaugh K. The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Sci Rep.* 2018;8(1):10738. doi: 10.1038/s41598-018-29121-2.
13. Pirlar R.F., Emanini M., Beigverdi R., et al. Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the wound-like medium. *PLoS One.* 2020;15(6):0235093. doi: 10.1371/journal.pone.0235093.
14. Poilvache H., Ruiz-Sorribas A., Cornu O., et al. In Vitro Study of the Synergistic Effect of an Enzyme Cocktail and Antibiotics against Biofilms in a Prosthetic Joint Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2021;65(4):01699–20. doi: 10.1128/AAC.01699-20.
15. Shukla S.K., Rao T.S. *Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins. *Indian J. Med. Res.* 2017;146 (Supplement):S1–S8. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_410_15/.
16. Tetz G.V., Artemenko N.A., Tetz V.V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2009;53(3):1204–1209. doi:10.1128/AAC.00471-08.

Об авторах

- Евгений Михайлович Зайцев – д. м. н., заведующий лабораторией иммуномодуляторов, ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва. +7 (495) 916-22-63, pertussis@yandex.ru. ORCID ID 0000-0002-4813-9074.
- Марина Васильевна Брицина – ведущий научный сотрудник, ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва. +7 (495) 916-22-63, britsinamarina@yandex.ru. ORCID ID 0000-0002-3044-0790.
- Мария Николаевна Озерецковская – ведущий научный сотрудник, ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва. +7 (495) 916-22-63, manja33@yandex.ru. ORCID ID 0000-0001-9809-4217.
- Ирина Глебовна Бажанова – ведущий научный сотрудник ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва. +7 (495) 916-22-63, ibajanowa@yandex.ru. ORCID ID 0000-0002-9072-2538.

Поступила: 28.04.2022. Принята к печати: 14.09.2022.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- Evgeny M. Zaytsev – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Immunomodulators, Mechnikov NIIVS, Moscow, Russia. +7 (495) 916-22-63, lab.immunomod@yandex.ru. ORCID ID 0000-0002-4813-9074.
- Marina V. Britsina – Leading Researcher, Mechnikov NIIVS, Moscow, Russia. +7 (495) 916-22-63, britsinamarina@yandex.ru. ORCID ID 0000-0002-3044-0790.
- Maria N. Ozertskovskaya – Leading Researcher, Mechnikov NIIVS, Moscow, Russia. +7 (495) 916-22-63, manja33@yandex.ru. ORCID ID 0000-0001-9809-4217.
- Irina G. Bazhanova – Leading Researcher, Mechnikov NIIVS, Moscow, Russia. +7 (495) 916-22-63, ibajanowa@yandex.ru. ORCID ID 0000-0002-9072-2538.

Received: 28.04.2022. Accepted: 14.09.2022.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.