



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Алиева А.И.¹, Митрохин С.Д.^{2,3}, Юсупова М.Т.¹, Акаева Ф.С.¹, Касумова А.М.¹, Алиев И.М.¹,
Милатуллаева Э.С.¹, Магомедова Л.С.¹

ИЗУЧЕНИЕ БИОПЛЕНОК, ОБРАЗОВАННЫХ ШТАММАМИ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* И *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ПРИ КАТЕТЕР-АССОЦИИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИЯХ КРОВотоКА В ОРИТ

¹ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 367012, Махачкала, Россия;

²ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

³ГБУЗ Городская клиническая больница № 67 им. Л. А. Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы, 123423, Москва, Россия

Цель – изучение биопленок, образованных при катетер-ассоциированных инфекциях кровотока (КАИК) в ОРИТ.

Материалы и методы. В исследовании использованы клинические изоляты *Klebsiella pneumoniae*, выделенные в монокультуре ($n=15$) и в ассоциациях со *Staphylococcus aureus* ($n=28$) от 15 пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) РКБ г. Махачкала. Культивирование и идентификацию исследуемых штаммов проводили общепринятыми методами. Определение факта и степени биопленкообразования исследуемых штаммов в работе использовали метод, основанный на измерении оптической плотности выделенного из биопленки красителя. Для выделения изолятов *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* использованы плексигласовые 96-луночные планшеты.

Результаты. После культивирования в течение 24 часов рост исследуемых культур отмечали во всех лунках. При этом в контрольных лунках наблюдали, что среда осталась прозрачной. По методу, указанного выше, измеряли оптическую плотность экстрагированного красителя в опытных и контрольных лунках.

Обсуждение. Показатель оптической плотности в лунках с *Klebsiella pneumoniae* достоверно превышало значение оптической плотности в лунках с контролем. Значение оптической плотности в лунках со *S. aureus* также статистически значимо был выше, чем в контрольном. Более высокие показатели оптической плотности в исследуемых лунках свидетельствуют об образовании биопленок.

Заключение. По результатам исследования установлено, что культура *Klebsiella pneumoniae* обладает большей способностью к биопленкообразованию, чем культура *S. aureus* при культивировании в течение 24 часов.

Ключевые слова: бактериальные биопленки; *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*; культивирование; катетер-ассоциированные инфекции кровотока; отделение реанимации и интенсивной терапии

Для цитирования: Алиева А.И., Митрохин С.Д., Юсупова М.Т., Акаева Ф.С., Касумова А.М., Алиев И.М., Милатуллаева Э.С., Магомедова Л.С. Изучение биопленок, образованных штаммами *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* при катетер-ассоциированных инфекциях в ОРИТ. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 29; 4: 194-198.

DOI: <https://doi.org/10.51620/3034-1981-2024-29-4-194-198>

EDN: VIEKI

Для корреспонденции: Алиева Аминат Исагаевна, д-р мед.наук, доцент, проф. кафедры микробиологии, вирусологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e.mail: aminamag@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 27.10.2024

Принята к печати 10.12.2024

Alieva A.I.¹, Mitrokhin S. D.^{2,3}, Yusupova M.T.¹, Akayeva F.S.¹, Kasumova A.M.¹, Aliyev I.M.¹, Milatullayeva E.S.¹, Magomedova L.S.¹

THE STUDY OF BIOFILMS FORMED BY STRAINS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN CATHETER-ASSOCIATED INFECTIONS IN THE ICU

¹Dagestan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. 367012, Russia, Makhachkala;

²G. N. Gabrichevskogo Moscow research institute for epidemiology& microbiology, 125212, Moscow, Russia;

³GBUZ «City clinical hospital № 67», 123423, Moscow, Russia

Purpose. The aim is to study biofilms formed during catheter-associated bloodstream infections (CAIC) in the ICU.

Material and methods. The study used isolated clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated in monoculture ($n=15$) and in association with *Staphylococcus aureus* ($n=28$) from 15 patients of the ICU of the Makhachkala RCB. Cultivation and identification of

the studied strains were carried out using generally accepted methods. Determination of the fact and degree of biofilm formation of the studied strains in the work used a method based on measuring the optical density of the dye isolated from the biofilm. Plexiglass plates for enzyme immunoassay were used to isolate isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*.

Outcomes. After cultivation for 24 hours, the growth of the studied crops was noted in all wells. At the same time, it was observed in the control wells that the medium remained transparent. According to the method indicated above, the optical density of the extracted dye was measured in experimental and control wells.

Discussion. The optical density index in the wells with *Klebsiella pneumoniae* significantly exceeded the optical density value in the wells with control. The optical density value in *S. aureus* onions was also statistically significantly higher than in the control. Higher optical density values in the studied wells indicate the formation of biofilms.

Conclusion. According to the results of the study, it was found that the *Klebsiella pneumoniae* culture has a greater ability to biofilm formation than the *S. aureus* culture when cultivated for 24 hours.

Key words: bacterial biofilms; *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*; culturing; catheter-associated bloodstream infections; intensive care unit

For citation: Alieva A.I., Mitrokhin S. D., Yusupova M.T., Akayeva F.S., Kasumova A.M., Aliyev I.M., Milatullayeva E.S., Magomedova L.S. Study of biofilms formed by strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in catheter-associated infections in the ICU. *Epidemiologiya I Infektsionnye bolezni (Epidemiology and Infectious Diseases)*. 2024; 29; 4: 194-198 (in Russ.). DOI: https://doi.org/ 10.51620/3034-1981-2024-29-4-194-198
EDN: VIIKI

For correspondence: Aminat I. Alieva, Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology, Virology of the Dagestan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, e.mail: aminamag@mail.ru

Information about authors:

Alieva A.I., <https://orcid.org/0000-0003-2665-9981>;
Mitrokhin S. D. <https://orcid.org/0000-0001-5127-1060>;
Usupova M.T., <https://orcid.org/0000-0002-4635-6796>;
Akaeva F.S., <https://orcid.org/0000-0002-1356-1013>;
Kasumova A.M., <https://orcid.org/0000-0002-6468-8743>;
Aliyev I.M., <https://orcid.org/0009-0009-6794-9396>;
Milatullayeva E.S., <https://orcid.org/0009-0002-5955-3833>;
Magomedova L.S., <https://orcid.org/0009-0005-1781-2763>.

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

Funding. The study did not have sponsorship.

Received 27.10.2024

Accepted 10.12.2024

Введение. Отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) является одним из основных источников возбудителей ИСМП, при этом риск заражения в 3-10 раз выше, чем в палатах других отделений стационара [1]. Понимание тяжести и характера инфекций, связанных с ОРИТ, остается приоритетом с целью профилактики ИСМП, улучшения лечения и снижения показателей смертности.

Значительная доля зарегистрированных ИСМП имеет бактериальную этиологию [2]. Большинство микроорганизмов образуют многоклеточные скопления, называемые биоплёнками. 99 % бактерий в естественной среде обитания образуют биоплёнки [3-5]. Около 80 % инфекций, поражающих различные органы и системы, - биоплёночные инфекции [6-8]. Способность образовывать биоплёнки защищает микроорганизмы от экстремальных условий окружающей среды [9]. В последние годы бактериальные биоплёнки, продуцируемые патогенами человека, стали особенно актуальны для изучения в связи с их повышенной устойчивости не только к эффекторам иммунной системы организма-хозяина, но и к антимикробным препаратам (АМП) [10].

Staphylococcus aureus и *Klebsiella pneumoniae* связаны с развитием ИСМП, их устойчивость к АМП серьёзно ограничивает возможности лечения инфекций, вызванных этими патогенами [11].

Klebsiella pneumoniae - грамотрицательные бакте-

рии, способные колонизировать слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), носоглотки, через которые бактерии могут транслоцироваться в кровоток или другие органы и ткани, а затем вызывать инфекционный процесс [12]. *K. pneumoniae* с фенотипом множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) стала приоритетным патогеном и основным этиологическим агентом ИСМП в ОРИТ [7]. Важным фактором вирулентности *K. pneumoniae*, является способность образовывать биоплёнку [13, 26]. Выраженная биоплёнка *K. pneumoniae* образуется на катетерах и поверхности вводимых или имплантируемых в организм пациента медицинских устройств [14, 27]. Биоплёнка *K. pneumoniae* может привести к колонизации дыхательных и мочевыводящих путей, ЖКТ, развитию инвазивных инфекций, особенно у иммунокомпрометированных пациентов [15, 16, 30].

Staphylococcus aureus является одним из проблемных патогенов, связанных с биоплёнокообразующей активностью [17]. *S. aureus* является частым этиологическим агентом ИСМП в ОРИТ, имеет высокий уровень устойчивости к АМП [18]. *S. aureus* проблемный патоген, вызывающий широкий спектр инфекций: от локальных кожных инфекций до тяжёлой генерализованной инфекции, сепсиса и септикопиемии [19, 30].

Устойчивые к АМП штаммы *S. aureus* и *K. pneumoniae* продолжают оставаться серьёзной про-

блемой современной медицины, требующей разработки новых терапевтических стратегий. Из-за МЛУ *S. aureus* и *K. pneumoniae* изучение образования биоплёнки представляет интерес для разработки эффективной схемы приёма лекарств, с целью ингибирования или предупреждения образования биоплёнок [20, 27, 28].

Существуют различные методы культивирования микробных биоплёнок, как *in vivo*, так и *in vitro* [21, 29]. Исследование образования бактериальной биоплёнки проводят статическим и динамическим способом. Среди наиболее часто используемых способов скрининга способности к образованию биоплёнки используется статический способ. Моделью *in vitro* культивирования микроорганизмов является анализ на микропланшете [22-24]. Метод с применением 96-луночных пластиковых планшетов в различных модификациях отличается практичностью и высокой эффективностью [24-26]. Культивирование с использованием пластикового планшета позволяет подтвердить наличие биоплёнок и установить их роль в патогенезе инфекционных заболеваний.

Цель исследования: изучение биоплёнок, образованных при катетер-ассоциированных инфекциях кровотока (КАИК) в ОРИТ.

Материалы и методы. Исследование проведено на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО Дагестанского государственного медицинского университета Минздрава России. Использованы клинические штаммы *K. pneumoniae*, выделенные в монокультуре (n=15) и в ассоциации со *S. aureus* (n=28) от 15 пациентов ОРИТ.

Для культивирования *K. pneumoniae* и *S. aureus* использован сухой питательный бульон, производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России. Суточные бульонные культуры бактерий стерильным раствором NaCl (0,9%) доводили до концентрации 10^5 КОЕ/мл. По 100 мл взвеси каждого микроорганизма вносили в 6 лунок стерильного 96-луночного планшета. В качестве контроля взята стерильная питательная среда, которую также вносили в 6 лунок.

Инокулированный планшет инкубировали при температуре 37 °C в течение 24 час. Для подтверждения наличия бактериальных биоплёнок использован метод, позволяющий получить относительные показатели плотности всей биоплёнки на поверхности подложки [24].

Последовательность действий указана ниже:

1. Для получения биоплёнок использованы 96 луноч-

ные планшеты. После культивирования бактерий в течение необходимого срока из лунок планшета осторожно отбирали питательную среду с планктонными клетками. Для удаления оставшихся планктонных клеток лунки с биоплёнками промывали в течение 2-3 мин стерильным буфером PBS в том же объёме, в котором проходило культивирование. Буфер полностью удаляли.

2. В лунку 96-луночного планшета вносили 200 мл отфильтрованного 0,1 % раствора генциан фиолетового. Инкубировали биоплёнки с красителем в течение 10-15 мин при комнатной температуре.

3. Удаляли из лунки краситель. Не связавшийся краситель тщательно смывали водопроводной водой. Метод промывки лунок - статическое перемешивание.

4. Планшеты переворачивали на фильтровальную бумагу и высушивали.

5. В лунки добавляли 95 % раствор этанола в объёме 200 мкл для 96-луночных планшетов.

6. Отбирают растворитель, помещают в чистые плоскодонные планшеты и измеряют оптическую плотность при длине волны 500-600 нм.

7. Результаты интерпретируют согласно оптической плотности окрашенного растворителя.

Наличие биоплёнки анализировали по увеличению показателя оптической плотности экстрагированного красителя в лунках, по отношению к контролю, где находились исследуемые культуры. В качестве контроля использован показатель оптической плотности экстрагированного красителя в лунках, на время инкубирования заполненных стерильной питательной средой. Измерение проводили с помощью автоматического спектрофотометра ПЭ-5400УФ (ПромЭкоЛаб, С-Петербург).

Для каждой исследуемой культуры микроорганизмов и контрольного образца рассчитан средний показатель оптической плотности по 6 измерениям. Для оценки статистической достоверности при сравнении средних показателей оптической плотности каждой культуры с контролем использован непараметрический критерий Манна-Уитни. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. После культивирования в течение 24 час рост исследуемых культур отмечен во всех лунках. При этом в контрольных лунках наблюдали, что среда осталась прозрачной. По методу, указанного выше, измеряли оптическую плотность экстрагированного красителя в опытных и контрольных лунках.

Полученные значения представлены в таблице 2.

Таблица 1

Оценка эффективности биоплёнкообразования по окрашиванию генцианом фиолетовым [Stepanovic et al., 2007]

Оптическая плотность	Продукция биоплёнки
$OD_c \leq \sim \leq 2 * OD_c$	Нет/слабая
$2 * OD_c < \sim \leq 4 * OD_c$	Умеренная
$> 4 * OD_c$	Плотная

Где $OD_c = OD$ негативного контроля + Tsd, где tsd – стандартное отклонение контроля, помноженное на три.

Показатель оптической плотности в лунках содержащих *K. pneumoniae* достоверно превышало значение оптической плотности в контрольных лунках (0,520

против 0,238; $p=0,004$). Значение оптической плотности в лунках содержащих *S. aureus* статистически значительно выше, чем в контроле (0,412 против 0,386; $p=0,010$).

Значение оптической плотности экстрагированного красителя в лунках с исследуемыми изолятами и в контрольных лунках

1	Оптическая плотность			Достоверность
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	Контроль	
2	3	4	5	
Лунка 1	0,520	0,238	0,110	p=0,004
Лунка 2	0,480	0,206	0,109	p=0,006
Лунка 3	0,475	0,214	0,120	
Лунка 4	0,551	0,241	0,138	
Лунка 5	0,429	0,203	0,140	
Лунка 6	0,412	0,386	0,137	p=0,010
Медиана	0,483	0,350	0,127	

Более высокие показатели оптической плотности в исследуемых лунках свидетельствуют об образовании биоплёнок, бактерии из которых не были удалены в процессе промывания. При этом среднее значение оптической плотности красителя в лунках, содержащих *K. pneumoniae* примерно в два раза превышало аналогичное для лунок с *S. aureus* (0,480 против 0,206; p=0,006). Данный факт позволяет утверждать, что способность к биоплёнкообразованию у данного изолята *K. pneumoniae* превышает таковую у исследуемого штамма *S. aureus* при данных условиях культивирования.

Заключение. В настоящее время накапливается всё больше данных о развитии бактериальных биоплёнок, в частности при КАИК в ОРИТ. Степень биоплёнкообразования у изолированных штаммов *K. pneumoniae* превышала *S. aureus*.

ЛИТЕРАТУРА (П. П. 1, 4, 5, 8, 11, 13, 19, 20, 24 СМ. REFERENCES)

2. Ярченко Е.С., Мазиева Э.В., Бочарова К.А., Пилюгин С.В. Биопленки как скрытая угроза в распространении внутрибольничных инфекций. *Международный научный журнал «Флагман науки»*. 2023; 11: 11.

3. Петрова Н.В. Биопленки: этапы формирования, свойства и клинические последствия. *Клиническая патофизиология*. 2015; 3: 9-16.

6. Гиндер М.В. Характеристика биопленок. Общество, образование, наука: современные тренды: сборник трудов по материалам II Национальной научно-практической конференции. Керчь, 2022.

7. Новикова И.Е., Садеева З.З., Алябьева Н.М., Лазарева А.В. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из разных локусов одного пациента в отделении реанимации и интенсивной терапии. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2022; 24 (1): 26-27.

9. Тимонова И.Р., Головин С.Н., Веркина Л.М., Березняк Е.А., Титова С.В. Методы культивирования и изучения бактериальных биопленок. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2017; 1 (193):73-79. doi: 10.18522/0321-3005-2017-1-73-79

10. Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотноков Ф.В. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск, 2017.

12. Шамина О.В., Самойлова Е.А., Новикова И.Е., Лазарева А.В. *Klebsiella pneumoniae*: микробиологическая характеристика, антибиотикорезистентность и вирулентность. *Российский педиатрический журнал*. 2020; 23 (3):191-197. doi: 10.18821/1560-9561-2020-23-3-191-197

14. Шляпников С.А., Насер Н.Р. Профилактика инфекций, связанных с оказанием помощи в хирургическом стационаре. *Журнал Неотложная хирургия им. И.И. Джанелидзе*. 2020; 1: 60-65.

15. Агеев В.А., Агеев И.В., Сидоренко С.В. Конвергенция множественной резистентности и гипервирулентности у *Klebsiella*

pneumoniae. *Инфекция и иммунитет*. 2022; 12 (3): 450-460. doi: 10.15789/2220-7619-COM-1825

16. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопригора И.В., Шагин Д.А. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2020; 22 (1): 4-19. doi: 10.36488/стас.2020.1.4-19

17. Воропаева Н.М., Немченко У.М., Ситникова К.О. и др. Частота встречаемости штаммов с множественной антибиотикорезистентностью в структуре условно-патогенных микроорганизмов. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5): 145-153. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-1.16

18. Бутранова О.И., Зырянов С.К., Горбачева А.А., Пуцман Г.А. Анализ структуры и показателей антибиотикорезистентности возбудителей инфекций у пациентов в отделениях интенсивной терапии многопрофильного стационара. *Качественная клиническая практика*. 2023; 4: 4-14. doi: 10.37489/2588-0519-2023-4-4-14

21. Громовых Т.И., Горшина Е.С., Синева О.Н. Методы выделения и культивирования микроорганизмов. Москва, 2022.

22. Воронкова О.С., Воробей Е.С., Рожнева И.Л., Шевченко Т.Н. Влияние стафилококкового бактериофага на процесс пленкообразования штаммов золотистого стафилококка. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. 2019; 8 (1): 71-77.

23. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок. *Микробиология*. 2010; 79 (4): 435-446. doi: 10.1134/S002626171004003X

25. Ивушкина Л. В., Миронов А. Ю. Микробиологический мониторинг *Klebsiella pneumoniae* и механизмы их резистентности к антимикробным препаратам у больных туберкулезом г. Москвы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69(4): 131-41. - doi: 10.51620/0869-2084-2024-69-4-131-141.

26. Леонов В.В., Миронов А.Ю. Биоплёнкообразование оппортунистических микроорганизмов в плазме крови в зависимости от содержания железа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(1): 52-4.

27. Леонов В.В., Миронов А.Ю., Леонова Л.В., Никитина Л.Ю. Этиологическая структура и биологические свойства возбудителей инфекций кровотока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(11): 790-93. doi: 10.18821/0869-2084-2016-11-790-793.

28. Фролова Я. Н., Харсеева Г. Г., Миронов А. Ю. Чувствительность к антибиотикам биоплёночных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(6): 51-3.

29. Фролова Я. Н., Рябова А. М., Айдинов Г. Т. [и др.] Чувствительность к антибактериальным препаратам возбудителя дифтерии в составе биоплёнки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(9): 89-90.

30. Харсеева Г. Г., Фролова Я. Н., Миронов А. Ю. Биоплёнки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(4): 346-54.

REFERENCES

1. Thuy D.B., Campbell J., Thuy C.T. et al. Colonization with

- Staphylococcus aureus and Klebsiella pneumonia causes infections in a Vietnamese aureus care unit. *Microb. Genom.* 2021; 7(2): 000514. doi: 10.1099/mgen.0.000514
2. Yarchenko E.S., Mazieva E.V., Bocharova K.A., Pilyugin S.V. Biofilms as a hidden threat in the spread of nosocomial infections. *Mezhdunarodnyy nauchnyy zhurnal «Flagman nauki»*. 2023; 11:11. (in Russian)
 3. Petrova N.V. Biofilms: stages of formation, properties and clinical consequences. *Klinicheskaya patofiziologiya*. 2015; 3:9-16. (in Russian)
 4. Donné J., Dewilde S. The challenging world of biofilm physiology. *Adv. Micro. Physiol.* 2015; 67:235–92. doi: 10.1016/bs.ampbs.2015.09.003
 5. Yin W., Wang Y., Liu L., He J. Biofilms: the microbial «Protective clothing» in extreme environments. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(14): 3423. doi: 10.3390/ijms20143423. PMID: 31336824.
 6. Ginder M.V. Characteristics of biofilms. *Society, education, science: modern trends: collection of papers based on the materials of the II National scientific and practical conference*. Kerch', 2022. (in Russian)
 7. Novikova I.E., Sadeeva Z.Z., Alyabyeva N.M., Lazareva A.V. Molecular genetic characteristics of Klebsiella pneumoniae strains isolated from different loci of one patient in the intensive care unit. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2022; 24 (1): 26-27. (in Russian)
 8. Reddersen K., Güllmar A., Tonndorf-Martini S. et al. Critical parameters in cultivation of experimental biofilms using the example of Pseudomonas fluorescens. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2021; 32(9): 96. doi: 10.1007/s10856-021-06568-w
 9. Simonova I.R., Golovin S.N., Verkina L.M., Bereznyak E.A., Titova S.V. Methods of culturing and studying bacterial biofilms. News of higher educational institutions. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Severo-Kavkazskiy region. Estestvennye nauki*. 2017; 1 (193): 73-79. doi: 10.18522/0321-3005-2017-1-73-79 (in Russian)
 10. Okulich V.K., Kabanova A.A., Plotnikov F.V. Microbial biofilms in clinical microbiology and antibacterial therapy. Vitebsk, 2017. (in Russian)
 11. Baker S., Thomson N., Weill F.X., Holt K.E. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. *Science*. 2018; 360(6390): 733-738. doi: 10.1126/science.aar3777
 12. Shamina O.V., Samoilo E.A., Novikova I.E., Lazareva A.V. Klebsiella pneumoniae: microbiological characteristics, antibiotic resistance and virulence. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal*. 2020; 23 (3): 191-197. doi: 10.18821/1560-9561-2020-23-3-191-197 (in Russian)
 13. Guerra M.E.S., Destro G., Vieira B. et al. Klebsiella pneumonia biofilms and their role in disease pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022; 12: 877995. doi: 10.3389/fcimb.2022.877995
 14. Shlyapnikov S.A., Naser N.R. Prevention of infections associated with the provision of care in a surgical hospital. *Zhurnal Neotlozhnaya khirurgiya im. I.I. Dzhanelidze*. 2020; 1: 60-65. (in Russian)
 15. Ageyevets V.A., Ageyevets I.V., Sidorenko S.V. Convergence of multiple resistance and hypervirulence in Klebsiella pneumoniae. *Infektsiya i immunitet*. 2022; 12 (3): 450-460. doi: 10.15789/2220-7619-COM-1825 (in Russian)
 16. Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Podoprigora I.V., Shagin D.A. Why Klebsiella pneumoniae is becoming a leading opportunistic pathogen. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2020; 22 (1): 4-19. doi: 10.36488/cmacc.2020.1.4-19 (in Russian)
 17. Voropaeva N.M., Nemchenko U.M., Sitnikova K.O. et al. Frequency of occurrence of strains with multiple antibiotic resistance in the structure of opportunistic microorganisms. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5): 145-153. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-1.16 (in Russian)
 18. Butranova O.I., Zyryanov S.K., Gorbacheva A.A., Putsman G.A. Analysis of the structure and indicators of antibiotic resistance of infectious agents in patients in intensive care units of a multidisciplinary hospital. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika*. 2023; 4: 4-14. doi: 10.37489/2588-0519-2023-4-4-1 (in Russian)
 19. Ahmad-Mansour N., Loubet P., Pouget C., Dunyach-Remy C. et al. Staphylococcus aureus toxins: an update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins (Basel)*. 2021; 13(10): 677. doi: 10.3390/toxins13100677
 20. Viksne R., Racenis K., Broks R. et al. In vitro assessment of biofilm production, antibacterial resistance of Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, and Acinetobacter spp. Obtained from Tonsillar Crypts of Healthy Adults. *Microorganisms*. 202; 11(2): 258. doi: 10.3390/microorganisms11020258.
 21. Gromoviykh T.I., Gorshina E.S., Sineva O.N. Methods of isolation and cultivation of microorganisms. Moskva, 2022. (in Russian)
 22. Voronkova O.S., Vorobey E.S., Rozhneva I.L., Shevchenko T.N. Effect of staphylococcal bacteriophage on the process of film formation of Staphylococcus aureus strains. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*. 2019; 8 (1): 71-77. (in Russian)
 23. Smirnova T.A., Didenko L.V., Azizbekyan R.R., Romanova Yu.M. Structural and functional characteristics of bacterial biofilms. *Mikrobiologiya*. 2010; 79 (4): 435-446. doi: 10.1134/S002626171004003X (in Russian)
 24. O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* 1998; 28; 3: 449-461.
 25. Ivushkina L. V., Mironov A. Yu. Microbiological monitoring of Klebsiella pneumoniae and mechanisms of their resistance to antimicrobial drugs in patients with tuberculosis in Moscow. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2024; 69(4): 131-41. doi: 10.51620/0869-2084-2024-69-4-131-141 (in Russian)
 26. Leonov V. V., Mironov A. Yu. Biofilm formation of opportunistic microorganisms in blood plasma depending on iron content. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(1): 52-4. (in Russian)
 27. Leonov V. V., Mironov A. Yu., Leonova L. V., Nikitina L. Yu. Etiological structure and biological properties of pathogens of bloodstream infections. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(11): 790-93. doi: 10.18821/0869-2084-2016-11-790-793. (in Russian)
 28. Frolova Ya. N., Kharseeva G. G., Mironov A. Yu. Sensitivity to antibiotics of biofilm cultures of toxigenic strains of Corynebacterium diphtheriae. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(6): 51-53. (in Russian)
 29. Frolova Ya. N., Ryabova A.M., Aidinov G. T. [et al.] Sensitivity to antibacterial drugs of the causative agent of diphtheria in the composition of biofilm. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(9): 89-90. (in Russian)
 30. Kharseeva G. G., Frolova Ya. N., Mironov A. Yu. Biofilms of pathogenic bacteria: biological properties and role in the chronization of the infectious process. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(4): 346-54. (in Russian)