

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пензенский государственный университет»

На правах рукописи

Маркелова Наталья Николаевна

**ПОЛИАНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ НЕКОТОРЫХ
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ И ВОЗМОЖНОСТИ ЕЁ
ПРЕОДОЛЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ**

03.02.03. Микробиология

диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Семёнова Елена Фёдоровна
к.б.н., с.н.с., профессор

Пенза - 2016 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
I. Сравнительная характеристика нозокомиальных условно-патогенных грамотрицательных бактерий (литературный обзор)	11
I.1. Таксономическая классификация	11
I.2. Микро - и макроморфология, физиологический статус	13
I.3. Критерии определения и идентификация изолятов	23
I.4. Чувствительность к антибиотикам и основные механизмы резистентности	26
I.5. Пути преодоления антибиотикорезистентности	38
I.6. Антимикробное действие эфирных масел различного происхождения	46
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	51
II. Материалы и методы исследования	51
II. 1. Объекты исследования	51
II. 2. Условия культивирования	52
II. 3. Методы анализа	53
III. Результаты исследования	58
III. I. Бактериологический мониторинг клинических материалов	58
III. I. 1. Идентификация изолятов бактерий	58
III. I. 2. Бактериальный профиль хирургических отделений	66
III. I. 3. Бактериальный профиль реанимационных отделений	73
III. I. 4. Динамика состава грамотрицательных бактерий стационара	79
III. II. Чувствительность к антибактериальным препаратам выделенных изолятов грамотрицательных бактерий	87
III. II. 1. Комплексная оценка антибиотикорезистентности	87
III. II. 2. Определение минимальных подавляющих концентраций антибиотиков и молекулярно-генетический анализ детерминант резистентности	102

III. III. Исследование антибактериальных эффектов эфирных масел различного происхождения и их сочетанного действия с антибиотиками в отношении некоторых видов грамотрицательных бактерий.....	117
III. III. 1. Чувствительность <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	117
III. III. 2. Чувствительность <i>Acinetobacter baumannii</i>	128
III. III. 3. Чувствительность <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	139
III. III. 4. Чувствительность <i>Klebsiella pneumoniae</i>	148
Заключение.....	157
Выводы.....	166
Практические предложения и рекомендации.....	167
Список сокращений и условных обозначений.....	169
Список использованной литературы.....	171
Приложения.....	195
А – Качественный и количественный состав эфирных масел.....	195
Б – Биохимическая идентификация грамотрицательных бактерий.....	196
В – Биохимическая идентификация грамположительных бактерий.....	202
Г – Антибактериальная активность сочетаний эфирных масел с антибиотиками.....	208

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности. Условно-патогенные грамотрицательные бактерии (УПГБ) нередко колонизируют биотопы человека, но способны к длительному существованию во внешней среде и не вызывают поражения у здорового человека. К ним, в основном, относятся представители обширного семейства *Enterobacteriaceae* и группы неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОВ) [105]. В современном мире УПГБ всё чаще становятся возбудителями внутрибольничных инфекций (ВБИ), при этом скорость формирования этими бактериями антибиотикорезистентности резко увеличилась в последние годы и достигла пандемического масштаба [195].

По своей природе грамотрицательные бактерии, более устойчивы к антимикробным агентам, чем грамположительные виды и, как правило, обладают высокой эффективностью в приобретении механизмов резистентности к антибиотикам, особенно под давлением селективного отбора [199, 205]. В настоящее время всё меньше остаётся антибиотиков, к которым микроорганизмы не выработали механизмов устойчивости, и отсутствуют новые антибактериальные соединения, находящиеся на стадии клинических испытаний, которые могли бы быть эффективны в отношении множественно лекарственно устойчивых (МЛУ) грамотрицательных бактерий [75, 212].

В течение последних десятилетий усилия по борьбе с устойчивостью микроорганизмов к антибактериальным препаратам, главным образом, сосредоточены на грамположительных бактериях, а именно, метициллинустойчивом *Staphylococcus aureus* и ванкомицинустойчивых *Enterococcus* sp. В связи с этим были разработаны новые антимикробные препараты с иными механизмами действия (линезолид, даптомицин) [160]. В отношении грамотрицательных бактерий такой активный поиск эффективных антибиотиков не проводился [175]. Единственный препарат из нового класса глицилциклинов – тигециклин, разработка которого не была направлена для

лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, оказался активным в отношении многих из них [207]. Параллельно с интенсивной борьбой против грамположительных бактерий грамотрицательные патогены, особенно, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* с появлением у них МЛУ стали наиболее значимыми возбудителями ВБИ в мире [44, 65, 149].

Специальной комиссией по изучению вопроса доступности антимикробных препаратов (ААТФ) Американского общества инфекционных болезней (IDSA) создан список приоритетных возбудителей, в который вошли *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae* как микроорганизмы с растущим уровнем невосприимчивости практически ко всем группам антибиотиков, так называемые «проблемные» бактерии. Из-за отсутствия новых препаратов лечение пациентов в случае инфицирования полирезистентными и панрезистентными грамотрицательными бактериями крайне затруднительно, поэтому важным обоснованием включения микроорганизмов в список стала потребность в разработке против них новых антимикробных средств [173].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определила устойчивость к противомикробным препаратам как одну из наиболее важных проблем, стоящих перед здоровьем человека. Наиболее распространённые патогены с высокой резистентностью к антимикробным препаратам вошли в группу микроорганизмов, охваченную в аббревиатуре "ESKAPE": *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp. На фоне известных «проблемных» УПГБ происходит широкое распространение нового эмерджентного микроорганизма — *Stenotrophomonas maltophilia*, характеризующегося природной резистентностью ко многим антимикробным препаратам, успешно адаптировавшегося в среде, окружающей человека, который также представлен ВОЗ одним из ведущих возбудителей оппортунистических инфекций [206].

В рамках решения проблемы антибиотикорезистентности УПГБ и возможностей её преодоления актуален поиск альтернативных антимикробных агентов, способных преодолеть устойчивость бактерий. В их числе эфирные

масла растительного происхождения [148]. Однако детальное изучение доступных для применения эфирных масел, их индивидуальных соединений и комбинированное действие антибиотиков и масел в отношении полирезистентных грамотрицательных бактерий оставалось неизученным.

Цель и задачи исследования. Цель – провести комплексный бактериологический мониторинг стационара, включающий определение уровня антибиотикорезистентности основных видов, и исследовать действие эфирных масел в отношении полиантибиотикоустойчивых грамотрицательных бактерий.

Задачи:

1. На основе бактериологического мониторинга выявить экологические и физиолого-биохимические особенности внутрибольничных видов.
2. Провести фенотипический и молекулярно-генетический анализ антибиотикорезистентности некоторых грамотрицательных бактерий.
3. Изучить антибактериальное действие эфирных масел, а также их сочетаний с антибиотиками в отношении тест-объектов.

Научная новизна. Впервые на основе комплексной системы мониторинга, определены особенности существования в среде лечебного учреждения условно-патогенных грамотрицательных бактерий *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, основных в структуре его бактериального профиля ($p < 0,05$): колонизация изолятами этих бактерий (более 80,0 %) биотопов пациентов соразмерно исследуемому в отделениях биоматериалу; половая принадлежность (*A. baumannii* в 1,7 раза чаще встречался у женщин, а *S. maltophilia* в 1,9 раза – у мужчин); возраст (*K. pneumoniae* в 2 раза чаще встречалась у детей, *P. aeruginosa* – в 3,5 раза у взрослых); выделение бактерий в монокультурах – 79,1 %; образование ассоциаций в большинстве случаев (69,0 %) только грамотрицательными бактериями; сезонность распространения (летне-осенняя – *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, весенне-осенняя – *A. baumannii*).

Используя комплекс фенотипических и молекулярно-генетических характеристик, впервые показана возможность дифференцирования внутрибольничных изолятов: 3 стабильных морфологических типа определены у

A. baumannii, несущих ген β -лактамазы типа OXA-40; 2 – у *P. aeruginosa*, один из которых продуцировал металло- β -лактамазу типа VIM.

Впервые по отношению к антибиотикоустойчивым *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* осуществлён скрининг антибактериальной активности эфирных масел различного происхождения и их сочетаний с антибиотиками, а также основных индивидуальных соединений, входящих в состав масел, и показана степень выраженности их бактерицидного и бактериостатического действия в зависимости от вида бактерий и происхождения масла. Масло розы крымской с главным компонентом β -фенилэтанолом показало самую высокую бактерицидную (МПК 1,95 мкл/мл) и бактериостатическую активность (46,0 – 83,25 % гибели клеток при МПК 0,97 мкл/мл).

Для исследования воздействия эфирномасличных субстанций в различных концентрациях на бактерии впервые использована модифицированная нами методика с построением кинетических моделей роста. Установлены взаимосвязи ростовых характеристик *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* с эффектами эфирных масел: между удлинением логарифмической фазы и гибелью бактериальных клеток при уровне значимости $p < 0,05$: *K. pneumoniae* – $R=0,92$, *P. aeruginosa* – $R=0,83$; *S. maltophilia* – $R=0,76$; *A. baumannii* – $R=0,73$; между подавлением роста *S. maltophilia* и *A. baumannii* маслами, содержащими линалоол, от его концентрации в них ($R=1,0$).

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные распространённости, колонизационной специфики *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и их возможных фенотипов антибиотикорезистентности могут быть использованы в организации локального бактериологического мониторинга больничных комплексов, способствующего сдерживанию антибиотикорезистентности и экспериментальному поиску новых антибактериальных средств. На основе сравнительной оценки биологической активности различных эфирных масел и их компонентов выявлены образцы с высокой противобактериальной активностью, что даёт возможность рекомендовать масла розы крымской, эвкалипта и индивидуальное соединение

β -фенилэтанол для всех изученных видов условно-патогенных бактерий; мятные масла ментольного сорта Заграва, линалоольного сорта Оксамитовая, лавандовое масло и индивидуальные соединения нерол, линалоол, цитраль – в отношении *A. baumannii* и *S. maltophilia*, мятное масло сорта Прилукская карвонная – в отношении *S. maltophilia*, ментол – в отношении *A. baumannii* в качестве перспективных антибактериальных субстанций. Синергетические комбинации масел розы крымской, розового дерева, мяты сортов Заграва, Бергамотная, Оксамитовая с β -лактамами антибиотиками и аминогликозидами могут быть перспективны для создания комплексных антимикробных средств.

Методология и методы исследования. Сбор и первичное обобщение фактов, описание наблюдаемых и экспериментальных данных, их систематизация и классификация основывались на эмпирическом и теоретическом познании, а также морфологических, физиолого-биохимических, молекулярно-генетических методах. С целью проверки рабочих гипотез в исследовании использовались методы статистики и теории вероятностей; выявления характера и особенностей связи между элементами и функциями изучаемых объектов – системный подход.

Положения, выносимые на защиту.

1. Бактериологический профиль стационара определяли грамотрицательные бактерии – 63,5 %, среди них 45,2 % составили *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*, которые характеризовались некоторыми особенностями: преобладанием в реанимационных отделениях по сравнению с хирургическими в 2,8 раза; неспецифической колонизацией биотопов человека; доминированием в очагах поражения; сезонностью распространения; различной частотой встречаемости в зависимости от пола и возраста пациентов.

2. Устойчивость *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* к цефалоспорином, фторхинолонам, карбапенемам составила от 12,8 до 100,0 % в зависимости от видовой принадлежности. Наибольшая резистентность отмечена у *A. baumannii* $\geq 84,5$ % и *P. aeruginosa* $\geq 43,5$ %, их стабильные субпопуляции имели фенотипические и молекулярно-генетические различия, включая

детерминанты резистентности, OXA-40 у *A. baumannii* и MBL VIM у *P. aeruginosa*.

3. Антибактериальное действие большинства эфирных масел, индивидуальных компонентов и комбинаций масел с антибиотиками на бактерии различно, при этом масло розы крымской и β -фенилэтанол показали высокую активность в отношении всех тест-объектов (МПК 1,95 мкл/мл), масло эвкалипта – в отношении *A. baumannii* (0,97 мкл/мл), цитраль – в отношении *S. maltophilia* (0,24 мкл/мл).

4. Ростовые характеристики бактерий положительно коррелировали с эффектами эфирных масел и их компонентов ($p < 0,05$) в бактериостатических концентрациях: увеличение продолжительности лаг-фазы со степенью подавления бактериального роста ($R \geq 0,73$); уровень ингибирования роста *S. maltophilia* и *A. baumannii* эфирными маслами, содержащими более 68,4 % линалоола, с его концентрацией в масле ($R = 1,0$).

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы и результаты исследования были представлены на IX Международной научно-практической конференции «Экология и ресурсосберегающие технологии на предприятиях народного хозяйства» (Пенза, 2009); X Международной научно-практической конференции «Окружающая природная среда и экологическое образование и воспитание» (Пенза, 2010); I и II Международных научно-практических конференциях «Современные проблемы отечественной медико-биологической и фармацевтической промышленности. Развитие инновационного и кадрового потенциала Пензенской области» (Пенза, 2011; 2012); на интернет – конференциях: XXX International Research and Practice Conference and the II Stage of the Championship in medical and pharmaceutical sciences «Modern medicine and pharmaceuticals: actual problems and prospects of development» (London, 2012), LXIX International Research and Practice Conference and the III Stage of the Championship in medical and pharmaceutical sciences «Modern medicine and pharmaceuticals: actual problems and prospects of development» (London, 2013); 78-ой итоговой студенческой научно-практической конференции с международным участием,

посвящённой 95-летию со дня рождения профессора Ю. М. Лубенского (Красноярск, 2014).

Основные положения исследовательской работы были изложены на заседаниях регионального лабораторного совета бактериологов и Общества бактериологов, эпидемиологов, инфекционистов Пензенской области, кафедры общей и клинической фармакологии медицинского института Пензенского государственного университета и рекомендованы к внедрению в практическую деятельность микробиологических лабораторий.

Глава I. Сравнительная характеристика нозокомиальных условно-патогенных грамотрицательных бактерий (литературный обзор).

I.1. Таксономическая классификация

В современной таксономической классификации *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* относятся к различным семействам и родам.

***Klebsiella pneumoniae*:** семейство *Enterobacteriaceae*, род *Klebsiella*. Исторически сложилось, что классификация видов *Klebsiella*, как и многих других бактерий, была основана на их патогенных функциях или происхождении. Первоначально род *Klebsiella* семейства *Enterobacteriaceae* подразделялся на два вида: *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*. Вид *K. pneumoniae* в свою очередь включал три подвида: ssp. *pneumoniae*, ssp. *ozaenae*, ssp. *rhinoscleromatis*, названных в соответствии с заболеваниями, которые они вызывали. С появлением молекулярно-генетических методов идентификации состав рода *Klebsiella*, изменился и расширился. Секвенированием 16S рРНК были обнаружены кластеры: I (*K. oxytoca*); II (*K. terrigena*), III (*K. planticola* и *K. ornithinolytica*); IV (*Enterobacter aerogenes*, ранее *K. mobilis*), V (*K. pneumoniae*) [45]. На основании последовательностей других генов внутри рода *Klebsiella* были выявлены отличия, в результате чего подтвердилось разделение *K. terrigena* и *K. pneumoniae* на два самостоятельных рода, которые были названы *Raoultella* и *Klebsiella* соответственно. *K. planticola* и *K. ornithinolytica* также вошли в род *Raoultella*. При анализе нуклеотидных последовательностей информативных генов, которые слабо подвержены генетическим рекомбинациям (РНК-полимеразы, ДНК-гиразы), и метаболических генов (малатдегидрогеназы, нитрогеназы) были выделены дополнительные виды рода *Klebsiella*, встречающиеся в окружающей среде (*K. variicola*, *K. singaporensis*, *K. milletis*, *K. senegalensis*) [113, 141]. Кроме того, есть филогенетически и фенотипически различающиеся штаммы *K. pneumoniae*, которые в будущем могут быть определены как самостоятельные виды, например, как недавно выделенная *K. variicola* [78].

***Pseudomonas aeruginosa*:** семейство *Pseudomonadaceae*, род *Pseudomonas*. Род *Pseudomonas* описан Migula W. в 1894 году как род грамотрицательных палочковидных микроорганизмов. Методы ДНК-РНК гибридизации выявили пять классов РНК внутри этого рода. В результате, отдаленно родственные виды *Pseudomonas*, были размещены в существующие или вновь определенные роды. Виды II и IV группы РНК были отнесены к роду *Stenotrophomonas*, в I группе РНК остались виды флуоресцентной подгруппы псевдомонад, в том числе, *P. aeruginosa* вместе с подгруппами *Acinetobacter* и *Teredinibacter*. На основании изучения последовательностей 16S рРНК из I группы выделили род *Pseudomonas*, в который вошли *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*. Ранее, до проведения молекулярно-генетического исследования, Gessard C. выделил *P. aeruginosa* как самостоятельный вид и назвал его *Bacillus pyocyaneus*. В настоящее время этот вид идентифицируют до различных генетически отличающихся внутривидовых таксонов, так как они в разной степени связаны с заболеваниями у человека [201].

***Acinetobacter* sp.:** семейство *Moraxellaceae*, род *Acinetobacter*. Голландский микробиолог Бейеринк впервые выделил *Acinetobacter* в 1911 году из почвы, но как род *Acinetobacter* был широко принят только к 1968 году, благодаря комплексным исследованиям бактерий *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes hemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola* и *Bacterium anitratum*. В дальнейшем, род *Acinetobacter* отнесли к семейству *Moraxellaceae* [83]. Различные виды *Acinetobacter* могут обладать отличающимся патогенным потенциалом, актуализируя выявление генетических различий внутри рода. Секвенирование 16S рРНК генов недостаточно, чтобы различить *Acinetobacter* sp., так как они консервативны и идентичны друг другу у *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. calcoaceticus* и *A. baumannii*, для этого необходимо секвенирование гена РНК-полимеразы [197]. На сегодняшний день род *Acinetobacter* включает 33 вида и 10 ДНК-ДНК гибридизированных групп (геномовидов). Виды *A. pittii*, *A. nosocomialis*, прежде называвшиеся геномным видом 3, геномным видом 13TU, соответственно, и *A. calcoaceticus* чаще других, кроме *A. baumannii*, встречаются в

госпитальной среде. С заболеваниями человека также связаны виды *A. lwoffii*, *A. junii* и *A. haemolyticus*. Некоторые представители рода *Acinetobacter* редко вызывают болезни, но колонизируют кожу, это *A. johnsonii* и *A. radioresistens* [179].

***Stenotrophomonas maltophilia*:** семейство *Xanthomonadaceae*, род *Stenotrophomonas*. *Stenotrophomonas maltophilia*, первоначально выделенный из плевральной жидкости человека, был назван «*Bacterium bookeri*». Впоследствии его классифицировали как *Pseudomonas maltophilia*, а затем – *Xanthomonas maltophilia*. В результате изучения ДНК-РНК гибридизации, секвенирования генов 16S рРНК бактерию отнесли к роду *Stenotrophomonas*. В настоящее время род содержит 12 видов, 11 из которых первоначально были выделены из различных природных источников [171]. Вид *S. maltophilia* отличается высоким генетическим разнообразием, является экологически универсальным, включая как изоляты из окружающей среды, так и изоляты клинического происхождения. Генотипирование с выявлением внутривидовых геномных групп с различной степенью патогенности позволяет дифференцировать их между собой. Путём секвенирования гена ДНК-гиразы уже получены подобные группы *S. maltophilia*, но на сегодняшний день данные разрознены, чтобы применять их в клинической практике [21,73].

1.2. Микро - и макроморфология, физиологический статус

Видовые особенности *K. pneumoniae*. *K. pneumoniae* повсеместно встречается в природе: в естественных водоемах, сточных водах, почве; присутствует в виде сапрофитов в носоглотке и желудочно-кишечном тракте человека. Представляет собой грамотрицательные, неподвижные, как правило, инкапсулированные палочковидные бактерии овальной формы, имеющие размеры 0,3–1,0 х 0,6–6 мкм. На плотных средах *K. pneumoniae* образует различные колонии: гладкие слизистые куполообразные с ровными краями диаметром 2,0–3,0 мм, которые соответствуют капсульным штаммам, и более

мелкие грубые шероховатые, состоящие из бактериальных клеток, лишённых капсулы. На «кровяном» агаре образуются колонии блестящие круглые кремовые и без зоны гемолиза; на мясопептонной плотной среде – светло-молочного цвета полупрозрачные [2, 12]. Сверхслизистые фенотипы *K. pneumoniae* отличаются повышенной вирулентностью изолятов и образуют на «кровяном» агаре сливающиеся бактериальные колонии, которые растягиваются стандартной бактериологической иглой в вязкий тяж длиной более 10 мм [102].

Клебсиеллы – факультативные анаэробы, хемоорганотрофы, температурные границы роста 10–43 °С. Бактерии оксидазоотрицательны, каталазоположительны, образуют лизиндекарбоксилазу, но не орнитиндекарбоксилазу, положительны в тесте Фогеса-Проскауэра, ферментируют углеводы с образованием кислоты и газа. *K. pneumoniae* наиболее устойчивый к антибиотикам вид в роде *Klebsiella*, а многие его штаммы утратили способность фиксировать азот и в геноме содержат факторы вирулентности, основными из которых являются капсульный полисахарид, адгезины, сидерофоры [113].

Подавляющее большинство изолятов *K. pneumoniae* имеет хорошо выраженную капсулу, защищающую бактерии от фагоцитоза и бактерицидных факторов сыворотки крови. Полисахариды капсулы ингибируют дифференцировку и функциональную способность макрофагов. В настоящее время насчитывается 77 капсульных (K) типов бактерии, из них K1 и K2 значительно распространены. Однако некоторые клоновые группы K1 и K2 резко превосходят другие по своей вирулентности, связанной с наличием плазмиды, несущей ген-регулятор экспрессии слизистого фенотипа (*gmpA*) и ген сидерофора (SP) аэробактина [103]. К таким штаммам относится гипервирулентный (*hypermucoviscous*) вариант *K. pneumoniae* (*hvKP*), который вызывает опасные для жизни инфекции у молодых, здоровых людей [154]. Сидерофоры *K. pneumoniae* энтеробактин и аэробактин обеспечивают микробные клетки железом (Fe^{3+}). Энтеробактин синтезируют почти все штаммы *K. pneumoniae*, при этом железо изолируется ими преимущественно из трансферрина. Источником железа для

аэробактина являются клетки хозяина, и синтез этого сидерофора в большей степени связан с вирулентностью штаммов микроорганизма [78].

K. pneumoniae обладает пилиями общего типа (или тип I), которые являются бактериальными адгезинами и могут выходить за пределы капсульной матрицы. Белок адгезии в этом типе пилей способен связываться с маннозосодержащими трисахаридами гликопротеинов, представленных в слизи и на поверхности эпителиальных клеток. Адгезия к поверхности является первым шагом в формировании биопленки, но адгезины также могут играть важную роль на последующих этапах её развития, например, содействуя межклеточным контактам. Практически у всех изолятов *K. pneumoniae* есть пили третьего типа, которые опосредуют связывание с коллагеном тканей организма, к тому же, принимают участие в образовании биопленки, улучшая адгезию к абиотическим поверхностям [161].

В настоящее время устойчивость микроорганизмов к антибактериальным агентам может рассматриваться как фактор, способствующий их успешному распространению в окружающих условиях, особенно в стационарах, где они получают селективные преимущества. При этом наблюдаются изменения в физиологических характеристиках госпитальных клонов, что отражается во взаимосвязи между вирулентностью и лекарственной устойчивостью. Нозокомиальные изоляты *K. pneumoniae* отличаются высоким уровнем антибиотикорезистентности, что способствует выживанию при взаимодействии с организмом хозяина. В то же время, некоторые факторы вирулентности, такие как капсульные полисахариды K1, K2, K5, гены *mpa* и аэробактин отсутствуют в изолятах бактерий, продуцирующих ферменты устойчивости – карбапенемазы КРС [101]. Подобные изоляты *K. pneumoniae*, не обладающие специфическими факторами вирулентности, подавляют врожденные защитные механизмы хозяина чрезмерными микробными нагрузками в процессе неконтролируемой пролиферации бактериальных клеток под влиянием неэффективной антибактериальной терапии, оставаясь важными нозокомиальными патогенами [184]. У *K. pneumoniae* описан ген *AmpR*, который действует как регулятор

вирулентности. В присутствии β -лактамов, активная форма AmpR может индуцировать экспрессию цефалоспориназы AmpC и модулировать вирулентность, регулируя адаптацию бактерий к окружающей среде. В отсутствие цефокситина, клавулановой кислоты, имипенема выражение гена AmpC репрессировано и связано с повышенной экспрессией вирулентности, которая выражается в синтезе капсулы, устойчивости к бактерицидному действию сыворотки крови, образованием биопленки, синтезом пилей [79].

Видовые особенности *P. aeruginosa*. Вид *P. aeruginosa* имеет широкий круг хозяев, включая растения, насекомых и млекопитающих, при этом является одним из основных условных патогенов человека. Характеризуется высокими адаптивными способностями и наличием большого количества факторов вирулентности. В ответ на изменения окружающей среды у него активируется дифференциальная экспрессия генов, а именно тех, которые необходимы для успешной колонизации и роста. В подтверждение сказанному, *P. aeruginosa* имеет большое количество регуляторных генов, наблюдаемых в секвенированных бактериальных геномах, генов, участвующих в катаболизме, транспорте и оттоке органических соединений, системах хемотаксиса. Размер и сложность генома *P. aeruginosa* позволяет ему существовать в различных средах и противостоять воздействию антимикробных веществ [168].

P. aeruginosa – грамотрицательная палочка, имеет 1 или 2 полярных жгутика; размер клеток варьируют в пределах $(1,5-3) \times (0,3-0,5)$ мкм. Бактериальные колонии на мясопептонном агаре могут быть выпуклыми или плоскими неправильной формы, слизистыми или суховатыми, но чаще всего они средних размеров 2–5 мм, сероватые и полупрозрачные. Нередко рост сопровождается феноменом «радужного лизиса» (нежный металлический налёт), обусловленного спонтанным действием бактериофага. На 5 % «кровяном» агаре бактерия образует гладкие или шероховатые колонии, отличающиеся по консистенции, пигментообразованию, наличию зон гемолиза. Малыми размерами и морщинистой поверхностью характеризуются колонии изолятов *P. aeruginosa*, способных формировать биопленки [97].

P. aeruginosa – оксидазоположителен, нитраты восстанавливает до нитритов, окисляет углеводы, сахара, органические кислоты через путь Энтнера-Дудорова и цикл лимонной кислоты. Обычно аэроб, но может выжить в бескислородных условиях, в частности, осуществляя процесс денитрификации, и образовывать биопленки в микроаэробных условиях. *P. aeruginosa* является мезофильной бактерией, растет при температуре от 4 °C до 42 °C и выше с оптимальной температурой роста 37 °C [129]. Одной из наиболее характерных черт *P. aeruginosa* является производство пигментов: феназинового нефлуоресцирующего сине-зелёного – пиоцианина (редокс-активный токсин), флуоресцирующего жёлто-зелёного – пиовердина (сидерофор), красного – пиорубина, коричнево-чёрного – пиомеланина, которые играют важную роль в бактериальной физиологии и патогенезе [121].

Патогенность этого микроорганизма связана с наличием ряда факторов вирулентности. Цитотоксическим действием, в том числе, и в отношении макрофагов, а также способностью подавлять биосинтез белка обладают экзотоксин А и пиоцианин; нейраминидаза, отщепляя остатки сиаловых кислот от клеточных рецепторов, облегчает специфическую адгезию бактерии. Разнообразные способы подвижности *P. aeruginosa* играют важную роль в тканевой инвазии (жгутикопосредованное плавание в жидких средах, «роение» по плотной поверхности) и адгезии (прикрепление к клеткам эпителия путём сокращения пилей IV типа) [6].

Адаптивные способности *P. aeruginosa* в нозокомиальной среде связаны с доминированием антибиотикоустойчивых изолятов, характеризующихся отсутствием агрессивных вирулентных факторов, как например, клоны ST-111, ST-175, ST-235, которые несут ответственность за ВБИ, вызванные МЛУ *P. aeruginosa* по всему миру [79]. Подобные клоны ассоциированы с нарушением продукции пиоцианина и пиовердина, имеют также дефекты подвижности. Предполагается, что последние невыгодны метаболически или с точки зрения активирования ими иммунной системы хозяина. Изменения в метаболизме способствуют ограничению доступа питательных веществ и кислорода к клеткам,

что в полной мере поддерживается в биоплёнках. В этих структурированных многоклеточных сообществах, внедренных в полимерную матрицу, бактерии склонны к медленному росту или существованию в стационарной фазе. Таким образом, отсутствие пигмента, нивелирование подвижности, устойчивость к антибиотикам и формирование биопленки способствуют успешному выживанию и распространению адаптированной *P. aeruginosa* в госпитальных условиях [192].

Особенности *Acinetobacter* sp. и *A. baumannii*. Род *Acinetobacter* включает широкую группу физиологически универсальных бактерий, которые занимают различные экосистемы и играют всё большую роль в возникновении оппортунистических инфекций человека. *Acinetobacter* sp. представляют собой грамотрицательные, аэробные, плеоморфные и неподвижные, оксидазоотрицательные бактерии. Род характеризуется отсутствием сахаролитических ферментов, инертностью к аминокислотам. Чаще представлены короткими палочками $(0,9-1,6) \times (1,5-2,5)$ мкм, которые могут быть ошибочно приняты за грамположительные кокки при вариабельной окраске микроскопического препарата [83]. Различные виды *Acinetobacter* могут быть выделены практически из всех почвенных и поверхностных проб воды. Природные условия для УПГБ *A. baumannii* и *A. nosocomialis* в настоящее время не известны. В исключительно редких случаях *A. baumannii* является частью нормальной микрофлоры человека, но часто ассоциируется с инфекциями кожи и слизистых оболочек. *A. baumannii* колонизирует покровы с нарушенной целостностью, возникающей при ранениях, травмах, оперативных вмешательствах и инвазивных манипуляциях [138].

Acinetobacter sp. может образовывать капсулу; хорошо растёт на плотных средах с овечьей кровью, на трипсиново-соевом агаре при температуре инкубации 30–35 °С, образуя гладкие, иногда мукоидные, серовато-белые или серовато-жёлтые колонии. *A. haemolyticus* и геномные виды 6, 13BJ, 14BJ, 15BJ, 16 и 17, могут вызвать гемолиз эритроцитов барана при росте на «кровяном» агаре. Диаметр колоний видов комплекса *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* составляет от

1,5 до 3 мм (18 – 24 часа роста), большинство других видов *Acinetobacter* имеют меньшие по размеру и более прозрачные колонии [27, 56,114].

Основные механизмы вирулентности *A. baumannii* включают поглощение железа, присоединение к эпителиальным клеткам и образование биопленки. Наличие сидерофоров может обеспечить конкурентное преимущество для возбудителя по сравнению с другими микроорганизмами. Высокий уровень избыточной экспрессии нескольких систем приобретения железа имеет значение для выживания *A. baumannii* в железодефицитной среде, внося значительный вклад в патогенность этого вида [66]. Генетические компоненты, необходимые для поглощения железа через сидерофор ацинетобактин, вовлечены в горизонтальный перенос генов, а также сложные хромосомные перестройки, что согласуется с патогенным потенциалом *A. baumannii* приобретения сторонних генов факторов вирулентности [213]. Микроорганизм взаимодействует с альвеолярными эпителиальными клетками человека опосредовано через белок наружной мембраны OmpA, который вызывает дисфункцию митохондрий, сопровождающуюся выходом цитохрома C и белка гема, что приводит к апоптозу клеток, также OmpA принимает участие в образовании биопленки [71]. Другие ключевые белки, способствующие вирулентности *A. baumannii*, включают фосфолипазы D и C, которые обуславливают устойчивость к сыворотке человека и усиление токсичности в отношении эпителиальных клеток, соответственно. *A. baumannii*, *A. nosocomialis* и *A. pittii* широко распространены в условиях стационара, демонстрируя сродство к абиотическим поверхностям, что обусловлено наличием гена адгезии csuE. Этот ген участвует в образовании пилей и биопленок. Пили прикрепляются к стеклу и полимерному оборудованию, и инициируют формирование микроколоний, а затем полное развитие структур биоплёнки. Кроме того, *A. baumannii* может выжить в условиях высыхания гораздо лучше, чем большинство других *Acinetobacter* sp. [158].

Устойчивость к антибиотикам *A. baumannii* может зависеть от приобретения им генов резистентности через горизонтальный перенос. Многие клинические штаммы *A. baumannii* способны захватывать ДНК, передвигаясь по влажной

поверхности. Подвижность *A. baumannii* обеспечивается пиями IV типа и зависит от доступности железа. Предположительно, генетические детерминанты, придающие устойчивость к антибактериальным препаратам, были приобретены от родственных видов бактерий, принадлежащих родам *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia* [204]. Также было обнаружено, что умеренные фаги могут выступать в качестве векторов для горизонтального переноса генов, что ранее недооценивалось [41]. В результате описанных физиологических процессов произошло быстрое появление полирезистентных изолятов *Acinetobacter* sp., которые акклиматизировались в условиях среды больничных комплексов. Врожденные механизмы сопротивления микроорганизма в сочетании со скоростью приобретения детерминант устойчивости сыграли решающую роль в распространении возбудителя по всему миру [122].

Видовые особенности *S. maltophilia*. *S. maltophilia* – микроорганизм, который имеет форму прямой или слегка изогнутой грамотрицательной палочки; его длина находится в пределах 0,5 – 1,5 мкм; подвижен, с несколькими полярными жгутиками; не накапливает поли-β-оксибутират в качестве запасного вещества во внутриклеточных гранулах. На «кровяном» или «шоколадном» агаре после 18 часов роста можно обнаружить крошечные белые гладкие блестящие с ровными краями колонии, через 48 часов они становятся крупнее и приобретают бледно-желтый цвет, вокруг них наблюдается β-гемолиз, а среда может стать зеленоватого цвета вокруг сплошного роста бактерий [57, 125, 137].

Большинство изолятов *S. maltophilia* оксидазоотрицательные, но современные данные показывают, что некоторые – оксидазоположительные. Микроб является облигатным аэробом, не растёт при температурах ниже 5 °С или выше 40 °С, относительно метаболически неактивен, но как биodeградант использует в процессе жизнедеятельности необычные субстраты. Клетки *S. maltophilia* имеют способность к выживанию в сверхчистой воде. В ответ на голодание или стресс они снижают затраты энергии на хемотаксис, формируя ультрамикроскопические клетки (0,1 – 0,2 мкм), способные образовывать биопленки и не культивируемые на обычных питательных средах [135].

S. maltophilia занимает в природе различные экологические ниши, включая водные места обитания, в том числе, бедные питательными веществами; почву, растительные прикорневые зоны, организм животных. Некоторые изоляты из окружающей среды разлагают природные и техногенные загрязнители. В последние годы произошло широкое распространение *S. maltophilia* в госпитальных условиях, обусловленное преимуществами множественной лекарственной устойчивости, свойственной этой бактерии. Колонизация биотопов пациента микроорганизмом происходит в стрессовых условиях, таких как высокая температура тела, иммунологический ответ, воздействие антибиотиков и обеспечивается более высокой мутационной способностью клинических изолятов *S. maltophilia*. Приобретение штаммами *S. maltophilia* генов резистентности, которые они сохраняют, происходит в основном в окружающей среде; в изменённой больничной обстановке эти гены успешно экспрессируются [22, 60, 120]. Анализ клинических и экологических изолятов *S. maltophilia* выявил их геномную гетерогенность, обусловленную способностью как приобретать гены антибиотикоустойчивости от различных бактерий, в том числе, грамположительных, так и передавать их представителям семейства *Enterobacteriaceae* и *P. aeruginosa* и показал, что микроорганизм имеет черты, связанные с вирулентностью других видов бактерий. При этом молекулярные механизмы, лежащие в основе устойчивости к антимикробным агентам и вирулентности, могут изменяться не только между видами, но и между штаммами внутри вида *S. maltophilia* [61].

Различные внеклеточные ферменты *S. maltophilia*, проявляют вирулентные свойства: ДНКаза, желатиназа, гемолизины, липазы, протеиназы и протеазы. Фосфолипаза расщепляет фосфолипиды жирных кислот и участвует в разрушении клеточных мембран. *S. maltophilia* обладает пиями: одни причастны к адгезии и образованию биопленки, в результате чего происходит колонизация биотических и абиотических поверхностей, другие – уклонению от иммунного ответа и лекарственной устойчивости. SMF-1-пили вызывают агглютинацию эритроцитов животных, они более выражены на поверхности бактериальной клетки при 37 °C

и проявляют идентичность с пиями *E. coli* и *P. aeruginosa*. Способствовать адгезии может и необычный положительный заряд клеточной поверхности *S. maltophilia*. Супернатанты штаммов *S. maltophilia* вызывают гибель клеток линий Hep-2, HeLa и Vero, а также округление и отделение фибробластов человека, изменяя актиновый цитоскелет. Гемолитическая активность *S. maltophilia* зависит от источника крови и может различаться в зависимости от фосфолипидов клеточных мембран эритроцитов [95, 156, 182]. Липополисахарид (ЛПС) микроба вносит свой вклад в антимикробную резистентность и вирулентность *S. maltophilia*: уменьшение производства ЛПС у мутантов увеличивает их восприимчивость к некоторым антимикробным агентам и штаммы становятся полностью авирулентны в животной модели инфекции, легко погибая от факторов иммунной защиты хозяина [180]. Интегроны, гиперэкспрессия эффлюксных систем, формирование меланиноподобного пигмента, защищающего клетки от воздействия окружающей среды, и биопленки гораздо чаще встречаются у МЛУ изолятов *S. maltophilia*, чем у чувствительных к антибиотикам штаммов, что делает их своеобразными маркёрами полирезистентности [133]. Избыточная экспрессия системы активного выведения SmeDEF придает устойчивость к антибиотикам, принадлежащим к различным группам, и сопряжена со снижением вирулентности *S. maltophilia* [92]. В пределах интегронов штаммы содержат генные кассеты, которые несут гены устойчивости к антибиотикам, четвертичным аммонийным соединениям и являются резервуаром детерминант лекарственной устойчивости в медицинских учреждениях [115]. Биопленки проявляют фенотипические характеристики, которые отличают их от планктонных форм, в том числе, повышенной устойчивостью к иммунной защите и противомикробным соединениям; регуляция жизнедеятельности в биоплёнке осуществляется передачей сигналов между бактериальными клетками специальными молекулами DSF (diffusible signal factor) [25, 104].

I.3. Критерии определения и идентификация изолятов

Идентификация бактерий на основе обычных фенотипических методов, включает культурально-морфологические признаки и физиолого-биохимические свойства. В лабораториях клинической микробиологии получили широкое распространение автоматизированные и неавтоматизированные коммерческие биохимические тест-системы, состоящие из субстратов, предназначенных для ферментативного расщепления или утилизации микроорганизмами. Полученный метаболический профиль испытуемого изолята сравнивается с соответствующей базой данных. Наиболее известные автоматизированные приборы VITEK (bioMérieux), Phoenix (Becton Dickinson), MicroScan (Dade Behring); результат определения составляет 3-6 ч для грамотрицательных бактерий и состоит из большого количества тестов (> 40) [86]. Таксономические изменения микроорганизмов являются постоянными, и существует необходимость их интеграции с бактериологическими анализаторами. Добавление большего количества таксонов в их базу не обязательно улучшает точность системы, особенно, если данный продукт не может вместить дополнительные биохимические характеристики, в результате, точность идентификации снижается. Чтобы прийти к окончательному определению видов, ответ, полученный из коммерческой системы, должен быть оценен вместе с характером роста микробов на питательных средах, морфологией колоний, результатами антимикробной восприимчивости, источником клинического образца [84]. Исследования, изучающие эффективность этих коммерческих систем идентификации показали противоречивые результаты, часто не учитывающие переменные характеристики, наблюдаемые среди изолятов того же вида, что приводит к снижению точности определения микроорганизмов, особенно грамотрицательных неферментирующих палочек, к которым принадлежат роды *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*. Количество приемлемых биохимических реакций у этих бактерий ограничено из-за сниженной реакционной способности, в том числе, брожения сахаров. При нынешней

систематике и номенклатуре классические методы идентификации всё чаще не отвечают требованиям современной микробиологии, где важным является признание не только геновидов, но и внутривидовых групп, различающихся генетически [70]. Разработанные молекулярные методы для микробной идентификации, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени, анализ последовательности, или анализ микрочипов, нашли применение в бактериологии. Наиболее эффективным является гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE – Pulsed-field gel electrophoresis), при котором проводится разделение геномной ДНК на фрагменты (10–20) с помощью рестриктаз и последующая сепарация путём электрофореза в геле; полученные продукты реакции сравниваются с образцами из базы данных. Метод позволяет выявить не только геновиды, но и эпидемические клоны. Мультилокусное секвенирование-типирование (MLST – Multi Locus Sequence Typing) основано на изучении полной нуклеотидной последовательности определённого участка/участков ДНК бактерии и позволяет проводить достоверную субвидовую идентификацию микроорганизмов [43]. Матрично активированная лазерная десорбция/ионизация – времяпролётная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS) стала новой технологией для идентификации видов, которая проводит анализ состава белка в бактериальной клетке. Измеряя точные размеры пептидов и малых белков, характерных для каждого вида бактерий, можно их идентифицировать в течение нескольких минут при наличии целых клеток, клеточных лизатов или бактериальных экстрактов. MALDI-TOF MS представляет собой дополнительный фенотипический подход к генетической классификации микроорганизмов, обеспечивающий данные об уровне экспрессии тех или иных генов у изолятов [52, 134, 16].

Большинство тест-систем и автоматизированных методов пока не включают субстраты, которые отличают все виды рода *Klebsiella* (*K. pneumoniae* и *K. variicola* различаются генотипированием), а также внутрибольничные изменённые изоляты *K. pneumoniae* [116]. Выделение и идентификация культуры *P. aeruginosa* базируется на классических фенотипических характеристиках, которых вполне

достаточно для выявления возбудителя в большинстве клинических образцов. Микроорганизм легко определяется по морфологии колоний, производству пигмента пиоцианина, росту на дифференциально-диагностических средах. Нетипичные фенотипы микроба часто связаны с потерей способности пигментообразования. В этом случае, можно провести ошибочное определение его принадлежности к виду *P. aeruginosa* при помощи коммерческих тест-систем или традиционных методов идентификации, затруднённое дифференциацией с различными неферментирующими грамотрицательными бактериями, в том числе, другими видами рода *Pseudomonas*. Очевидно, что только молекулярные методы могут способствовать выявлению сложных фенотипов и эпидемических клонов этого микроорганизма [188]. Точная идентификация *Acinetobacter* sp. на видовом уровне необходима для выбора соответствующей терапии, так как существуют различия в антимикробной эффективности против клинически важных штаммов различных видов. Фенотипические тесты, предложенные Bouvent и Grimont в 1986–1987 гг. включают рост при 37 °C, 41 °C, и 44 °C, образование кислоты из глюкозы; гидролиз желатина и усвоение 14 различных источников углерода. Спектр тестов оказался недостаточным для выявления внутривидовых различий *Acinetobacter* sp. [58]. Определение их полуавтоматическими и автоматическими методами на коммерческих тест-системах, которые в настоящее время используются в диагностической микробиологии, также остаётся проблематичным, так как требует постановки дополнительных тестов для дифференциации рода *Acinetobacter*, не связанных с биохимическим профилем микроорганизма [138]. В базах этих анализаторов четыре вида *Acinetobacter* (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii* (геномный вид 2), *Acinetobacter* геномный вид 3 и *Acinetobacter* геномный вид 13TU) имеют фенотипическое сходство, их трудно отличить, поэтому они определяются как *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* комплекс [28]. Перспективные результаты идентификации *Acinetobacter* sp. были получены времяпролётной масс-спектрометрией. Традиционная идентификация по биохимическим тестам ненадежно различает и *S. maltophilia* от других видов и родов. Некоторые

клинические изоляты *S. maltophilia* характеризуются особенностями, затрудняющими их определение: образуют колонии малых размеров, растущие только на богатых средах, например, на «шоколадном» агаре после длительной инкубации; биохимически инертны для фенотипической идентификации; неспособны расти на среде Мюллер-Хинтона [167]. Такие штаммы требуют молекулярных методов определения, но и для обычных культур условия изоляции и дифференциации основательно не разработаны.

I.4. Чувствительность к антибиотикам и основные механизмы резистентности

Механизмы устойчивости грамотрицательных бактерий к антимикробным препаратам можно разделить на неферментативные и ферментативные. К первым относятся нарушение проницаемости наружной мембраны и активное выведение субстратов из клетки. Все грамотрицательные бактериальные клетки покрыты наружной мембраной. Гидрофильные растворенные вещества, преимущественно проходят через заполненные водой каналы поринов, но существуют ограничения для притока различных органических молекул, особенно лекарственных средств. Пориновые каналы довольно узкие (OmpF порин *E.coli* имеет поперечное сечение $7 \times 11 \text{ \AA}$ в самом узком месте). Очень медленной диффузией малых молекул отличается порин OprF *P. aeruginosa*. Упорядочение молекул воды в канале, в связи с наличием кислотных и основных аминокислотных остатков на противоположных сторонах стенки канала приводит к затруднённому проникновению через него липофильных молекул. Основной путь для них связан с прохождением через двухслойную липидную мембрану, наружный слой которой состоит целиком из липополисахаридов с очень низкой текучестью. Мутационная потеря основных поринов увеличивает устойчивость к гидрофильным антибиотикам, таким как β -лактамы, при этом питательные вещества, особенно при низких концентрациях, также не проникают в клетку [144, 150].

Эффлюкс имеет значение как физиологический способ детоксикации внутриклеточных метаболитов, реализации бактериальной вирулентности, межклеточной сигнализации и клеточного гомеостаза. Этот механизм не обеспечивает высокого уровня резистентности к антибиотикам, но увеличивает их минимальную подавляющую концентрацию (МПК), позволяя бактериям достичь значительной устойчивости в совокупности с другими механизмами. Системы активного выведения типа RND (resistance-nodulation-division) наиболее характерны для грамотрицательных бактерий и составляют комплекс из периплазматического белка, например, AcrA, канала наружной мембраны, и белка-насоса, например, AcrB, аналогичного тому, который осуществляет протонный антипорт в цитоплазматической мембране. Подобная эффлюксная система AcrAB у *K. pneumoniae* обеспечивает устойчивость не только к антибиотикам, но и к антимикробным пептидам неспецифической иммунной системы человека, что может расцениваться как новый фактор вирулентности бактерии [61, 150]. Экспрессия генов хромосом, кодирующих RND, вносит значительный вклад в устойчивость грамотрицательных бактерий к веществам с антимикробной активностью, так как в процессе эффлюкса из клетки выводится широкий спектр субстратов, включающий антибиотики, красители, биоцидные вещества, детергенты и антисептики. Синергизм между эффлюксом и нарушенной проницаемостью наружной мембраны приводит к эффективной лекарственной устойчивости [29].

Способность к производству ферментов, разрушающих антибиотики, характерна для всех микроорганизмов, но некоторые ферментативные механизмы устойчивости, найденные у грамотрицательных бактерий, обеспечили им господствующее положение в клинических условиях, в том числе, связанное с возможностями внутривидового и межвидового распространения детерминант резистентности, через подвижные генетические элементы путем горизонтального переноса [124, 166].

β -лактамы. Устойчивость микроорганизмов к β -лактамам обеспечивается ферментами β -лактамазами, которые на основании идентичности аминокислотной

последовательности разделены на четыре класса разнородных молекул и обозначены А, В, С и D. Каталитические центры β -лактамаз классов А, С и D представлены серином, класса В – металлоэнзимами с цинком в составе кофактора. Расширенного спектра β -лактамазы (ESBL), принадлежащие к классу А, описаны у семейств *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* и рода *Acinetobacter*, но наиболее часто встречаются у *K. pneumoniae* и *E. coli*. Большинство ESBL относятся к SHV или TEM типам, которые произошли от β -лактамаз узкого спектра [36]. Другие редкие виды ESBL включают типы VEB и PER, первые чаще обнаруживают у клинических штаммов *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter* sp., вторые встречаются у *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* sp. Они отличаются умеренным подавлением ингибиторов β -лактамаз и имипенема. Среди β -лактамаз класса А число ферментов с карбапенемазной активностью ограничено, наиболее широко из них распространены ферменты GES и KPC, которые кодируются генами, расположенными на подвижных генетических элементах, способствующих их распространению. Спектр действия GES включает: пенициллины, цефалоспорины расширенного спектра, карбапенемы, но активность в отношении последних двух групп антибиотиков низкая. Следует отметить, что некоторые варианты GES, проявляют значительное карбапенемазное действие и всё в большей степени обнаруживаются в грамотрицательных палочках, в частности у *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* [40, 117, 142]. Гены, кодирующие ESBL, обычно находятся на плазмидах вместе с генами, кодирующими устойчивость к аминогликозидам, триметоприм-сульфаметоксазолу, тетрациклинам, хлорамфениколу [140]. Ферменты расширенного спектра OXA (oxacillin-hydrolyzing β -lactamase) класса D гидролизуют цефалоспорины третьего и четвёртого поколения, азтреонам, карбапенемы и не ингибируются клавулановой кислотой и тазобактамом. Большинство OXA кодируются плазмидами. Ввиду лёгкости их передачи от одной бактерии к другой, эти ферменты стали широко распространены, в частности, в Европейских странах [90]. Металло- β -лактамазы (класс В) обладают способностью гидролизовать все β -лактамы, в том числе, карбапенемы, за

исключением монобактама – азтреонама, устойчивы к ингибиторам (клавуланату и сульбактаму), восприимчивы к хелатирующим агентам; кодируются, в основном, плазмидами. В настоящее время, присутствие MBL регистрируется у *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., представителей семейства *Enterobacteriaceae*, особенно у *K. pneumoniae* [42, 193]. AmpC β -лактамазы – индуцируемые цефалоспорины, закодированные в хромосомах многих видов бактерий; они опосредуют устойчивость к пенициллинам, цефалоспорином и нечувствительны к ингибиторам β -лактамаз, но подавляются клоксациллином и азтреонамом. В настоящее время бактерии, у которых отсутствуют хромосомные AmpC, в том числе *K. pneumoniae*, *S. maltophilia* являются носителями плазмид с приобретёнными генами AmpC. Эти плазмиды, часто несут множество других генов устойчивости: к аминогликозидам, хлорамфениколу, хинолонам, тетрациклинам, триметоприму, а также кодируют β -лактамазы, такие как TEM, CTX, SHV, VIM [88].

Аминогликозиды. Механизмы резистентности к аминогликозидам чаще связаны с ферментами, модифицирующими субстрат, которые прикрепляют фосфат, аденил или ацетил к молекулам антибиотиков, уменьшая их аффинность с 30S рибосомальной субъединицей. Соответственно этому делятся на три класса: аминогликозидфосфорилтрансферазы (APH), аминогликозидаденилтрансферазы (AAD) и аминогликозидацетилтрансферазы (AAC). Среди грамотрицательных бактерий встречаются почти все комбинации устойчивости к отдельным антибиотикам этой группы, что связано с наличием различных генов модифицирующих ферментов. Другой механизм сопротивления к аминогликозидам – метилирование 16S рРНК распространён среди грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и группы неферментирующих бактерий, в том числе, *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* sp. Гены метилаз расположены в транспозонах плазмид, обеспечивая горизонтальное распространение. 16S рРНК метилтрансферазы (16S-RMT), экзогенно приобретённые, ответственны за устойчивость к аминогликозидам очень

высокого уровня. Производство метилаз 16S-RMT часто сопровождается продукцией карбапенемаз и ESBL [187, 191].

Фторхинолоны. Модификация основной мишени для фторхинолонов ДНК-гиразы происходит путем точечных мутаций в *GyrA* / *GyrB* генах. В результате, аминокислотная последовательность А и В субъединиц изменяется, что приводит к синтезу модифицированных ферментов с низкой аффинностью к хинолонам. Возможны мутационные изменения топоизомеразы IV. Высокий уровень резистентности к фторхинолонам обусловлен взаимодействием эффлюкса и мутаций генов ДНК-гираз и топоизомеразы IV. Быстрее всего резистентность формируется у штаммов *P. aeruginosa* [89, 152].

Тигециклин является первым представителем нового класса противомикробных препаратов, известных как глицилциклины и является антибиотиком с широким спектром действия, активным в отношении многих клинически значимых видов бактериальных патогенов, в том числе *K. pneumoniae*, в отдельных случаях – *Acinetobacter* sp., *S. maltophilia*. Антибиотик связывается с рибосомальной субъединицей 30S, в результате чего ингибируется синтез белка. Формирование резистентности к тигециклину наблюдается чаще всего у *A. baumannii* и энтеробактерий, особенно при МЛУ штаммов. Системы эффлюкса RND-типа и другие могут быть факторами пониженной чувствительности к препарату. Например, эффлюксный комплекс AcrAB был определен в качестве основного механизма бактериальной резистентности к тигециклину у энтеробактерий, способствующего внутренней устойчивости ко многим структурно различным липофильным соединениям, в том числе, моющим средствам, красителям и антибиотикам без накопления в периплазме [170, 189].

Полимиксин В и полимиксин Е (колистин) – пептидные антибиотики, которые все чаще используются в качестве препаратов, сохранивших антибактериальную активность в отношении МЛУ *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Тем не менее, в последнее время было описано появление устойчивости к колистину. Полимиксины являются катионными агентами, которые связываются с анионной наружной мембраной,

нарушая её целостность, при этом проявляется и нейтрализующий эффект на биологические свойства эндотоксинов, к тому же бактерии могут стать восприимчивыми к гидрофобным антибактериальным препаратам. Существуют мутационные стабильные механизмы сопротивления и адаптивные, обратимые после удаления селективного давления. Главный из них – модификация липидного компонента внешней мембраны липополисахарида [99]. Селективное давление из-за обширного использования колистина может привести к возникновению резистентности *K. pneumoniae* к данному препарату, в том числе, обусловленной мутациями, изменяющими функции внешней мембраны [30, 165]. Для *P. aeruginosa* было описано генетически стабильное увеличение производства наружного мембранного белка H1, оказывающего свое защитное действие путем функциональной замены двухвалентных катионов на внешнем участке мембраны, которые препятствуют действию катионных антибиотиков [126]. У *A. baumannii* было описано явление гетерорезистентности – появление генетически идентичных более устойчивых к колистину субпопуляций бактерий, по сравнению с родительским клоном. Резистентность к колистину *A. baumannii* возникает через адаптацию ранее восприимчивых изолятов, часто во время лечения данным препаратом. Основным механизмом связан с модификациями липополисахарида, вызванными мутациями или инсерциями в генах, кодирующих биосинтез липида, при этом снижается суммарный отрицательный заряд наружной мембраны, уменьшая сродство к колистину, или устраняется сама мишень для этого препарата [20, 82, 139].

***P. aeruginosa*.** Представляя собой феномен резистентности среди бактерий, ему присущи практически все известные механизмы устойчивости к противомикробным препаратам, которые связаны либо с наличием конститутивных ферментов, обуславливающих природную устойчивость к антимикробным агентам, либо со способностью приобретать дополнительные детерминанты сопротивления. *P. aeruginosa* имеет естественную низкую проницаемость наружной мембраны, различные эффлюксные системы с широкой субстратной специфичностью и хромосомные AmpC β -лактамазы,

аминопенициллины, в том числе, в сочетании с ингибиторами β -лактамаз; цефалоспорины первого и второго поколения изначально не оказывают воздействия на *P. aeruginosa* [169].

Белки наружной мембраны (OprM, OprJ, OprN) входят в состав четырёх генетически различных систем типа RND. Хинолоны, макролиды, тетрациклины, линкомицин, левомицетин, новобиоцин, β -лактамы, кроме имипенема активно выводятся из клетки через такую систему (MexA-MexB-OprM), которая в клинических изолятах *P. aeruginosa* часто избыточно экспрессируется из-за мутаций в соответствующих генах. Три другие системы (MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN и MexX-MexY-OprM) дополняют устойчивость бактерии практически ко всем антисинегнойным антибиотикам, включая перечисленные, а также аминогликозидам и имипенему. Новая система эффлюкса различных лекарственных веществ MexV-MexW-OprM, найденная у *P. aeruginosa*, связана с устойчивостью к фторхинолонам, тетрациклинам, хлорамфениколу, эритромицину [107, 111, 112]. Белки OprD образуют специфические каналы, способствующие проникновению в бактериальную клетку основных аминокислот и карбапенемов, особенно, имипенема, но не других β -лактамных антибиотиков. Потеря этих белков определяет значимую устойчивость к карбапенемам только в случаях ассоциированного выражения с AmpC β -лактамазой. Аминогликозиды слабо поглощаются клеткой бактерии из-за уменьшенной проницаемости наружной мембраны [130, 146].

Продукция ферментов, разрывающих амидные связи в β -лактамном кольце, является основным механизмом приобретенной устойчивости *P. aeruginosa* к β -лактамным антибиотикам. Бактерия имеет хромосомно кодируемую AmpC β -лактамазу (класс C), вырабатываемую в малых количествах и обеспечивающую устойчивость к аминопенициллинам и цефалоспорином первого и второго поколения, не подавляется ингибиторами β -лактамаз. Её производство увеличивается в присутствии индукторов (имипенема) и в результате мутаций, последние могут привести к её гиперпродукции и высокому уровню резистентности, включая цефалоспорины третьего поколения [91]. Присутствие

ESBL молекулярного класса А приводят к развитию резистентности в отношении цефалоспоринов расширенного спектра (цефтазидима, цефепима, цефпирома) и азтреонама, в большинстве случаев подавляются клавулановой кислотой и тазобактамом. *P. aeruginosa* может нести различные ферменты: TEM, SHV, PER, VEB GES/IBC. Гены TEM и SHV-типа ESBL вероятно произошли из семейства *Enterobacteriaceae* путём горизонтального переноса плазмид. Некоторые ферменты GES имеют сильное сродство к цефалоспорином второго поколения (GES-1), другие проявляют карбапенемазную активность (GES-2) [200]. Успешное распространение ферментов MBL в клинических условиях связано с локализацией их генов на мобильных элементах, которые несут ряд генетических детерминант, обуславливающих устойчивость и к другим антибактериальным препаратам. Типы, выявленные у *P. aeruginosa*: IMP, VIM, SPM, GIM [157].

***Acinetobacter* sp.** Неферментативные механизмы устойчивости микроорганизма к антимикробным агентам включают: эффлюксные системы Ade (*Acinetobacter* drug efflux), нарушение проницаемости из-за потери или модификаций белков наружной мембраны, а также изменения сродства или экспрессии пенициллинсвязывающих белков. Одной из систем типа RND у *A. baumannii* является AdeABC, действие которой направлено на выведение аминогликозидов, β -лактамов, фторхинолонов, тетрациклинов, тигециклина, макролидов, хлорамфеникола. Избыточная экспрессия AdeABC способствует устойчивости к карбапенемам. Потеря белка наружной мембраны CarO, специфичного для семейства *Moraxellaceae*, связана с резистентностью к имипенему и меропенему; белка 43 кДа, аналогичного OprD *P. aeruginosa*, – в основном, имипенему [55].

Наиболее распространенным механизмом устойчивости к β -лактамам *A. baumannii* является ферментативная деградация β -лактамазами. ESBL обеспечивают резистентность к пенициллинам и цефалоспорином расширенного спектра – это TEM или SHV производные, но в основном, встречаются типы VEB и GES. *Acinetobacter* sp. присущи ферменты AmpC-цефалоспориназы, хромосомно закодированные и выделенные в отдельную группу ADC (*Acinetobacter* derived

cephalosporinases). Они способны гидролизовать пенициллины и цефалоспорины узкого и расширенного спектров. В отличие от AmpC, найденных у других грамотрицательных микроорганизмов, индуцируемой экспрессии AmpC у *Acinetobacter* sp. не происходит. Ключевым фактором, определяющим регуляцию этого фермента, является присутствие IS элемента, наличие которого коррелирует с повышенной экспрессией гена AmpC и устойчивостью к цефалоспоринам. Цефепим и карбапенемы, стабильны в ответ на эти ферменты. AmpC маскирует присутствие ESBL и фенотипическими тестами их различить невозможно, нередко наблюдается присутствие обеих детерминант резистентности [54, 151].

Ферментативными механизмами устойчивости к карбапенемам у *Acinetobacter* sp. являются приобретенные карбапенемазы – OXA и MBL. На сегодняшний день пять основных групп CHDL (carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases) или по-другому OXA-карбапенемазы были идентифицированы у *A. baumannii*. Первая – OXA-23 является наиболее широко распространённой во всем мире; OXA-23, OXA-40, OXA-58, имеют плазмидное происхождение, а OXA-51 хромосомно закодирована, что может служить генетическим маркером данного вида. Ферменты OXA способны гидролизовать пенициллины (бензилпенициллин, ампициллин, пиперациллин и тикарциллин) и карбапенемы (имипенем и меропенем). Представителем нового подкласса CHDL является OXA-143, которая гидролизует пенициллины, карбапенемы, незначительно цефалоспорины расширенного спектра и OXA-253, определяющая устойчивость ко всем β -лактамам, с более высоким уровнем резистентности к карбапенемам, чем OXA-143 и сниженной восприимчивостью к цефепиму [76, 81]. Чаще других три MBL идентифицируют у *A. baumannii*: IMP, VIM и SIM. MBL встречаются в составе интегронов, которые могут содержать массив генов устойчивости к антимикробным препаратам. Наличие общего промотора в этом случае приводит к избыточной экспрессии нескольких детерминант резистентности при чрезмерном использовании одного антимикробного агента. Интегроны встроены в плазмиды или транспозоны, которые способствуют их распространению.

Повышенная экспрессия эффлюксной системы RND AdeABC обеспечивает устойчивость к тигециклину, миноциклину, аминогликозидам и другим биологическим субстанциям, RND AdeIJK – тигециклину и миноциклину [153].

К. pneumoniae. Бактерия быстро приобретает устойчивость к наиболее часто используемым β -лактамным антибиотикам с помощью различных механизмов: ESBL, плазмидные AmpC, а в последнее время также карбапенемазы, включая MBL. Бактерия часто резистентна к фторхинолонам и аминогликозидам. SHV-тип ESBL доминируют у *K. pneumoniae*, CTX-M-тип более многочисленен, чем TEM-тип, вероятно из-за широкого использования цефотаксима и цефтриаксона во всем мире. PER-тип является одной из самых эффективных β -лактамаз, способных гидролизовать цефалоспорины широкого спектра действия. Изоляты *K. pneumoniae*, несущие ESBL, значительно чаще устойчивы к хинолонам, чем ESBL-негативные штаммы [119]. В последнее десятилетие, возникла новая проблема – появление AmpC ферментов, локализованных на плазмидах. Они являются производными от хромосомных генов AmpC грамотрицательных организмов, таких как *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* и представителей рода *Aeromonas*. Фермент обеспечивает устойчивость к пенициллинам, цефалоспорином, монобактамам, но не влияет на цефепим, цефпиром и карбапенемы [136].

Карбапенемрезистентность возникает за счет ферментов MBL, OXA, KPC, GES и неферментативных механизмов. Три типа MBL, встречающиеся у *K. pneumoniae*, были определены и у других видов энтеробактерий, в том числе *E. coli* (VIM, IMP и NDM), *E. cloacae* (в основном, VIM и IMP), *S. marcescens* (в основном, IMP) и *P. mirabilis* (в основном, VIM) [46, 183]. Плазида, несущая NDM, включает также комплекс генов резистентности ко многим антибиотикам и имеет широкий круг хозяев; быстрое распространение этой плазмиды среди клинических изолятов бактерий может привести к катастрофическим последствиям [210]. OXA β -лактамазы, продуцируемые *K. pneumoniae*, распространяются плазмидами внутри вида и среди других представителей энтеробактерий, повышают МПК карбапенемов, некоторые из

этих ферментов гидролизуют имипенем на высоком уровне [131, 143]. Ключевым фактором для появления большого количества КРС-продуцирующих *K. pneumoniae* стало их клональное распространение, что способствовало расширению не только географии карбапенемустойчивых *K. pneumoniae*, но и увеличению способов защиты бактерии [23, 100]. Гены GES локализованы на плазмидах и находятся в генных кассетах в составе интегронов, но не в окружении мобильных элементов, в противоположность генов КРС. Активность этих двух ферментов реализуется против широкого спектра β -лактамов, включая пенициллины, цефалоспорины, азтреонам и карбапенемы, но они могут быть клинически не признаны, так как далеко не всегда изоляты, которые содержат GES и КРС, характеризуются пониженной чувствительностью к карбапенемам *in vitro*, особенно, если определение антибиотикограммы проводится автоматизированными системами, где используются низкие концентрации инокулята [196, 209]. Производство ESBL или высокого уровня AmpC в сочетании со снижением проницаемости внешней мембраны из-за потери или изменения поринов также может привести к устойчивости к карбапенемам, так как аккумуляция этих антибиотиков в бактериальной клетке может снизиться. Лучшим образом это явление демонстрируется в отношении эртапенема: отсутствие или уменьшение экспрессии двух основных поринов (OmpK35 и OmpK36) у *K. pneumoniae* в сочетании с различными β -лактамазами приводит к её устойчивости к эртапенему, который в большей степени, чем другие карбапенемы подвержен данному механизму [63].

Устойчивость *K. pneumoniae* к тигециклину связана с избыточной экспрессией гена RamA, который является позитивным регулятором системы оттока AcrAB, придающей устойчивость ко многим антибиотикам, в том числе, тетрациклинам, фторхинолонам, хлорамфениколу. Сверхэкспрессия RamA и, соответственно, AcrAB происходит из-за мутации в гене – репрессоре RamA, указывая на молекулярный механизм резистентности. Последние исследования представителей семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Acinetobacter* показали, что активность данной эффлюксной системы часто ниже эффекта мутации, а на

примере *K. pneumoniae* был определён элемент IS, присутствие которого коррелировало с развитием высокой резистентности к тигециклину [80, 127].

***S. maltophilia*.** Бактерия отличается видоспецифической невосприимчивостью и приобретённой устойчивостью ко многим антимикробным агентам, включая β -лактамы (цефалоспорины, карбапенемы), аминогликозиды, хинолоны, макролиды, триметоприм-сульфаметоксазол (TMP-SMX), тетрациклины, хлорамфеникол, полимиксин и различные биоцидные вещества. Естественной средой обитания *S. maltophilia* является окружающая природная среда, и хромосомно закодированные гены устойчивости к антибиотикам, вероятно, были приобретены задолго до их использования [38].

S. maltophilia обладает эффлюксными системами SmeABC и SmeDEF, играющими важную роль в лекарственной устойчивости. SmeDEF – древний элемент, связанный с колонизацией корней растений, флавоноиды которых являются эффекторами, регулирующими его экспрессию. Изначально эта система обеспечивала внутреннюю устойчивость бактерии к антимикробным агентам окружающей среды, а при изменении условий существования, избыточное выражение SmeDEF стало основным фактором приобретённой резистентности к хинолонам, помимо мутаций генов бактериальных топоизомеразы и гиразы [72, 211]. Устойчивость *S. maltophilia* к β -лактамам опосредована двумя индуцируемыми плазмидными β -лактамазами L1 и L2. Гены этих ферментов не присущи *S. maltophilia*, вероятнее, они были приобретены горизонтальным переносом. Фермент L1 относится к MBL и гидролизует практически все классы β -лактамов, включая пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы, исключая монобактамы [33, 186]. Наличие у бактерии только L2–цефалоспориназы фенотипически может проявляться чувствительностью к сочетанию клавуланата с тикарциллином или азтреонамом, так как ферменты хорошо блокируются данным ингибитором и, в меньшей степени, тазобактамом [194]. У клинических изолятов *S. maltophilia* обнаружены конститутивно экспрессируемые ферменты, идентичные ферментам TEM β -лактамазам, находящиеся в составе транспозонов, которые легко переносятся на плазмиды и служат резервуаром генов β -лактамаз в

условиях стационара [32]. TMP-SMX оказывает бактериостатическое действие на *S. maltophilia* и считается препаратом выбора в терапии инфекций, вызванных этой бактерией. Нечувствительность к нему связана с генами резистентности *sul1* и *sul2*, первый из них был найден в составе 1-го класса интегрона, второй – ДНК плазмиды и как часть хромосомной ДНК [177]. У *S. maltophilia* был обнаружен локализованный на хромосоме ген ацетилтрансферазы AAC(6'), придающий устойчивость к амикацину, нетилмицину, сизомицину и тобрамицину (от 4 до 32-кратного увеличения МПК) клинических штаммов. Недавно открыт новый ген AAC(6')-Iak, идентичный AAC(6'), определяющий снижение чувствительности к арбекацину, дибекацину, неомицину, нетилмицину, сизомицину и тобрамицину, но не гентамицину. Хромосомно кодируемые аминогликозидфосфотрансферазы, модифицирующие канамицин, неомицин, также могут присутствовать в *S. maltophilia*, значительно увеличивая МПК перечисленных аминогликозидов [106, 132, 172]. Как и другие грамотрицательные палочки, *S. maltophilia* слабо восприимчив к эритромицину. Помимо снижения проницаемости мембраны и активного выкачивания антибиотика из клетки у бактерии найдены гены, принадлежащие по происхождению *S. aureus* и участвующие в сопротивлении к эритромицину; подобное явление может быть мощным механизмом получения генов устойчивости к антибиотикам для *S. maltophilia* [26].

I.5 Пути преодоления антибиотикорезистентности

Распространение резистентных бактерий и отсутствие новых соединений, особенно для лечения грамотрицательных инфекций, направили исследования на поиск новых антимикробных веществ и новых терапевтических подходов. Существующие агенты или стратегии, способные преодолеть устойчивость, основаны в большей степени на геномных подходах, обеспечивающих развитие новых классов препаратов, способных оказать влияние на механизмы устойчивости. Понимание иммунных отношений между микробом и их хозяином способствует осуществлению иных способов преодоления повышенной

устойчивости микроорганизмов к антибиотикам. Сродство отдельных субстратов или объектов к мишеням бактериальной клетки, их кинетические и динамические параметры также являются ключевыми элементами для рациональной разработки новых антибактериальных агентов в отношении грамотрицательных бактерий [124].

Комбинации антибактериальных препаратов. Ингибирующее действие двух антибиотиков в комбинации может быть большим или меньшим, чем ожидалось от их индивидуальных эффектов, соответственно, синергетическое или антагонистическое взаимодействие. Синергизм считается выгодным, так как для определённого количества лекарственных средств более эффективно подавляется рост микроорганизмов, с другой стороны, проявляется их способность быстрее сформировать резистентность к антибиотикам. В условиях сильной конкуренции за ресурсы, время, в течение которого мутанты могут возникнуть, уменьшается, их селективное преимущество усиливается, в результате чего увеличивается риск формирования возбудителя с МЛУ. Комбинации антагонистических препаратов, являются менее эффективными в отношении чувствительных патогенов, при этом селективное преимущество одного из них может уменьшиться, в результате антагонистические пары антибиотиков также могут предотвратить МЛУ. В то же время, эффективность синергизма ограничивается пределом, при котором большее взаимодействие не имеет никакого влияния на элиминацию возбудителя, но способствует выживанию резистентных форм [178]. Примечательно, что эффект комбинации антибиотиков может быть штаммоспецифичным. Описаны различные эффективные комбинации антибактериальных препаратов синергидного действия на колистинустойчивые штаммы *A. baumannii*: имипинем – колистин, колистин – рифампицин и колистин – доксициклин [118]. Тигециклин в сочетании с другими антимикробными препаратами зачастую не проявляет взаимодействий. Тем не менее, комбинация тигециклина с амикацином показала синергизм для изолятов *K. pneumoniae*, *S. maltophilia*, *A. baumannii*, а также с колистином против *K. pneumoniae*. Таким образом, тигециклин в сочетании с

другими антибактериальными средствами может использоваться в терапии против полирезистентных бактерий [67].

Ингибирование мутаций. Мутации, придающие устойчивость к антимикробным агентам являются неизбежным следствием ошибок ДНК-полимеразы. Показано, что бактерии производят белки, играющие активную роль в мутациях собственных геномов. Ингибирование этих белков или подавление их экспрессии может представлять собой принципиально новый подход в борьбе с развитием резистентности. Специально разработанные препараты блокируют протеазы микроба и не позволяют развиться устойчивости в естественных условиях, как это было продемонстрировано на примере *E. coli* в отношении ципрофлоксацина и рифампицина [50]. В сочетании с ошибками ДНК-полимераз у микроорганизмов может развиться невосприимчивость в условиях экологического стресса, генерируя замены пар нуклеотидных оснований. Повреждение ДНК возникает от регидратации, воздействия некоторых классов антибиотиков, химических окислителей, теплового шока, ультрафиолетового излучения, дезинфицирующих веществ, включения чужеродной ДНК в свой геном. Ряд ферментов участвуют в гомологичной рекомбинации и в репарации поврежденной ДНК и, следовательно, в защите от стрессов, вызванных ДНК-повреждающими агентами. Подобный белок (RecA), принимающий участие в репарации описан у *A. baumannii*. Включение ингибиторов продукции этих ферментов, например, в новые дезинфицирующие средства может препятствовать ответу бактериальных клеток на повреждения ДНК, подавляя индуцированный мутагенез и гомологичные рекомбинации в больничных условиях. Ингибирование мутаций, возможно, войдёт в качестве компоненты комбинированной терапии в сочетании с антибиотиками, усиливая восприимчивость к ним микроорганизмов [31, 128].

Химиосенсибилизаторы. Вспомогательные вещества или химиосенсибилизаторы ослабляют различные механизмы устойчивости или усовершенствуют конструкцию молекулы антибиотика, чтобы уменьшить его восприимчивость к инактивации бактериями. Была разработана новая группа

антибактериальных молекул EPI (efflux pump inhibitor), которые подавляют активное выведение антибиотиков и восстанавливают их нормальную внутриклеточную концентрацию. Такие молекулы-ингибиторы могут блокировать экспрессию генов, отвечающих за выкачивание антибиотика из бактерии, оказывать влияние на энергетические процессы активного транспорта, уменьшать поток молекул внутри канала путём конкурентного выведения или его блокирования. Они действуют совместно с обычными антибиотиками, чтобы восстановить их активность [24]. Различные сравнительные исследования были проведены с использованием хорошо изученного EPI-вещества фенилаланин-аргинин β -нафтиламида (phenylalanine arginine β -naphthylamide – PA β N). Так, под его влиянием снижалась способность эффлюксной системы AdeFGH *A. baumannii* к выведению триметоприма, хлорамфеникола и клиндамицина из клетки бактерии, восстанавливалась восприимчивость к левофлоксацину у клинических штаммов *P. aeruginosa*. Способность PA β N тормозить отток одного или более антибиотиков связана с тем, что это соединение является субстратом насосов и может действовать в качестве конкурентного ингибитора антибактериальных препаратов [53, 109]. Несколько производных хинолина считаются EPI-веществами широкого спектра для *K. pneumoniae*. Препараты в большей степени, по сравнению с PA β N, увеличивали внутриклеточную концентрацию норфлоксацина, хлорамфеникола, тетрациклина [48].

Иммунизация. Иммунизация опосредованно может стать важным способом преодоления устойчивости к антимикробным агентам при сокращении числа активных противомикробных препаратов. Потенциальным ограничением для использования того или иного антигена в пассивной или активной иммунизации является наличие большого количества клинически значимых серотипов. В отношении чрезвычайно устойчивых штаммов хорошим средством обеспечения немедленного иммунитета против биологических агентов, является терапия на основе антител, чего может быть достаточно, чтобы снять острую инфекцию. Так капсульный полисахарид K1 *A. baumannii* иммуногенен и является одним из факторов вирулентности. Антитела, направленные против K1, могут

быть использованы в серотипспецифической терапии через пассивную иммунизацию [155].

Бактериофаги. Бактериальные вирусы были предложены для использования в качестве альтернативных терапевтических средств, которые обладают многочисленными преимуществами по сравнению с химиотерапией: экономичны и эффективны против полирезистентных бактерий, потому что механизмы, с помощью которых бактериофаги индуцируют бактериолиз, полностью отличаются от таковых антибиотиков, безопасны, поскольку имеется высокая специфичность и отсутствует влияние на эукариотические клетки. Недавно обнаружен бактериофаг *K. pneumoniae* NK-5 (φNK5), выделенный из сточных вод больницы, который использовался для подавления бактерии в экспериментальной модели инфекции (абсцесс печени) мышей, вызванной гипервирулентным штаммом *K. pneumoniae* [85]. Описаны случаи успешного исхода экспериментальной бактериемии у мышей, вызванной карбапенемрезистентным *P. aeruginosa*, при использовании специфических вирулентных штаммов фагов [198]. На поверхности *Acinetobacter* sp. представлено значительное количество бактериальных антигенов, которые определяют высокую специфичность фагов. Термически стабильный фаг AB1 *A. baumannii* также может использоваться в качестве нетоксичного антибактериального средства [208]. Возможно использование фагов для обработки биопленок. Преимущества последних перед антибиотиками очевидны: бактериофаги, поражающие клетки на поверхности, будут реплицироваться, создавая высокую концентрацию антибактериального агента локально, постепенно разрушая биопленки; фаги индуцируют экспрессию ферментов, растворяющих матрицу биопленки; бактериофаги способны инфицировать клетки персистеры и остаются в них, пока они не станут метаболически активными, после чего бактериофаг уничтожает новые клетки. Способность бактериофагов ослаблять и даже уничтожать матрицу биопленки может способствовать проникновению антибиотиков, что увеличивает возможность их синергетической комбинации [77].

Горизонтальная передача бактерицидных генов. Эта антибактериальная терапевтическая технология с использованием донорских клеток аттенуированной *E. coli*, несущей бактерицидные гены в конъюгативной плазмиде, была успешно применена для лечения ожоговых ран мышей, инфицированных *A. baumannii*. Экспрессия генов в плазмиде *E. coli* подавляется, но становится дерепрессированной при их передаче реципиентным микроорганизмам путем конъюгации, в результате чего в бактериальных клетках *A. baumannii* нарушается белковый синтез, что приводит к их гибели [162].

Антимикробные пептиды (Antimicrobial peptides – AMP). AMP – это разнообразная группа молекул, которые производятся многими тканями и типами клеток различных беспозвоночных, растений и животных. Они очень неоднородны по длине, последовательности и структуре, но большинство из них являются небольшими, катионными и амфифильными. Эти пептиды обладают антимикробной активностью и являются важным компонентом врожденной иммунной защиты (Host defense peptides – HDPS), в том числе, играют важную роль в гомеостазе кожи, особенно в процессе заживления ран. Механизм действия AMP заключается в уничтожении бактерии путём формирования пор в клеточных мембранах, некоторые из пептидов ингибируют функции внутриклеточных биополимеров. Связываясь с анионными участками липополисахарида, поликатионы ослабляют межмолекулярные взаимодействия липополисахарида, разрушая мостики из двухвалентных катионов, делая его проницаемым для лекарственных средств. Потенциал AMP был оценен в отношении многих микроорганизмов. Активность buforin II, cecropin P1, magainin II отдельно и в сочетании с антибиотиками подтверждена на клинических штаммах *S. maltophilia*. Кроме того, наблюдался синергизм между пептидами и полимиксином E, меропенемом, цефтазидимом, пиперациллином и кларитромицином [37, 74]. AMP OH-CATH30 от королевской кобры показал синергетическое действие с ципрофлоксацином и левофлоксацином в отношении *P. aeruginosa* [106, 145]. Были разработаны генетически модифицированные ткани человека, производящие повышенные уровни кателицидина LL-37, и успешно применены

на животных моделях с ранами, инфицированными антибиотикоустойчивым *A. baumannii*. Кенгуру Wallaby вырабатывают кателицидин WAM1, эффективный против *Acinetobacter* sp., в 3–80 раз более мощный, чем LL-37 и не вызывающий гемолиз эритроцитов человека, в результате чего может рассматриваться как потенциал для парентерального применения [176]. По механизму действия к катионным пептидам близки хелаторы (этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), нитрилотриуксусная кислота, гексаметафосфат натрия), которые дезинтегрируют внешнюю мембрану путем удаления Mg^{2+} и Ca^{2+} , нарушая её целостность [185].

Антиплазмидный подход. Уникальная стратегия исключения плазмид, несущих гены резистентности, из бактериальной клетки была предложена в ответ на лекарственную невосприимчивость бактерий, которая заключается в ингибировании конъюгации. Были описаны антиконъюгативные препараты для широкого диапазона хозяев, в частности, дегидрокрепениновая кислота. Считается, что другие полиненасыщенные жирные кислоты, такие как линолевая и линоленовая также являются ингибиторами конъюгации [59]. Другой подход связан с ограничением воспроизводства плазмид или изменением содержания синтезируемых ими веществ. В естественных условиях в дочерних бактериальных клетках, которые не унаследовали плазмиду, кодирующую систему бактериальный токсин-антитоксин, антитоксин разрушается клеточными протеазами и не реплицируется, освобождая скрытый токсин, который способен убить бактерии, и, таким образом, уменьшить популяцию клеток, не содержащих плазмиды. Подавление репликации плазмиды и искусственная активация токсина в этой системе имеет потенциал новой антибактериальной стратегии, что и было продемонстрировано в отношении клинических штаммов *P. aeruginosa* [35, 202].

Влияние на механизмы патогенности. Подавление патогенетических механизмов микроорганизмов с МЛУ – это новая терапевтическая стратегия. Устойчивость бактерий к антибиотикам повышается в ассоциациях бактерий. Вмешательство в процессы сигнализации внутри биоплёнок рассматривается как рациональный подход в терапии бактериальных инфекций.

Показана возможность подавления протеаз *S. maltophilia*, способствующих вторжению в ткани и их разрушению. Такие вещества-ингибиторы не влияют на подобные ферменты хозяина, так как существует немного структурных взаимосвязей между прокариотическими и эукариотическими протеазами, несмотря на схожие механизмы действия, что и определяет разработку ингибиторов с требуемой специфичностью [203].

Химический элемент галлий (Ga) может заменить во многих биологических системах железо (Fe) и ингибировать Fe-зависимые процессы, в частности, нарушить синтез ферментов: рибонуклеотидредуктазы, которая катализирует первый шаг в синтезе ДНК, супероксиддисмутазы и каталазы, которые защищают от окислительного стресса, цитохромов, участвующих в окислительном фосфорилировании. Высокие уровни Ga преодолевают защитный эффект пиовердина *P. aeruginosa*, проявляя антимикробную активность, и подавляют рост и образование биопленки бактерией. Ga является потенциально перспективным, новым терапевтическим препаратом [94].

Наночастицы. Нанотехнологии предоставляют хорошую платформу для применения неорганических веществ в виде наночастиц, имеющих перспективное направление в качестве антимикробных агентов. Наноразмерные материалы имеют большую площадь поверхности по отношению к объему, что приводит к повышенной реактивности. Показана бактерицидная активность наночастиц серебра против МЛУ штаммов грамотрицательных бактерий (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter* sp.) и способность препятствовать образованию биоплёнок [147]. Оксид азота (NO) является липофильным, встречающимся в природе свободным радикалом, и проявляет антимикробную активность. С помощью нанотехнологий NO стабилизировали гидрогелями силана или кремния, превратив его в наночастицы с сухой матрицей. После воздействия влаги NO медленно высвобождается из них при относительно фиксированной концентрации. Активность таких наночастиц NO, в качестве новых антибактериальных агентов против МЛУ была продемонстрирована в отношении *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* [159].

I. 6. Антимикробное действие эфирных масел различного происхождения

Антимикробные свойства эфирных масел (ЭМ) тимьяна, душицы, мяты, корицы, шалфея, гвоздики и др. были известны на протяжении многих столетий. В настоящее время многие из них находят своё применение в фармацевтической, санитарной, косметической, сельскохозяйственной и пищевой промышленности и всё чаще рассматриваются как альтернативные антимикробные вещества, которые могли бы конкурировать с антибактериальными препаратами или дополнять их [34, 93]. Эффективность ЭМ была показана в отношении «пищевых» патогенов: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* и микроорганизмов кишечного тракта (*Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Faecalibacterium prausnitzii*) [96, 174]. Возбудители инфекций респираторного тракта: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis* также характеризовались восприимчивостью к эфирным маслам, особенно, ЭМ Melissa *officinalis*, тимьяна *Thymus vulgaris*, корицы *Cinnamomum verum* и лимонной травы *Cymbopogon citratus*. *S. aureus* in vitro и in vivo хорошо подавлялся маслом чайного дерева (*Melaleuca alternifolia*) [69, 148]. Описаны клинические изоляты *S. maltophilia*, устойчивые к фосфомицину, имипенему, пиперациллину и азтреонаму, при этом проявляющие чувствительность к ЭМ корицы, тмина, гвоздики в нетоксических концентрациях от 0,05 мкл/мл до 0,5 мкл/мл, что может найти возможное применение для ингаляционной терапии в лечении инфекций дыхательных путей, вызванных этим микроорганизмом. Несмотря на то, что МПК ЭМ тимьяна 3,125 мкл/мл выше нетоксической, было высказано мнение, что есть потенциал его использования при заболеваниях органов дыхания у человека [39, 75].

Антимикробная активность ЭМ связана с их химической структурой и концентрацией компонентов, характеризующихся биологической активностью. Эфирные масла – продукты вторичного метаболизма, содержащие множество компонентов, таких как терпены и терпеноиды, фенольные производные,

алифатические спирты, альдегиды, кетоны, кислоты и флавоноиды. Анализ эфирных масел, показывает, что терпеноиды являются наиболее распространенными и присутствуют либо в виде гемитерпенов, монотерпенов или сесквитерпенов и их производных. Многие из них активны против широкого спектра микроорганизмов, включая грамположительные, грамотрицательные бактерии, вирусы и грибы. Терпеновые компоненты – одни из самых важных антимикробных веществ в составе эфирных масел; они накапливаются в липидной части мембраны, влияя на её структурные и функциональные свойства. В результате возникает повреждение мембраны, как следствие, увеличивается её проницаемость для протонов и ионов, приводящая к нарушению протонной движущей силы и изменению внутриклеточного pH гомеостаза; в ряде случаев изменяется и структура белков, встроенных в мембрану. При этом антимикробная активность терпенов зависит от их гидрофобных свойств: чем выше соответствующий коэффициент, тем эффективнее антимикробная деятельность, обусловленная высоким сродством к клеточным мембранам. Например, было показано, что ментол с коэффициентом гидрофобности 3,38 проявлял более выраженное действие на фитопатогенные микроорганизмы по сравнению с ментолом, коэффициент гидрофобности которого 2,87 [49].

Компоненты с фенольной структурой оказывают либо бактерицидные, либо бактериостатические эффекты, в зависимости от используемой концентрации. Большое значение в их эффективности имеет гидроксильная группа и её относительное положение. Важность гидроксильной группы была подтверждена различной активностью между карвакролом, его метиловым эфиром, большей у первого. Кроме того, положение гидроксильной группы оказывает влияние на эффективность компонентов, что проявляется различной активностью карвакрола и тимола против грамотрицательных и грамположительных бактерий. Алкилированные фенолы усиливают антимикробное воздействие компонента и, главным образом, против грамотрицательных микроорганизмов [62, 98].

Проникновение ЭМ в периплазматическое пространство в значительной степени зависит от физико-химических характеристик и состава самих

бактериальных мембран. Наружная мембрана грамотрицательных бактерий состоит в основном из молекул липополисахарида, который обуславливает сильный отрицательный заряд, и образует гидрофильный барьер проницаемости, обеспечивающий защиту от воздействия гидрофобных веществ. Это и было продемонстрировано исследованиями, в которых антимикробная активность линалилацетата, ментола, тимола против грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*E. coli*) бактерий показала, что каждый из компонентов ингибирует рост обоих микроорганизмов. При этом *S. aureus* более чувствителен ко всем трем соединениям, чем *E. coli*, а тимол и, в меньшей степени, ментол активнее против *S. aureus*, чем линалилацетат, *E. coli* оказалась более восприимчива к ментолу. В отличие от многих антибиотиков, гидрофобные компоненты эфирных масел способны получить доступ к периплазме грамотрицательных бактерий через пориновые белки их наружной мембраны [163, 181]. Толерантность, связанная с наружной мембраной может быть искусственно устранена, если бактериальные клетки предварительно обработать нонапептидами или ЭДТА, тогда они становятся более восприимчивыми к воздействию компонентов ЭМ, что экспериментально показано в отношении *P. aeruginosa* [110].

Антимикробная активность ЭМ из-за сложных взаимодействий между их отдельными компонентами приводит к общей активности, которая в отдельных случаях может превосходить воздействие одного агента. Данные, доступные на сегодняшний день подтверждают, что минорные компоненты: терпинен-4-ол, α -терпинеол, α - и β -пинен могут повлиять на общую эффективность ЭМ, не представляя собой значительную его часть [47]. При исследовании антимикробного действия эфирного масла кориандра было доказано, что его активность выше активности основного компонента – линалоола. Примечательно, что линалоол, в составе масла кориандра находится в основном в виде его *S* (+) энантиомера, который вызывает повышенную проницаемость только в отрицательно заряженных мембранах грамотрицательных бактерий. В результате,

все другие клеточные функции, такие как мембранный потенциал, дыхательная активность нарушаются [164].

Специфические видовые и субвидовые особенности микроорганизмов также могут повлиять на их чувствительность к эфирным маслам. Была описана высокая степень восприимчивости к ним *H. influenzae*, хотя внешняя мембрана всех грамотрицательных бактерий содержит гидрофильные полисахаридные цепи в качестве барьера для гидрофобных масел. Считают, что одной из причин этого может быть гидрофобная природа наружной мембраны изолятов *H. influenzae*, формирующих шероховатые колонии [87].

Некоторые исследования антибактериальных эффектов ЭМ в отношении микроорганизмов подтверждают взаимодействия различного характера между ЭМ и антибиотиками. Так комбинации ЭМ кориандра с хлорамфениколом, ципрофлоксацином, гентамицином, тетрациклином были описаны как синергетические, с пиперациллином и цефоперазоном как аддитивные в отношении *A. baumannii* [64]. Исследование активности эфирного масла *Helichrysum italicum* в отношении МЛУ штамма *E. aerogenes* EA289, который сверхэкспрессирует эффлюксные насосы, привело к заключению, что гераниол – очень мощный ингибитор этого вида сопротивления и показал значительное восстановление чувствительности *E. aerogenes* EP289 к хлорамфениколу (в 16 раз), существенно повысив активность β -лактамов и фторхинолонов. При сравнении гераниола с РА β N (EPI-вещество) было выявлено, что эти две молекулы имеют различные мишени действия [108].

Резюмируя литературный обзор можно сказать, что УПГБ, в частности, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, получили широкое распространение в госпитальной среде в связи с легко формируемой у них устойчивостью к антибиотикам, связанной с особенностями строения и физиологии бактериальной клетки. При этом госпитальная среда с высокой антибактериальной нагрузкой служит резервуаром селекции полиантибиотикорезистентных штаммов бактерий в процессе экологического отбора. В настоящее время проводятся исследования новых способов и

антибактериальных веществ, в том числе, биологического происхождения, альтернативных антибиотикам, которые могли бы активно воздействовать на УПГБ с множественной лекарственной устойчивостью. Антимикробное действие эфирных масел и/или их составляющих также рассматривается в контексте данного направления применения.

Глава II. Материалы и методы исследования

II.1. Объекты исследования

Объектами бактериологического мониторинга являлись изоляты (1401) грамположительных (512) и грамотрицательных (889) бактерий, выделенные от пациентов городского лечебно-профилактического учреждения, за период 03.2012 – 03.2015 гг. Исследование распространённости и антибиотикорезистентности условно-патогенных микроорганизмов осуществлялось на базе реанимационных и хирургических отделений. Биологический материал, полученный из различных биотопов человека, представлял собой раневую поверхность ($n=1943$), секрет слизистых нижних дыхательных путей (НДП) ($n=1893$), кровь ($n=754$), мочу ($n=146$). Формирование базы данных для анализа структуры бактериальных биоценозов и характера чувствительности отдельных представителей к антибиотикам проводилось с помощью программы «Микроб-2» – автоматизированной системы регистрации, учета и проведения всестороннего анализа данных, получаемых ежедневно в бактериологической лаборатории [17]. В отношении 4 ведущих в стационаре видов условно-патогенных грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* в различных сочетаниях тестировали 34 антибактериальных препарата: аминопенициллин – ампициллин, карбоксипенициллин – тикарциллин; уреидопенициллин – пиперациллин; ингибиторзащищённые β -лактамы – ампициллин/сульбактам, амоксициллин/клавуланат, тикарциллин/клавуланат, пиперациллин/тазобактам, цефотаксим/клавуланат, цефтазидим/клавуланат, цефоперазон/сульбактам, цефепим/клавуланат, монобактам – азтреонам; цефалоспорин II поколения цефокситин; цефалоспорины III поколения – цефтазидим, цефуроксим, цефотаксим, цефтриаксон; IV поколения – цефепим; V поколения – цефтаролин, карбапенемы – меропенем, имипенем, эртапенем, дорипенем; фторхинолоны – левофлоксацин, ципрофлоксацин; аминогликозиды

– гентамицин, амикацин, нетилмицин, тобрамицин; глицилциклин – тигециклин, триметоприм/сульфаметоксазолом, колистин, хлорамфеникол, фосфомицин.

P. aeruginosa, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* характеризовались устойчивостью ко многим антибиотикам, в связи с чем послужили объектами исследования антибактериальной активности 12 образцов эфирных масел, различающихся по компонентному составу (приложение А): мяты *Mentha piperita* L. сортов Заграва, Украинская перечная, Прилукская карвонная, Оксамитовая, Бергамотная; розы крымской *Rosa gallica* L., розы болгарской *Rosa damascene* Mill.; пихты *Abies sibirica* Ledeb., 2 образцов эвкалипта: 1 – *Eucalyptus viminalis* Labill., 2 – *Eucalyptus globulus* Labill., лаванды *Lavandula angustifolia* Mill., розового дерева *Aniba rosaeodora*; и отдельно – 5 химически чистых компонентов изучаемых масел: β -фенилэтилового спирта, линалоола, нерола, ментола, цитраля [14]. Кроме того, изучалась сочетанная активность этих масел с современными антибактериальными препаратами: тикарциллин/клавуланатом 85 мкг, цефоперазон/сульбактамом 105 мкг, азтреонамом 30 мкг, цефтазидимом 10 мкг, цефепимом 30 мкг, меропенемом 10 мкг, имипенемом 10 мкг, эртапенемом 10 мкг, левофлоксацином 5 мкг, ципрофлоксацином 5 мкг, амикацином 30 мкг, нетилмицином 10 мкг, тигециклином 15 мкг, триметоприм/сульфаметоксазолом 25 мкг [3, 7].

II.2. Условия культивирования

Первичный посев клинических образцов и выделение чистых бактериальных культур осуществляли на двух питательных средах: «кровяном» и «шоколадном» агарах. Для приготовления 5 % «кровяного» агара использовали основу – колумбийский агар, содержащий гидролизат казеина, мясную вытяжку и стерильную дефибрированную баранью кровь для питательных сред (ЗАО "ЭКОлаб", г. Электрогорск). «Шоколадный агар» представлял собой полностью готовую среду в комплекте с витаминно-ростовой добавкой для гемофильных бактерий («НИЦФ», Санкт-Петербург). Культивирование большинства бактерий

проводили при температуре 37,0 °С, в течение 18-24 часов. Выделение и накопление *S. pneumoniae* проходило в атмосфере 10,0 % CO₂. Для выявления способности *P. aeruginosa* продуцировать сине-зеленый пигмент применялась среда Кинг А (Prondosa, Испания).

Чувствительность бактерий к антибиотикам и эфирным маслам диффузионным методом определяли на агаре Мюллер-Хинтона, который готовили в соответствии с инструкциями производителя (Oxoid, Великобритания). Толщина агара в чашках Петри находилась в пределах 4,0±0,5 мм. Посев бактериальной суспензии мутностью 0,5 по Мак-Фарланду ($1,5 \times 10^8$ бактериальных клеток/мл) осуществлялся «газоном» и обеспечивал однородный рост культуры. Режим культивирования инокулированных чашек соответствовал 35±1 °С, 18±2 часам.

II.3. Методы анализа

Отбор проб биологического материала и его доставка в лабораторию проводились в соответствии с правилами, изложенными в методических указаниях МУ 4.2.2039-05, культуральное исследование клинического материала и предварительная идентификация бактерий – в соответствии с требованиями нормативных и рекомендательных документов [4, 9, 10, 11, 13]. По результатам первичного посева, данных микроскопии и некоторых ускоренных дополнительных тестов (цитохром С, каталаза, латекс-агглютинация) культуры дифференцировались, на основании чего, осуществлялся выбор коммерческих тест-систем, с помощью которых определялась принадлежность бактерий к определённому роду или виду и чувствительность к антибиотикам. Для биохимической идентификации использовались тест-системы (карты) производства BioMerieux к анализатору VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция), позволяющих оценить утилизацию углеводов, ферментативную активность и устойчивость к определённым реагентам. Определение грамотрицательных бактерий проводилось на карте GN (Gram-Negative identification card),

предназначенной для идентификации большинства клинически важных ферментирующих и неферментирующих грамотрицательных палочек и состоящей из 47 биохимических тестов, грамположительных бактерий – на карте GP (Gram-Positive), предназначенной для идентификации стафилококков, стрептококков, энтерококков, включающей 43 биохимических теста. В процессе идентификации автоматизировано осуществлялся сравнительный анализ биохимического профиля исследуемого организма с профилями всех микроорганизмов и групп, имеющихся в базе данных прибора. При этом рассчитывалась относительная вероятность, выраженная в процентах, отражающая насколько полученные результаты соответствуют типовым штаммам микроорганизмов, что позволяет сделать вывод о его принадлежности к тому или иному виду. Время получения результата составляло 8-10 часов [190].

В рамках проведения межрегионального долгосрочного мониторинга антибиотикорезистентности возбудителей инфекций в стационарах различных регионов России «МАРАФОН» (Мониторинг Распространенности и Антибиотикорезистентности возбудителей инфекций в многопрофильных стационарах различных регионов России) последовательно, по мере выделения от пациентов, было отобрано 67 изолятов бактерий из различных колонизированных ими биотопов. Подтверждение их видовой принадлежности проводилось на базе микробиологической лаборатории НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ методом матрично-активированной лазерной десорбции-ионизации времяпролётной (MALDI-TOF) масс-спектрометрии. В основе данного метода лежит получение масс-спектра рибосомальных белков исследуемого микроорганизма, являющихся высоко консервативными и видоспецифичными, и сравнение его с масс-спектрами, содержащимися в базе данных [123]. В отношении этих изолятов также определялись МПК (мкг/мл) антибиотиков методом серийных разведений в жидкой среде и гены резистентности VIM, IMP, NDM, OXA-48, OXA-23, OXA-40, OXA-58, KPC с применением ПЦР в реальном времени [5].

Скрининг антибиотикочувствительности выделенных изолятов проводили на картах к автоматизированной системе VITEK 2 Compact – Antimicrobial Susceptibility Test (AST). В ячейках карт содержались антибиотики, каждый из которых представлен несколькими концентрациями, что позволяет автоматически определить их МПК. Изучение чувствительности бактерий к антибиотикам также осуществлялось методом диффузии в агар антибактериальных препаратов, содержащихся в определённом количестве (мкг) в коммерческих дисках диаметром 6 мм и в градиентной концентрации (мкг/мл) на специальных полосках, так называемых Е-тестах, комбинирующих метод серийных разведений и принципы диффузии в плотную среду (Oxoid, BioMerieux). Интерпретацию полученных зон задержки роста бактерий и минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков проводили в соответствии с рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) и Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) для каждого вида бактерий [51, 68]. В отдельных случаях использовалась программа «Система микробиологического мониторинга «Микроб-2», составленная в соответствии с МУК 4.2.1890-04, которая включает значения МПК или диаметров зон некоторых антибактериальных препаратов в отношении отдельных бактерий, отсутствующие в стандартах CLSI и EUCAST [8]. Все микроорганизмы, в зависимости от полученных результатов, были разделены на три группы – чувствительные (S), умеренно-устойчивые, устойчивые (R). Для контроля точности и правильности определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам параллельно с изолятами бактерий тестировались референс-штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922.

Выявление фенотипов бактерий, несущих детерминанты резистентности β -лактамазы расширенного спектра (ESBL) и металло- β -лактамазы (MBL), проводилось методом синергизма двойных дисков с ингибиторами ферментов – клавулановой кислотой и этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), соответственно [51].

Для проведения скрининга антибактериальной активности эфирных масел их растворяли в этиловом спирте, затем пропитывали ими диски диаметром 6 мм и проводили ультрафиолетовую стерилизацию, затем накладывали на чашки, засеянные газоном тест - культур. Содержание действующих веществ в диске составляло 10-100 мкг/диск в зависимости от происхождения образца ЭМ. Массовая доля компонентов в изучаемых маслах определялась методом газожидкостной хроматографии [1]. Определение МПК и антимикробной активности эфирных масел и их компонентов в отношении изолятов бактерий проводили методом анализа кинетики роста микроорганизмов с помощью программы «Микроб-автомат» (Россия), которая реализована на базе планшетного фотометра «Multiscan Ascent» (Финляндия). Методика заключалась в приготовлении ряда двукратных разведений ЭМ или отдельных компонентов из базового раствора (1:32), представляющего собой смесь 0,1 мл эфирного масла в 1,5 мл глицерина и в 1,6 мл дистиллированной воды. В лунки стандартного 96-луночного планшета вносили различные концентрации испытуемых субстанций в объёме 100 мкл, затем в каждое разведение добавляли 100 мкл суспензии бактерий, приготовленной в жидкой питательной среде Мюллер-Хинтона и содержащей 10^6 КОЕ/мл бактерий. Измерение проводилось в трёх повторностях. Температура инкубации составила 36,5 °С. Динамическое измерение оптической плотности в ячейках планшета происходило через равные промежутки времени – 5 минут при длине волны фотометрирования 620 нм, количество измерений составляло 220, длительность встряхивания перед измерением – 3 минуты. Результатом обработки кривых роста бактерий являлось соотношение площади под кривой приращений оптических плотностей в опытных лунках к соответствующей площади в контрольных лунках, выданное в процентах. Изменения роста бактерий фиксировались в виде графиков [15].

Обработка данных и статистический анализ результатов исследования были проведены с использованием программ Excel (Microsoft, США) и пакета Statistica 6 (США). Об изменчивости количественных признаков судили по среднему квадратичному отклонению значений вариант от средней арифметической ($\bar{x} \pm \sigma$)

и коэффициенту вариации (V). Анализ непараметрических переменных проводился путём сравнения наблюдаемых и ожидаемых частот в двух группах с помощью критерия хи-квадрат, в отдельных случаях точного двустороннего критерия Фишера. Корреляции определялись с помощью коэффициента Спирмена (R) для признаков, характеризующихся распределением, отличным от нормального, и интервальными переменными. Результат анализа представлялся в виде критерия «р», различие считалось достоверным при $p < 0,05$ (критического уровня значимости) [18, 19].

Глава III. Результаты исследования

III. I. Бактериологический мониторинг клинических материалов

III. I.1. Идентификация изолятов бактерий

Выделенные за изученный период 03.2012 – 03.2015 гг. из клинического материала бактерии идентифицировали до вида по совокупности типичных биохимических реакций. При этом наблюдалось как сходство, так и различие в наборах химических субстратов между входящими в коммерческие тест-системы и рекомендованными Определителем бактерий Берджи, 1997 г. (ОББ). Все изоляты перед биохимической идентификацией дифференцировали окраской по Граму и по морфологии бактериальных клеток. Характер роста на «кровяном» агаре и микроскопические препараты некоторых УПГБ представлены на рисунках 1– 4.

Изоляты *P. aeruginosa* (193), *K. pneumoniae* (180), *A. baumannii* (177), *E.coli* (113), *S. maltophilia* (83), *E.coli* (113), *E. cloacae* (42) были идентифицированы на картах GN. Для каждого вида изолятов определены тесты, совпадающие с ОББ, а также выявлены нетипичные биохимические признаки (приложение Б).

Видовая принадлежность изолятов *P. aeruginosa* определена на картах без использования дополнительных субстратов. Тесты, совпадающие с ОББ, составили 14,9 % (7). Полученные в них результаты, за исключением утилизации трегалозы и маннита, полностью соответствовали тестам, установленным в определителе, согласно которому отклонения от проявления положительного или отрицательного типичного признака не должны превышать 10,0 %. При этом маннит использовался изолятами *P. aeruginosa* почти в 3 раза реже ($p < 0,000$). Нетипичные биохимические реакции присутствовали в 12,8 % (6) тестов, но лишь отрицательная реакция на использование маннозы в качестве источника углерода достоверно превысила в 3,4 раза ($p < 0,000$) соответствующее значение, заложенное в программе (91,0 % изолятов “+”).

Изоляты *K. pneumoniae* также были идентифицированы без дополнительных тестов и характеризовались однородным биохимическим профилем. Тесты, совпадающие с ОББ, присутствовали в количестве 38,3 % (18).

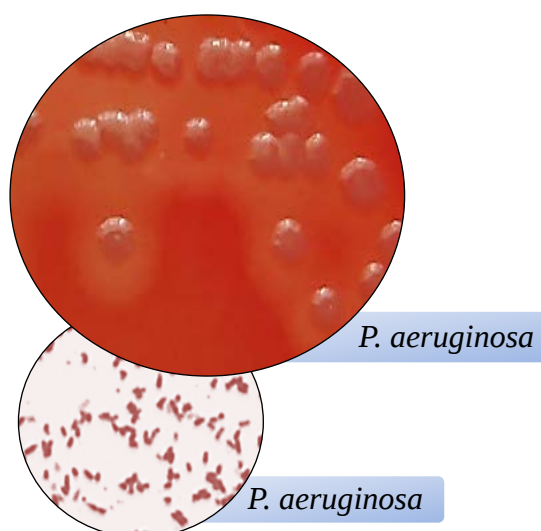


Рисунок 1. Микроскопический препарат (окраска по Граму) и рост на агаре с кровью *P. aeruginosa*.

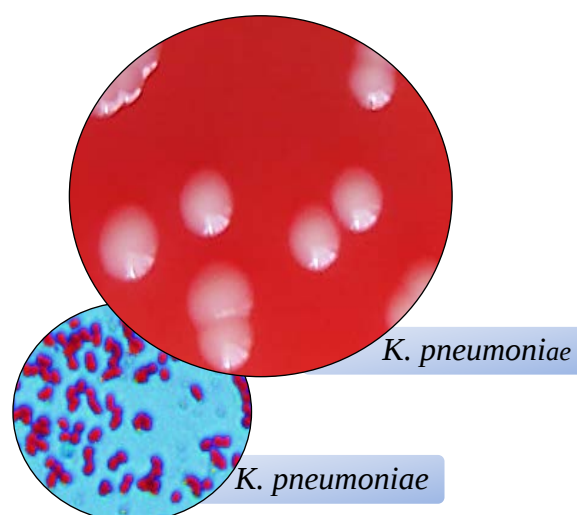


Рисунок 2. Микроскопический препарат (окраска по Граму) и рост на агаре с кровью *K. pneumoniae*.

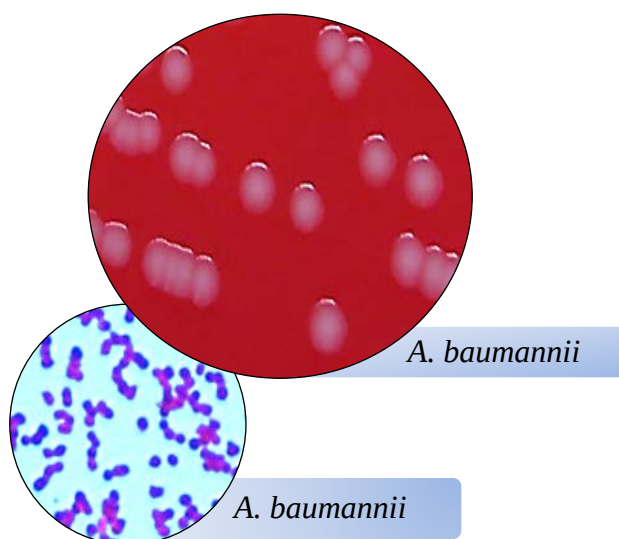


Рисунок 3. Микроскопический препарат (окраска по Граму) и рост на агаре с кровью *A. baumannii*.

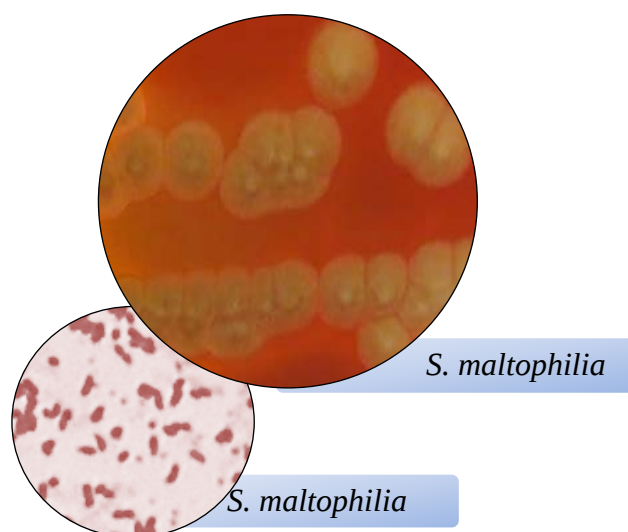


Рисунок 4. Микроскопический препарат (окраска по Граму) и рост на агаре с кровью *S. maltophilia*.

В 23,4 % (11) реакций выявлены нетипичные результаты, при этом количество изолятов по каждой из них не превышало 10,0 %, за исключением гидролиза мочевины. В нашем исследовании отсутствие фермента уреазы или его сниженная активность обнаружена в 38,3 % (69) случаев у *K. pneumoniae*, что приблизительно в 4 раза выше прогнозированного распределения признака по ОББ ($p < 0,000$). Самым изменчивым тестом можно считать использование D-тагатозы в качестве источника углерода, при этом бактерии практически в равной степени потребляли сахар или отказывались от него.

Изоляты *A. baumannii* были идентифицированы как *A. baumannii complex*, включающего 4 вида (*A. baumannii*, *A. genomospecies* 3, *A. calcoaceticus*, *A. genomospecies* TU 13). Чтобы определить вид выделенных бактерий, дополнительно проводили исследование на термотолерантность, использование аргинина и оценивали рост при 44° С, 41° С. В результате 100,0 % изолятов были идентифицированы как *A. baumannii* (44° С – рост, 41° С – рост, использование аргинина “-”). Тесты, совпадающие с ОББ, составили 19,2 % (9). В 8,5 % (4) реакций выявлены нетипичные результаты, при этом достоверное увеличение в 41 раз ($p < 0,000$) показал тест – элман “+” по сравнению со значением базы данных программы (1 % “+”). Наиболее изменчивыми оказались признаки, определяющие способность к ассимиляции L - гистидина, L - малата и L - лактата, где различия составили более 30,0 %, и ферментативную активность глютаминариламидазы и уреазы с разницей в 40,0 %.

Результаты идентификации *E. coli* показали совпадение тестов с ОББ в 36,2 % (17) случаях. Наибольшие отклонения от типичных результатов были отмечены для трёх ферментов. Количество изолятов с отрицательной реакцией на фосфатазу в 2 раза ($p < 0,000$) превысило соответствующее значение, указанное в базе данных программы (81,0 % изолятов “+”). Уреаза в 2,3 раза чаще регистрировалась как положительная реакция ($p < 0,023$), а лизиндекарбоксилаза в 2,5 раза чаще – как отрицательная реакция ($p < 0,008$) по сравнению с данными ОББ.

Результаты биохимической идентификации *S. maltophilia* (83) совпадали с ОББ по 1 тесту – лизиндекарбоксилазе, который составил 2,0 % (1) от всех изученных субстратов. Для определения этого вида бактерии в тест-системе предусмотрено незначительное 17,0 % (8) количество реакций с переменными значениями, в результате чего, идентификация *S. maltophilia* до вида не являлась затруднительной. Нетипичные реакции изолятов наблюдались в 10,6 % (5) тестах; из них расщепление мочевины в 14,5 раза ($p < 0,000$) и негативная ферментативная активность Ala-Phe-Pro-амидазы в 12,4 раза ($p < 0,000$) превысили ожидаемые результаты.

Изоляты *E. cloacae* (42) были идентифицированы как *Enterobacter cloacae* complex, включающий 4 вида (*E. cloacae*, *E. cobei*, *E. hormaechei*, *E. ludwigii*), один из них делится на два подвида (*E. cloacae* ssp. *cloacae*, *E. cloacae* ssp. *dissolvens*). Чтобы определить вид выделенных бактерий, их биохимический профиль расширили дополнительными тестами, которые определяли с помощью тест-системы ЭНТЕРО 24 (*Erba Lachema*). Она включала 24 субстрата, несколько отличающихся от субстратов карты GN. Все изоляты показали однородный характер реакций: индол “-”, аргинин “+”, мелибиоза “+”, раффиноза “+”, а также проявляли подвижность (интерпретация результатов осуществлялась с помощью программы «Микроб-2»). В итоге, все изоляты идентифицировали как *E. cloacae*. Тесты, совпадающие с ОББ, присутствовали на карте GN в количестве 38,3 % (18). В 14,9 % (7) реакций выявлены нетипичные результаты, при этом достоверное увеличение в 3 раза ($p < 0,012$) показал только один тест – отсутствие фермента β -ксилозидазы (значение “+” в базе данных 95,0 %). Самые изменчивые признаки связаны с активностью фермента L-пролинариламидазы и образованием кислоты из D-адонитола: 50,0 % – “+” и 50,0 % – “-” результаты.

Изоляты *S. epidermidis* (165), *S. aureus* (92), *E. faecalis* (70), *S. pneumoniae* (61) *S. haemolyticus* (51) *E. faecium* (20) были идентифицированы на картах GP. Для каждого вида изолятов определены тесты, совпадающие с ОББ, а также выявлены нетипичные биохимические признаки (приложение В).

Видовая принадлежность изолятов *S. epidermidis* (165), *S. aureus* (92), *S. haemolyticus* (51) определена без постановки дополнительных тестов. Субстраты, совпадающие с ОББ, присутствовали в количестве 17 (39,5 %). У *S. haemolyticus* в 13,9 % (6), *S. aureus* – 9,3 % (4), *S. epidermidis* – 18,6 % (8) реакций выявлены нетипичные результаты тестов. Наиболее значимые отклонения от стандартных показателей биохимической активности *S. haemolyticus* проявил в следующих тестах: устойчивость к новобиоцину в 13,7 раза ($p < 0,000$), отсутствие образования кислоты из трегалозы – 8,8 раза, наличие фермента β - галактозидазы – 4,3 раза превысили ожидаемые значения. Самый изменчивый признак – использование D-маннита с образованием кислоты – 25,5 % “+”. Нетипичные реакции изолятов *S. aureus* достоверно выше ожидаемых результатов были в тестах ферментативного расщепления мочевины в 17,4 раза ($p < 0,000$) и резистентности к новобиоцину в 25 раз ($p < 0,000$). Варибельных признаков отмечалось в 2 раза больше, чем нетипичных. *S. epidermidis* обладал α -глюкозидазой в 4 раза ($p < 0,000$), а устойчивостью к новобиоцину и вибриостатическому агенту в 17 раз ($p < 0,000$) чаще по сравнению со значениями базы данных.

Для биохимической идентификации *S. pneumoniae* (61) в 34,9 % (15) случаях субстраты, рекомендованные в ОББ, были включены в карту. Согласно ОББ, *S. pneumoniae* должен образовывать кислоту из раффинозы и трегалозы. В то же время, в исследовании большинство *S. pneumoniae* не использовали эти сахара в качестве источников углерода, при этом отрицательные реакции не интерпретировались программой как нехарактерные для этого вида микроорганизма. Количество нетипичных дифференцирующих тестов составило 20,9 % (9). При этом лишь 3 из них статистически значимо превысили установленные в программе значения: β -галактопиранозидаза “-” – в 2 раза ($p < 0,035$), N-ацетил-D-глюкозамин “-” – в 1,9 раза ($p < 0,018$), α -галактозидаза “-” – в 3,3 раза ($p < 0,000$).

Изоляты *E. faecalis* (70), *E. faecium* (20) были идентифицированы без постановки дополнительных тестов. Нехарактерные проявления биохимической

активности выявлено в 14,0 % (6) реакций у *E. faecalis* и в 9,3 % (4) у *E. faecium*. Статистически значимые изменения для *E. faecalis* показаны в более частом обнаружении ферментов: β -глюкуронидазы в 10 раз ($p < 0,006$), мочевины в 30 раз ($p < 0,000$); в отсутствии активности аланинариламидазы в 2,9 раза ($p < 0,000$), и в тесте подщелачивания L-лактата в 10 раз ($p < 0,006$). Нетипичные реакции для *E. faecium* не имели достоверных различий с экспериментальными данными, заложенными в базе данных программы.

В результате исследования были выявлены признаки, которые в 100,0 % случаев характеризовались типичным проявлением для представителей семейства *Enterobacteriaceae*: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*; группы НГОВ: *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*; различных видов стафилококков: *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, и определены видоспецифические отличительные тесты между ними. К ним относились те, которые входят в Определитель бактерий Берджи: “-” D-целлобиоза, “-” цитрат натрия – у *E. coli*, “-” L-пирролидоннариламидаза – *S. haemolyticus* и те, которые присутствуют только на картах идентификации: “+” L-пирролидоннариламидаза у *K. pneumoniae*, “+” β -N-ацетилгалактозаминидаза – *E. cloacae*, 5-кетод-D-глюконат – *A. baumannii*, “-” D-глюкоза – *S. maltophilia*, “+” метил- β -D-глюкопиранозид – *S. aureus* (табл. 1 – 3).

Таблица 1. Общие и отличительные стабильные биохимические признаки изолятов *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*

Тесты	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E.coli</i>	<i>E. cloacae</i>
	тип реакции	тип реакции	тип реакции
Ala-Phe-Pro-ариламидаза	-	-	-
L-пирролидоннариламидаза	+*	-	-
D-целлобиоза	+	-*	+
D-глюкоза	+	+	+
D-маннит	+	+	+
D-манноза	+	+	+
β -аланинариламидаза	-	-	-
Липаза	-	-	-
D-трегалоза	+	+	+
Цитрат натрия	+	-*	+
α -глюкозидаза	-	-	-
β -N-ацетилгалактозаминидаза	-	-	+*

Примечание: цветом выделены тесты, совпадающие с тестами Определителя бактерий Берджи; “+” – положительная реакция “-” – отрицательная реакция, * - отличительные признаки

Таблица 2. Общие и отличительные стабильные биохимические признаки изолятов *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*

Тесты	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>S. maltophilia</i>
	тип реакции	тип реакции	тип реакции
D-адонитол	-	-	+
D-глюкоза	+	+	-*
Сбраживание глюкозы	-	-	-
β -аланинариламидаза	+	-	-
Палатиноза	-	-	-
D-сорбит	-	-	-
Сахароза	-	-	-
5-кето-D-глюконат	-	+	-
β -N-ацетилгалактозаминидаза	-	-	-
Орнитиндекарбоксилаза	-	-	-
β -глюкуронидаза	-	-	-

Примечание: цветом выделены тесты, совпадающие с тестами Определителя бактерий Берджи; “+” – положительная реакция “-” – отрицательная реакция, * – отличительные признаки

Таблица 3. Общие и отличительные стабильные биохимические признаки изолятов *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*

Тесты	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
	тип реакции	тип реакции	тип реакции
D-амигдалин	-	-	-
Фосфатидилинозитфосфолипаза	-	-	-
D-ксилоза	-	-	-
Аргининдигидролаза	+	+	+
13 Ala-Phe-Pro ариламидаза	-	-	-
Циклодекстрин	-	-	-
L-аспартатариламидаза	-	-	-
β -галактопиранозидаза	-	-	-
α -маннозидаза	-	-	-
L-пролинариламидаза	-	-	-
β -глюкуронидаза	-	-	-
α -галактозидаза	-	-	-
L-пирролидонилариламидаза	+	+	-*
β -глюкуронидаза	-	-	-
Тирозинариламидаза	-	-	-
D-сорбит	-	-	-
Метил- β -D-глюкопиранозид	-	+	-
Пулулан	-	-	-
D-рафиноза	-	-	-
Салицин	-	-	-
Сахароза	+	+	+

Примечание: цветом выделены тесты, совпадающие с тестами Определителя бактерий Берджи; “+” – положительная реакция “-” – отрицательная реакция, * – отличительные признаки

Количество стабильных признаков преобладало у стафилококков 48,8 % (21), для представителей энтеробактерий и НГОБ значения были меньше – 25,5 % (12) и 23,4 % (11), соответственно. При этом 41,7 % (5) общих стабильных признаков изученных энтеробактерий, 28,6 % (6) – стафилококков совпадали с тестами, предложенными в ОББ. Для НГОБ 81,8 % (9) подобных признаков не имели совпадений с ОББ.

Недостатки биохимической идентификации, в частности, нетипичные и вариабельные реакции бактерий, вызывают сложности в интерпретации результатов, что обуславливает необходимость применения более точных молекулярно-генетических методов анализа. В связи с этим, в рамках проводимого нами локального трёхлетнего наблюдения за изменениями бактериального профиля стационара, проведена повторная идентификация некоторых изолятов (67), вошедших в более масштабный мониторинг «МАРАФОН». Методом MALDI-TOF масс-спектрометрией определены белковые профили и виды данных бактерий, которые включили: 21 *K. pneumoniae*, 19 *A. baumannii*, 18 *P. aeruginosa*, 4 *S. maltophilia*, 2 *S. marcescens*, 1 *M. morgani*, 1 *H. alvei*, 1 *E. coli*. При этом видовая принадлежность изолятов полностью соответствовала их биохимической идентификации.

В процессе локального мониторинга важность изучения биохимического профиля изолятов необходима не только с точки зрения идентификации; уже на этом этапе была оценена неоднородность видовых популяций внутрибольничных возбудителей. Анализ биохимических характеристик изученных видов бактерий показал, что часто они проявляли нетипичные свойства, в среднем в $13,9 \pm 4,62$ % случаев, при этом минимальные значения этого показателя определены у *A. baumannii* (8,5 %), а максимальные у *K. pneumoniae* (23,4 %). Надо отметить, что каждый изолят отдельно включал не более 5 % (2 или 3) нехарактерных тестов. По нашему мнению, эти значения косвенно могут отражать степень однородности изученной совокупности каждого вида бактерий – чем меньше отклонений, тем более вероятно, что изоляты имеют меньшее количество источников своего происхождения, возможно, единственный – госпитальный.

III. I. 2. Бактериальный профиль хирургических отделений

Проведён сравнительный анализ бактериального пейзажа пациентов хирургических отделений детского (ДХО) и взрослого (ВХО). Основной массив исследуемого материала в виде проб биологических жидкостей и патологического отделяемого слизистых оболочек и полостей пришёлся на ВХО, при этом высеваемость микроорганизмов в отделениях была практически одинакова и в ДХО составила 25,9 %, а в ВХО 23,9 %. В таблице 4 представлены основные характеристики изученных биоматериалов по отделениям.

Таблица 4. Количественные и качественные показатели проб биоматериалов

Отделение	Количество проб биоматериала		Количество (+) проб биоматериала		Количество ГПБ		Количество ГОМ		Общее количество бактерий	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ДХО	378	15,6	98	17,0	49	14,2	62	21,6	111	17,6
ВХО	2050	84,4	490	83,0	295	85,8	225	78,4	520	82,4
Итого	2429	100,0	590	100,0	344	100,0	287	100,0	631	100,0

Примечание: (+) – положительные пробы, т.е. содержащие бактерии; абс. – абсолютное число бактерий; ГПБ – грамположительные бактерии; ГОМ – грамотрицательные бактерии.

Взятый клинический материал соответствовал биотопам – нижним дыхательным путям (НДП), раневой поверхности (РП) и биологическим жидкостям – моче и крови. В ДХО 62,5 % биоматериала ($p < 0,000$) приходилось на НДП и РП, а в ВХО преобладал материал из ран, в 4 раза превысив общее число остальных образцов ($p < 0,000$). Основное количество (78,5 %) положительных результатов анализов, то есть выделение микроорганизмов, было связано с материалами НДП и мочой у детей ($p < 0,000$), ранами у взрослых ($p < 0,000$) (табл. 5).

Бактериологический мониторинг за аналогичные периоды времени 03.2012 – 03.2013 (I), 03.2013 – 03.2014 (II), 03.2014 – 03.2015 (III) выявил снижение количества как грамположительных (ГПБ) ($p < 0,005$), так и грамотрицательных бактерий (ГОб), выделенных в ДХО. В последнем случае уменьшение было недостоверно ($p < 0,079$).

Таблица 5. Результаты выделения бактерий из материала различных биотопов

Биоматериал	Количество образцов биоматериала, собранного в отделениях							
	ДХО				ВХО			
	Общее кол-во		(+)		Общее кол-во		(+)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Нижние дыхательные пути	125	33,1	47	47,9	139	6,8	44	9,0
Кровь	98	25,1	8	8,2	228	11,1	35	7,1
Раневая поверхность	111	29,4	13	13,3	1636	79,8	388	79,2
Моча	47	12,4	30	30,6	47	2,3	25	5,1
Всего	381	100,0	98	100,0	2050	100,0	492	100,0

Примечание: (+) – положительные образцы, т.е. с выделением бактерий.

Сравнительный анализ частоты встречаемости микроорганизмов в ВХО определил тенденцию роста ГПБ с I по III периоды на 78,8% ($p < 0,000$) и неравномерное распределение ГОБ с преобладанием во II периоде на 82,1% и 42,9% по сравнению с I и III периодами, соответственно ($p < 0,000$) (табл. 6).

Таблица 6. Распределение грамотрицательных и грамположительных бактерий по периодам изучения

Периоды изучения	Количество выделенных бактерий в ДХО				Количество выделенных бактерий в ВХО			
	ГОБ		ГПБ		ГОБ		ГПБ	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
I (03.2012-03.2013)	29	46,8	27	55,1	25	11,1	35	11,9
II (03.2013-03.2014)	17	27,4	12	24,5	140	62,2	95	32,2
III (03.2014-03.2015)	16	25,8	10	20,4	60	26,7	165	55,9
Всего	62	100,0	49	100,0	225	100,0	295	100,0

В динамике по периодам изучения наблюдается увеличение удельного веса ГОБ бактерий по сравнению с ГПБ в детском отделении. Соотношения между ГОБ и ГПБ во взрослом отделении колеблются по периодам, и преобладание ГОБ над ГПБ во II периоде на 19,2 % ($p < 0,003$) сменяется значительным на 46,6 % превышением уровня ГПБ над ГОБ в III периоде ($p < 0,000$). В I период достоверных различий в распределении ГОБ и ГПБ не наблюдалось (рис. 5, рис. 6).

Неравномерная частота встречаемости ГПБ в детском отделении в различные месяцы была статистически незначима ($p < 0,111$). В отношении грамотрицательных бактерий определены три максимума соответствующего

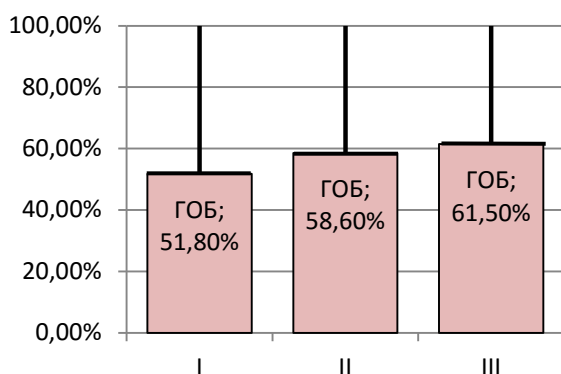


Рисунок 5. Динамика соотношения грамотрицательных и грамположительных бактерий по периодам изучения в ДХО:

■ – Грамотрицательные бактерии;
 □ – Грамположительные бактерии;
 I – (03.2012-03.2013);
 II – (03.2013-03.2014);
 III – (03.2014-03.2015)

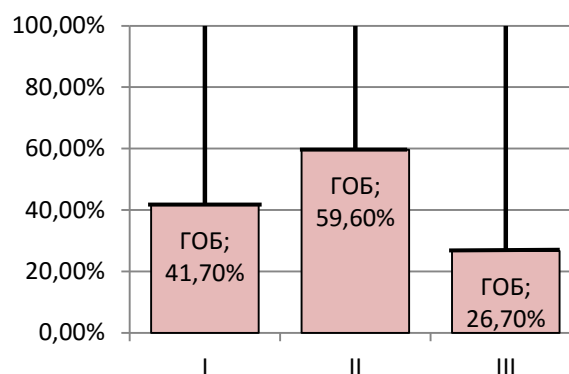


Рисунок 6. Динамика соотношения грамотрицательных и грамположительных бактерий по периодам изучения в ДХО:

■ – Грамотрицательные бактерии;
 □ – Грамположительные бактерии;
 I – (03.2012-03.2013);
 II – (03.2013-03.2014);
 III – (03.2014-03.2015)

показателя в январе, марте, августе ($p < 0,007$), которые сопровождалось пониженным количеством ГПБ, при этом выявлялась периодическая смена ведущих патогенов с ГОВ на ГПБ (рис. 7).

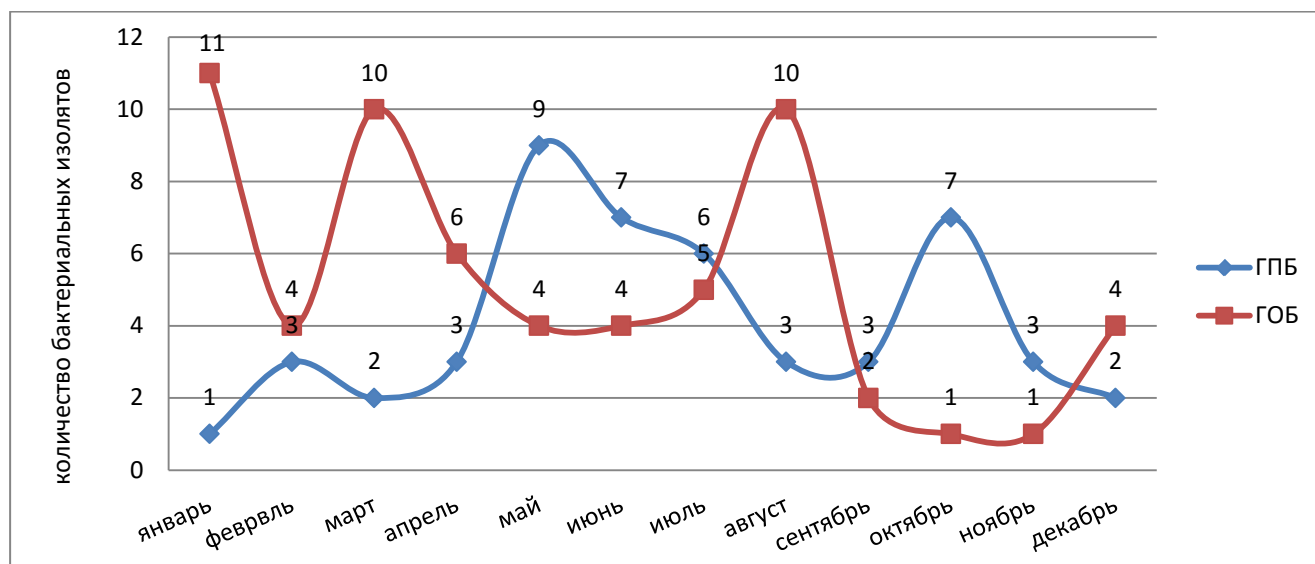


Рисунок 7. Динамика выделения грамотрицательных (ГОВ) и грамположительных бактерий (ГПБ) по месяцам в ДХО.

Выделенные бактерии в ВХО за весь период наблюдения характеризовались неравномерным распределением по месяцам. Максимальная частота встречаемости ГПБ в ВХО отмечалась в марте ($p < 0,000$), ГОВ – августе

($p < 0,000$), что выше, чем в остальные месяцы, и эти различия статистически значимы. Максимум ГПБ сопровождался пониженным количеством ГОБ (рис. 8).

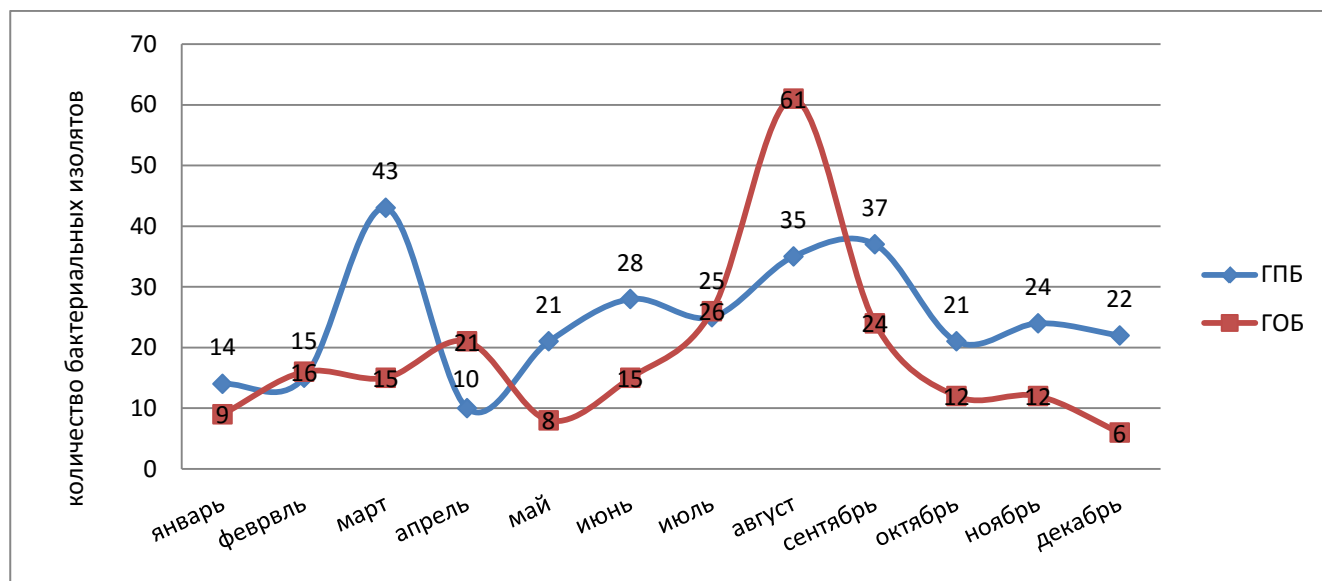


Рисунок 8. Динамика выделения грамотрицательных (ГОБ) и грамположительных бактерий (ГПБ) по месяцам в ВХО.

В структуре ведущей микробиоты ДХО ГОБ были представлены бактериями семейства *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *E. coli*) и неферментирующими грамотрицательными бактериями (*P. aeruginosa* и *S. maltophilia*), которые в совокупности составили 46,0 % (51) от всех выделенных бактерий. Основной грамположительный профиль определили пять микроорганизмов, относящиеся к родам *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. На их долю пришлось 37,0 % (41). Остальные бактерии по частоте встречаемости не превышали 3,6 % и практически не влияли на микробный пейзаж ДХО (рис. 9). Видовое разнообразие основных ГОБ в ВХО включало представителей *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*) и НГОБ (*P. aeruginosa* и *A. baumannii*), которые в совокупности составили 36,0 % (187) от всех выделенных бактерий. Преимущественное распространение среди грамположительных бактерий в ВХО получил *S. epidermidis* – 43,4 %, определивший лидирующие позиции ГПБ в отделении. Остальные виды ГПБ вместе взятые 32,1 % (167) не превысили общего числа ГОБ 43,3 % (225), и наиболее часто встречающиеся из них относились к родам *Staphylococcus* и *Enterococcus* (рис.10).

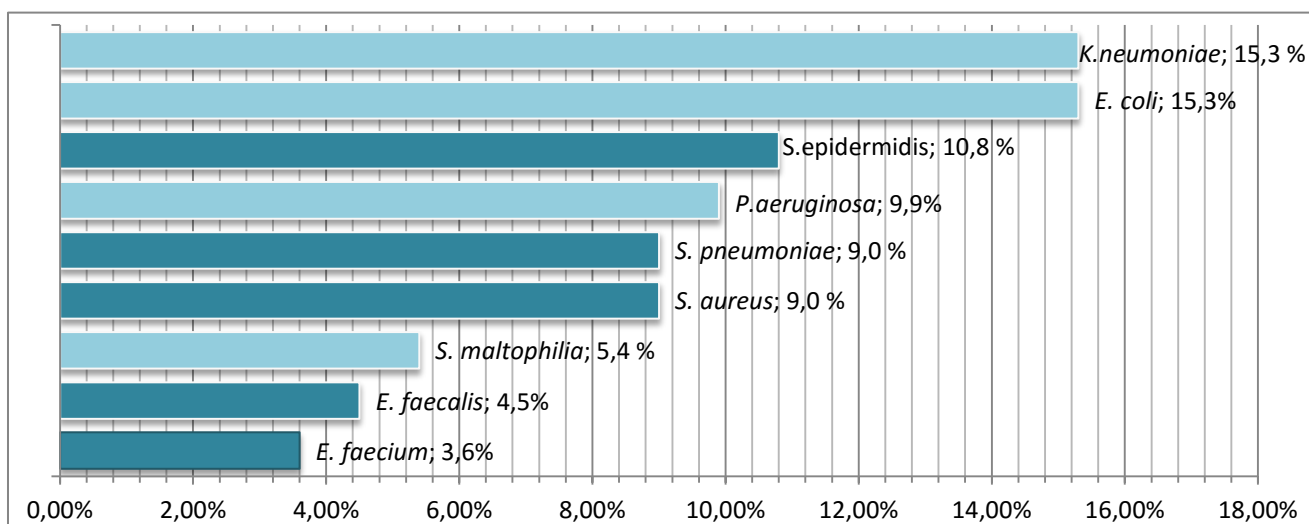


Рисунок 9. Структура видов бактерий, выделенных в ДХО.

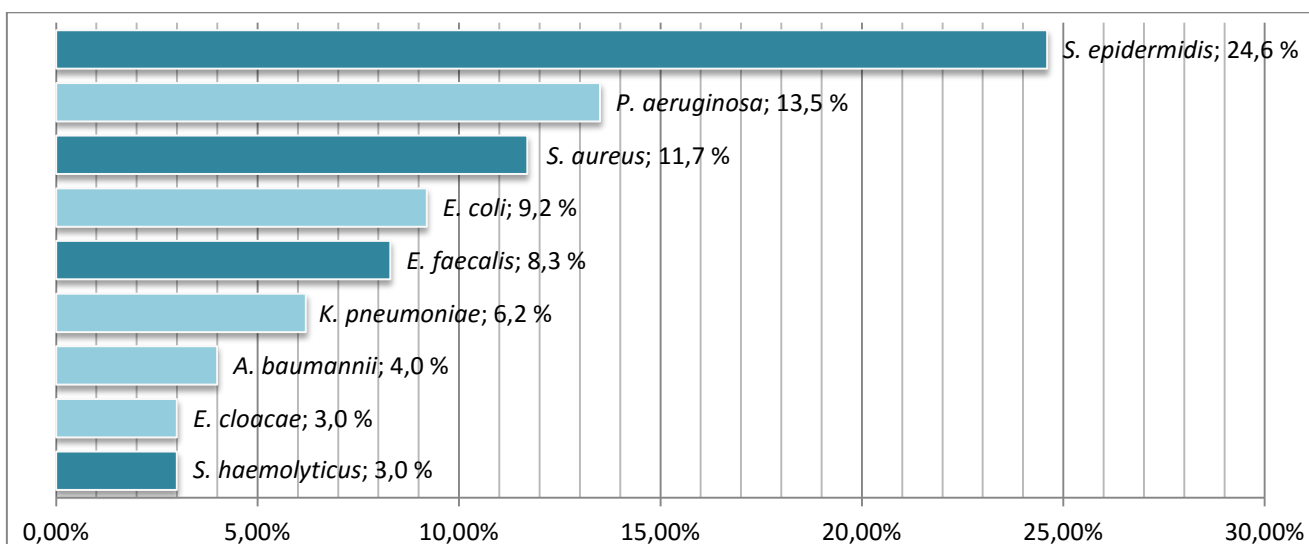


Рисунок 10. Структура видов бактерий, выделенных в ВХО.

Распределение бактерий одного вида по источникам выделения неравномерно и большее их количество соответствовало тем биотопам, материал из которых исследовался чаще других. В ВХО частота выявления всех бактерий из раневой поверхности пациентов (за исключением *S. pneumoniae*) независимо от видовой принадлежности превышала минимум в 1,5 раза частоту встречаемости этих же бактерий в остальном клиническом материале вместе взятом ($p < 0,000$) (рис.11). В ДХО большинство видов бактерий были распределены в пробах между НДП и мочой, за исключением *S. epidermidis* и *S. aureus* (рис.12).

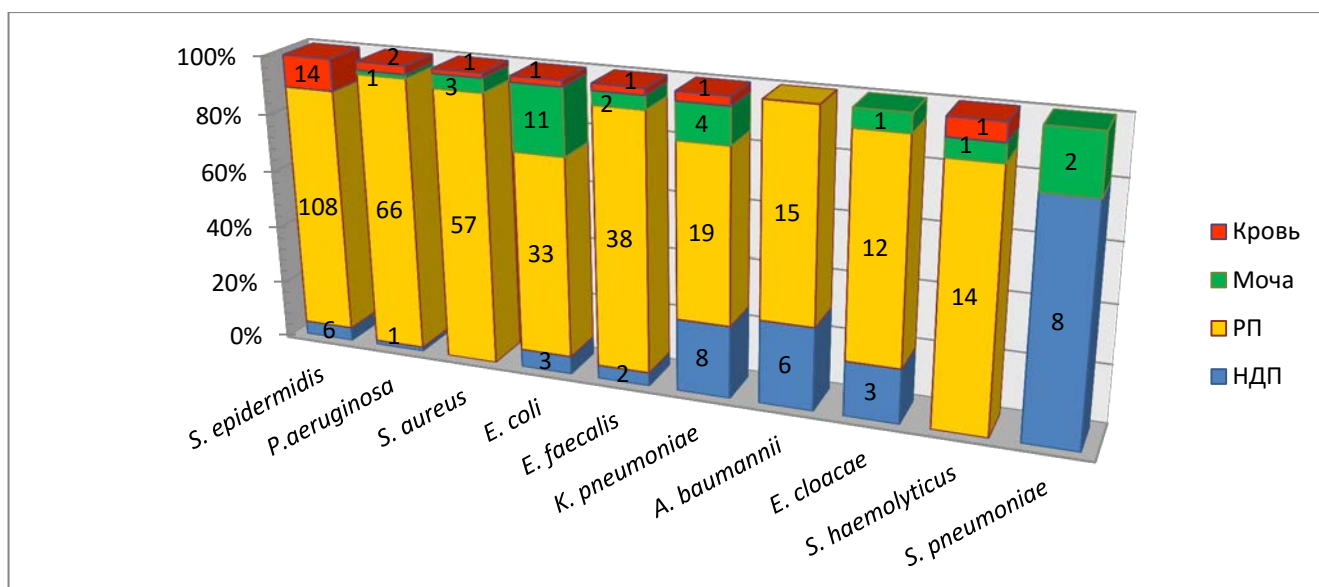


Рисунок 11. Распределение видов ведущих патогенов по источникам выделения в ВХО: % – по оси ординат; внутри столбиков указаны абсолютные числа изолятов каждого вида бактерий.

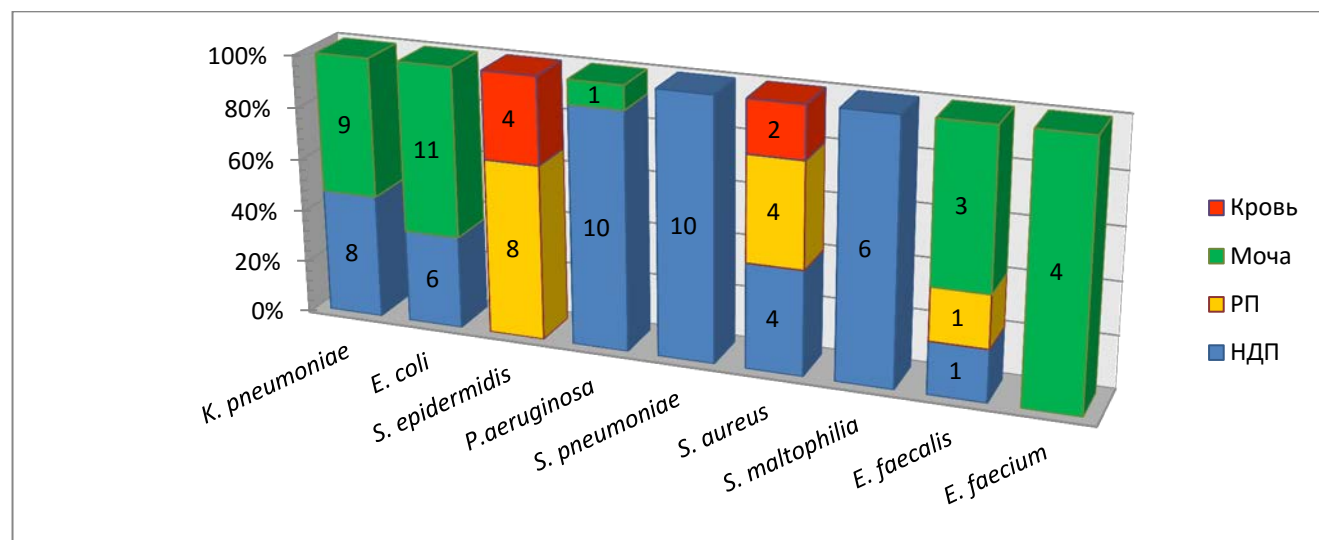


Рисунок 12. Распределение видов ведущих патогенов по источникам выделения в ДХО: % – по оси ординат; внутри столбиков указаны абсолютные числа изолятов каждого вида бактерий.

При сравнении микробного профиля двух отделений было выявлено, что *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* выделяли в ВХО в основном из раневой поверхности, а в ДХО – другого клинического материала, и различие между ВХО и ДХО по данному признаку для указанных видов определялось как значимое ($p = 0,000$). Противоположная ситуация складывалась в отношении *S. epidermidis* ($p = 0,126$): в обоих отделениях его изолировали преимущественно из раневой поверхности. *S. pneumoniae* достоверно ($p = 0,000$) преобладал в материалах из нижних дыхательных путей пациентов как ВХО, так и ДХО.

Проведённый мониторинг выявил незначительные различия в грамотрицательном бактериальном пейзаже детского и взрослого хирургических отделений. *K. pneumoniae*, *E. coli* и *P. aeruginosa* встречались в обоих отделениях, но в ДХО чаще – *K. pneumoniae* и *E. coli*, в ВХО – *P. aeruginosa*. В состав ведущей микробиоты ДХО вошёл ещё один представитель НГОБ – *S. maltophilia*, а ВХО – *A. baumannii*. Несмотря на незначительное преобладание на 9,0 % ГПБ над ГОБ в детской и взрослой хирургии ($p < 0,023$), где ведущая роль в таком распределении принадлежит *S. epidermidis* – 20,3 % от общего числа бактерий, ГОБ по своей численности превысили остальные ГПБ на 17,0 % ($p < 0,001$).

Согласно данным нашего исследования определен месяц года – август, в котором наблюдалась наибольшая частота встречаемости ГОБ, как в ВХО, так и в ДХО. Было показано, что максимумы ГОБ или ГПБ сопровождаются уменьшением числа бактерий противоположной группы. Тенденция роста роли грамотрицательных и снижения роли грамположительных микробов наблюдалась в ДХО при переходе от I (03.2012-03.2013) к III (03.2014-03.2015) периоду изучения. В ВХО только второй период исследования (03.2013-03.2014) характеризовался повышением уровня ГОБ по сравнению с ГПБ.

Специфика ВХО, связана с наличием пациентов, имеющих нарушение целостности покровов и более глубоких слоёв тканей в результате хирургического вмешательства, соответственно этому основной клинический материал – раневая поверхность. В ДХО хирургическое вмешательство не было определяющим фактором в структуре биоматериала, полученного от пациентов, его основную часть составили образцы из нижних дыхательных путей. В нашем исследовании было выявлено, что некоторые бактерии (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*) независимо от их видовой принадлежности колонизировали именно те биотопы пациентов, которые в большей степени исследовались в конкретном отделении. В противоположность этому *S. epidermidis*, *S. pneumoniae* встречались в том клиническом материале, который соответствует их местам обитания, что могло обуславливать эндогенный путь заражения.

III. I. 3. Бактериальный профиль реанимационных отделений

Наряду с хирургическими отделениями за период времени 03.2012 – 03.2015 была исследована распространённость бактериальных патогенов, выделенных из биотопов пациентов детского и взрослого реанимационных отделений – (ДРО) и (ВРО). Такой биологический материал, как содержимое нижних дыхательных путей, раневая поверхность, моча и кровь сохранили свою актуальность в качестве клинического материала и в отделениях реанимации. При этом значительная доля биоматериала приходилась на НДП: в ДРО 77,8 % ($p < 0,000$), а в ВРО 59,1 % ($p < 0,000$). Высеваемость микроорганизмов в ДРО составила 28,1 %, а в ВРО 37,4 %. В таблице 7 представлены основные характеристики изученных биоматериалов по отделениям.

Таблица 7. Количественные и качественные показатели проб биоматериалов

Отделение	Количество проб биоматериала		Количество (+) проб биоматериала		Количество ГПБ		Количество ГОБ		Общее количество бактерий	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ДРО	1422	61,7	400	54,8	110	65,5	323	53,7	433	56,2
ВРО	883	38,3	330	45,2	58	34,5	279	46,3	337	43,8
Итого	2305	100,0	730	100,0	168	100,0	602	100,0	770	100,0

Примечание: (+) – положительные пробы (содержащие бактерии); абс. – абсолютное число бактерий; ГПБ – грамположительные бактерии; ГОБ – грамотрицательные бактерии.

Соразмерно исследуемому в отделениях клиническому материалу, основное количество положительных результатов анализов, то есть выделение микроорганизмов, было связано с секретом НДП у детей 86,5 % ($p < 0,000$) и у взрослых 72,7 % ($p < 0,000$) (табл. 8). Распределение выделенных бактерий по изученным периодам 03.2012 – 03.2013 (I), 03.2013 – 03.2014 (II), 03.2014 – 03.2015 (III) носило неравномерный характер. Отмечалось небольшое снижение количества как грамотрицательных ($p < 0,000$), так и грамположительных ($p < 0,02$) бактерий за второй период в ДРО, но значительный рост ГОБ произошёл в ДРО в течение третьего периода, когда их количество увеличилось на 63,3 % по сравнению со вторым и на 42,2 % по сравнению с первым периодами.

Таблица 8. Результаты выделения бактерий из материала различных биотопов

Биоматериал	Количество образцов биоматериала, собранного в отделениях							
	ДРО				ВРО			
	Общее кол-во		(+)		Общее кол-во		(+)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Нижние дыхательные пути	1107	77,8	346	86,5	522	59,1	240	72,7
Кровь	153	10,8	32	8,0	275	31,2	57	17,3
Раневая поверхность	128	9,0	14	3,5	68	7,7	24	7,3
Моча	34	2,4	8	2,0	18	2,0	9	2,7
Всего	1422	100,0	400	100,0	883	100,0	330	100,0

Примечание: (+) – положительные образцы, т.е. с выделением бактерий.

Анализ частоты встречаемости микроорганизмов в ВРО не определил роста числа ГПБ в какой-либо период ($p < 0,1$). В отличие от этого обнаружено повышение количества ГОБ во II периоде на 31,0 % и 22,1 % по сравнению с I и III периодами соответственно ($p < 0,03$) (табл. 9).

Таблица 9. Распределение грамотрицательных и грамположительных бактерий по периодам изучения

Периоды изучения	Количество выделенных бактерий в ДРО				Количество выделенных бактерий в ВРО			
	ГОБ		ГПБ		ГОБ		ГПБ	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
I (03.2012 – 03.2013)	96	29,7	50	45,5	78	28,0	16	27,6
II (03.2013 – 03.2014)	61	18,9	27	24,5	113	40,5	15	25,9
III (03.2014 – 03.2015)	166	51,4	33	30,0	88	31,5	27	46,5
Всего	323	100,0	110	100,0	279	100,0	58	100,0

Общей тенденцией отделений реанимации являлось превалирование ГОБ над ГПБ ($p < 0,000$). На этом фоне в динамике по периодам изучения наблюдалось усиление роли ГОБ по сравнению с ГПБ в структуре микробиоты детского отделения. Общей тенденцией отделений реанимации являлось превалирование ГОБ над ГПБ ($p < 0,000$). На этом фоне в динамике по периодам изучения наблюдалось усиление роли ГОБ по сравнению с ГПБ в структуре микробиоты детского отделения (рис. 13). Соотношения между ГОБ и ГПБ во взрослой реанимации колебались по периодам, и максимальное преобладание ГОБ над ГПБ наблюдалось во втором периоде (рис. 14).

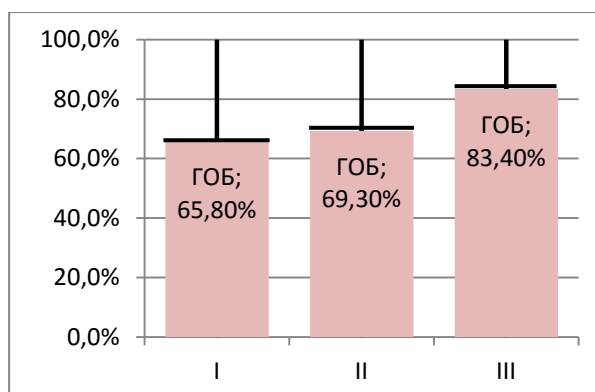


Рисунок 13. Динамика соотношения грамотрицательных и грамположительных бактерий по периодам изучения в ДРО:

■ – Грамотрицательные бактерии;
 □ – Грамположительные бактерии;
 I – (03.2012-03.2013);
 II – (03.2013-03.2014);
 III – (03.2014-03.2015)

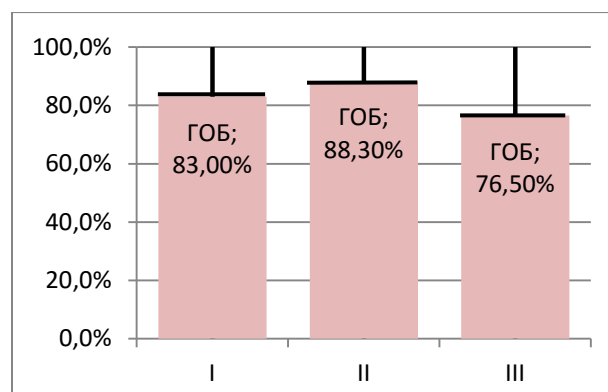


Рисунок 14. Динамика соотношения грамотрицательных и грамположительных бактерий по периодам изучения в BRO:

■ – Грамотрицательные бактерии;
 □ – Грамположительные бактерии;
 I – (03.2012-03.2013);
 II – (03.2013-03.2014);
 III – (03.2014-03.2015)

Частота встречаемости ГПБ в детском отделении различалась по месяцам, показав максимум в ноябре ($p < 0,002$). Для грамотрицательных бактерий наибольшие значения встречаемости наблюдались в октябре, ноябре ($p < 0,000$). Полной смены ведущих патогенов с ГОБ на ГПБ не происходило, что было характерно для хирургических отделений (рис. 15).

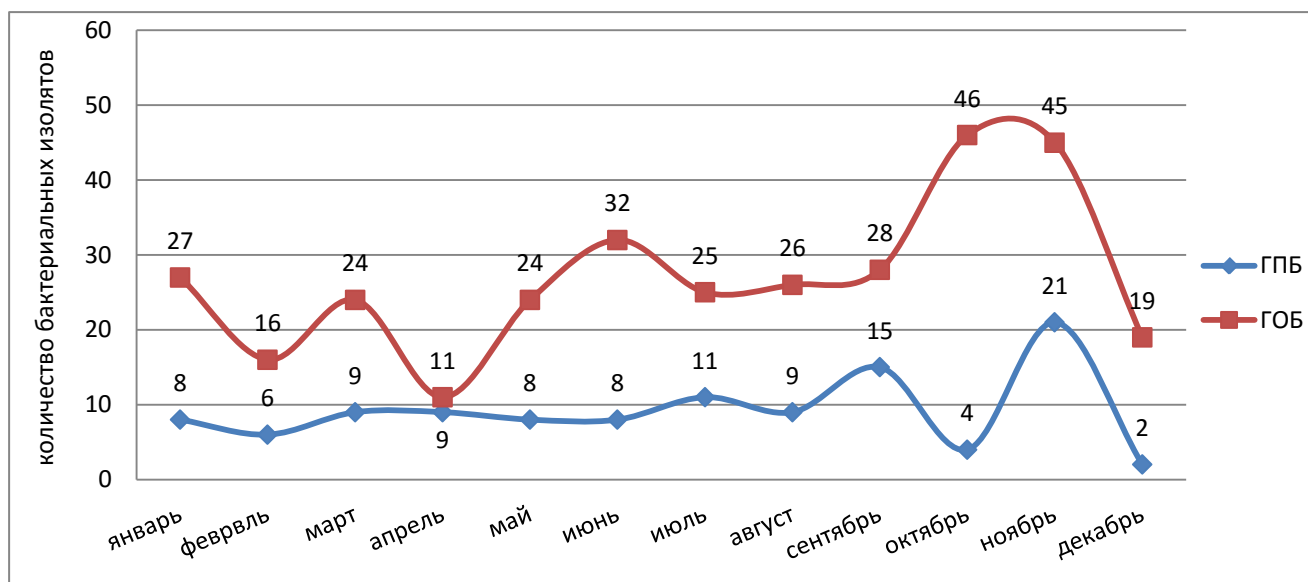


Рисунок 15. Динамика выделения грамотрицательных (ГОб) и грамположительных бактерий (ГПБ) по месяцам в ДРО.

Выделенные ГПБ в BRO за весь период наблюдения не имели различий в распределении по месяцам, и незначительные отклонения, отражающиеся

на графике, были недостоверны ($p < 0,368$). Напротив, для ГОБ отмечен максимум в феврале ($p < 0,000$). ГПБ ни в один из месяцев не сменили ГОБ в качестве ведущих патогенов (рис. 16).

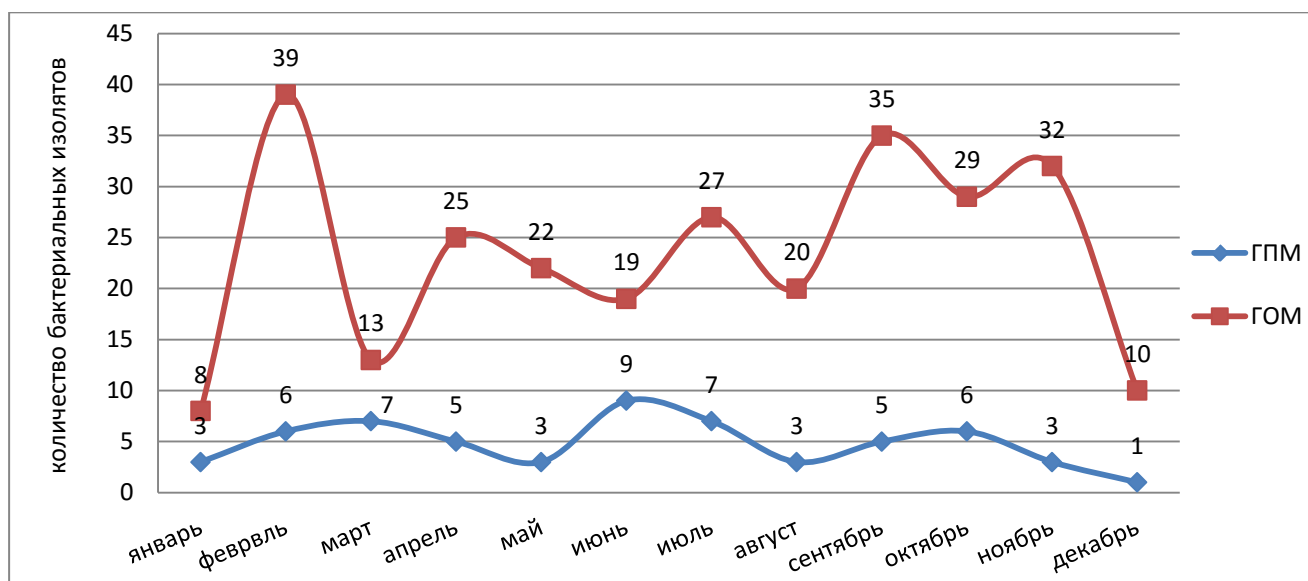


Рисунок 16. Динамика выделения грамотрицательных (ГОБ) и грамположительных бактерий (ГПБ) по месяцам в ВРО.

В структуре ведущей микробиоты ДРО ГОБ были представлены бактериями семейства *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *E. coli*) и неферментирующими грамотрицательными бактериями (НГОБ): *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *S. maltophilia*, которые в совокупности составили 64,7 % (280) от всех выделенных бактерий. Основную группу грамположительных бактерий определили 3 вида рода *Staphylococcus*, и *S. pneumoniae*, на их долю пришлось 20,0 % (87). Остальные бактерии по частоте встречаемости не превышали 2,5 % и практически не влияли на бактериальный профиль ДРО (рис. 17).

Видовое разнообразие основных ГОБ в ВРО включало представителей *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*) и НГОБ (*P. aeruginosa* и *A. baumannii*, *S. maltophilia*), которые составили 74,2 % (250) от всех выделенных бактерий. Грамположительные бактерии в ВРО не получили широкого распространения и 3 наиболее часто встречающихся вида составили всего 9,5 % (32), остальные бактерии не преодолели 2,7 % барьер (рис. 18).

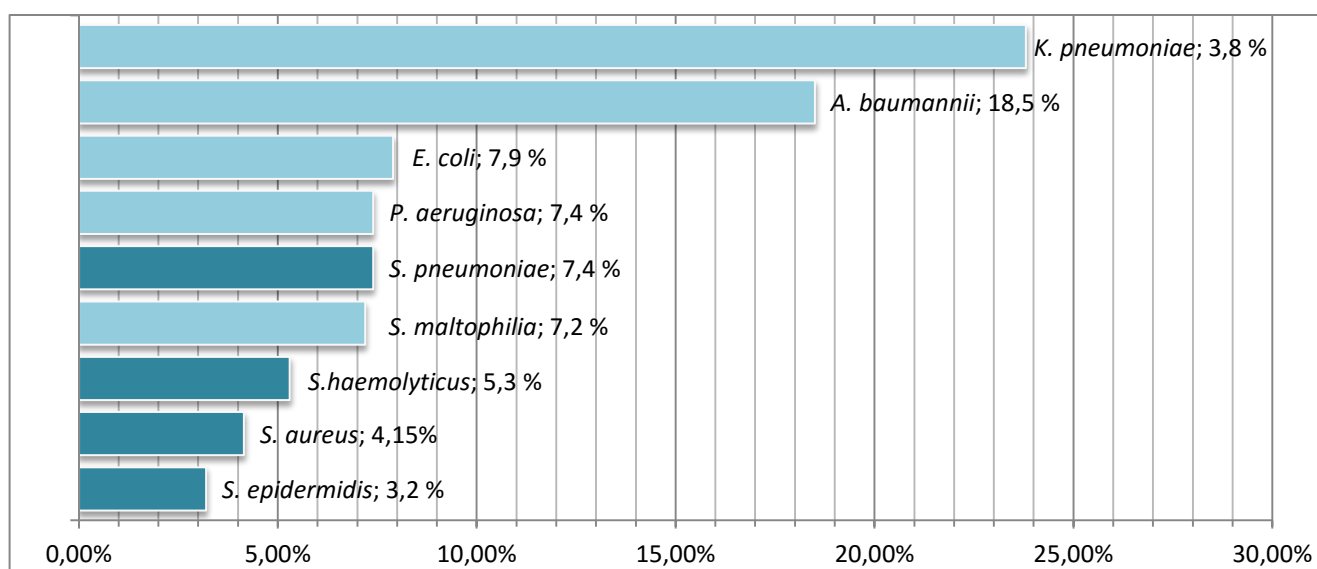


Рисунок 17. Структура видов бактерий, выделенных в ДРО.

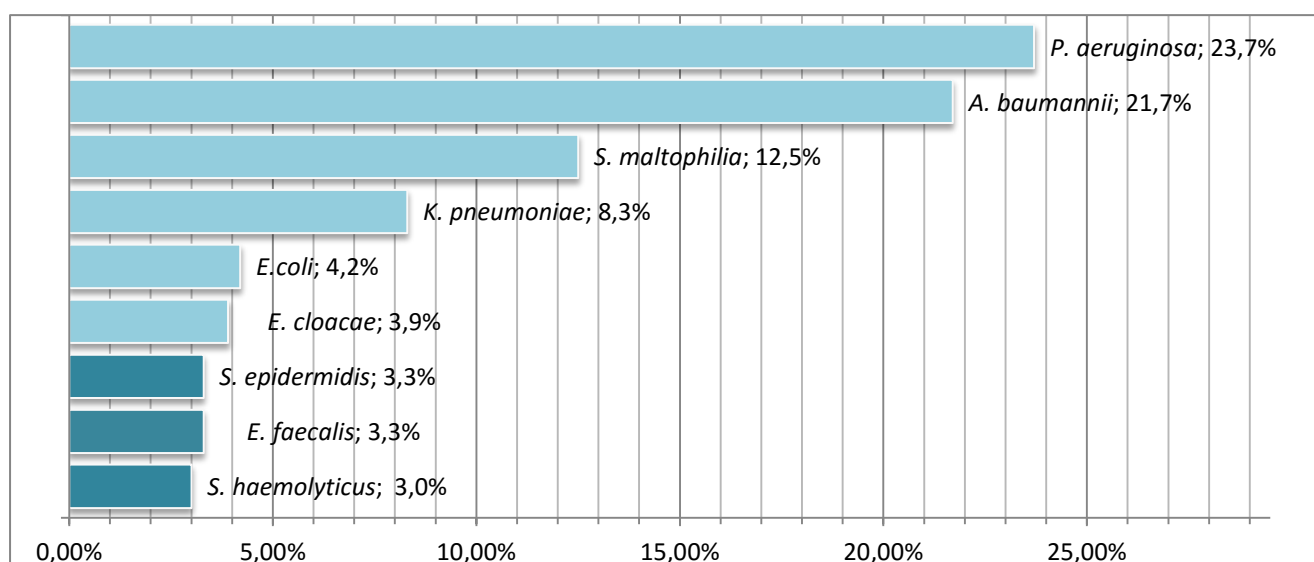


Рисунок 18. Структура видов бактерий, выделенных в ВРО.

Распределение каждого вида ведущих бактерий по источникам выделения отличалось преимущественной их принадлежностью биотопам НДП как в детском, так и во взрослом реанимационных отделениях ($p < 0,000$). Исключение составили *S. epidermidis* и *E. faecalis* в ВРО (рис.19, рис. 20). Отделения реанимации отличаются от хирургических пребыванием в них пациентов со сниженной двигательной активностью, часто находящихся на искусственной вентиляции лёгких, и в связи с этим, подверженных колонизации их НДП различными бактериями, в том числе, и внутрибольничными изолятами. В результате, основным клиническим материалом в данных отделениях служили секреты и слизистые оболочки НДП.

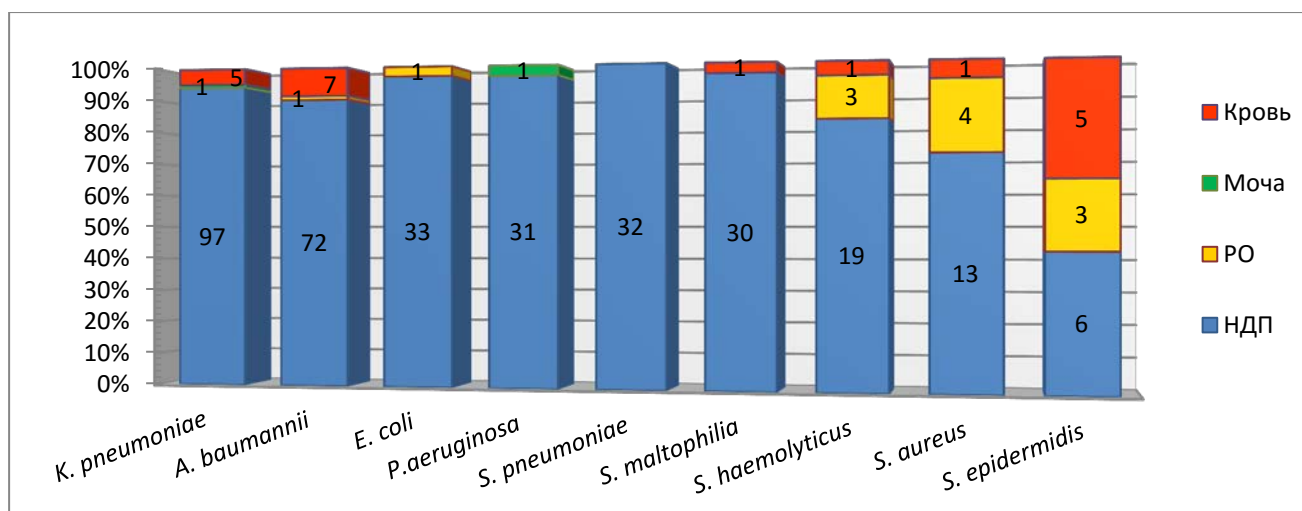


Рисунок 19. Распределение видов ведущих патогенов по источникам выделения в ДРО: % – по оси ординат; внутри столбцов указаны абсолютные числа изолятов каждого вида бактерий.

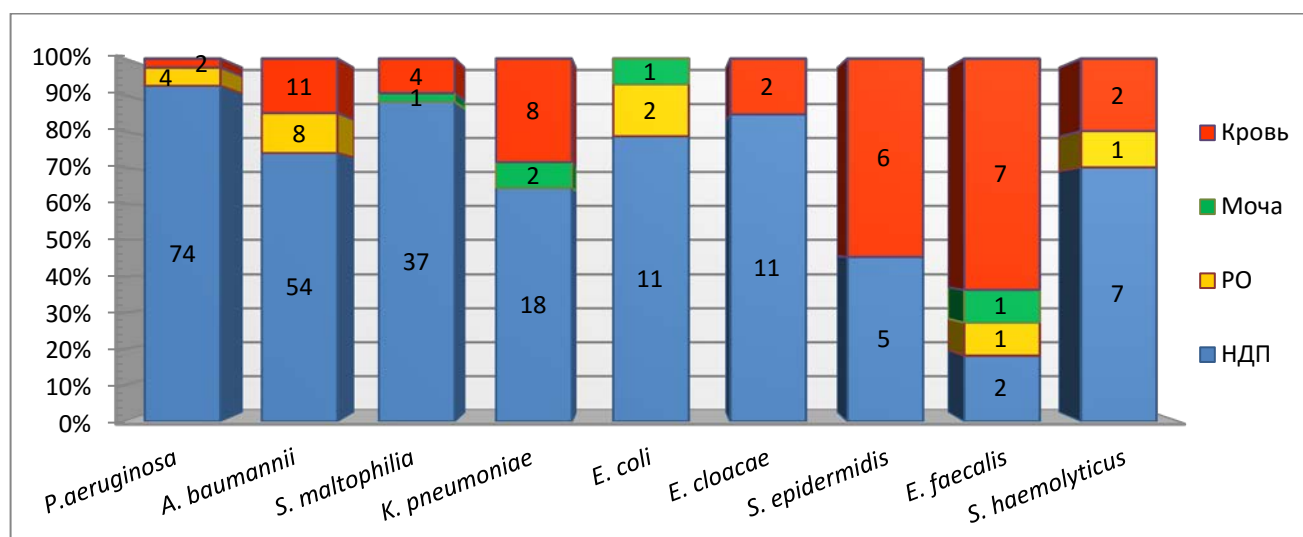


Рисунок 20. Распределение видов ведущих патогенов по источникам выделения в BRO: % – по оси ординат; внутри столбцов указаны абсолютные числа изолятов каждого вида бактерий.

Таким образом, в исследовании было выявлено, что ГОБ играли исключительную роль в колонизации НДП как детей, так и взрослых пациентов. Из ГПБ только *S. pneumoniae* в ДРО конкурировал с ГОБ *P. aeruginosa* и *S. maltophilia*, встречаемость остальных ГПБ не превысила 5,3 %. В отделениях реанимации бактериальный профиль составили, в основном, виды грамотрицательных бактерий *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *E. coli*, *E. cloacae*. Наиболее часто их выделяли из НДП взрослых и детей ($p < 0,000$), при этом в BRO встречаемость этих бактерий в НДП в 4,5, а в ДРО в 15,5 раз превысила их нахождение в других биотопах пациентов.

Всего лишь незначительные различия присутствовали в грамотрицательном бактериальном пейзаже детского и взрослого реанимационных отделений. В ДРО чаще встречались – *K. pneumoniae* и *A. baumannii* ($p < 0,000$), в ВРО – *P. aeruginosa* и *A. baumannii* ($p < 0,000$); эти пары составили 56,7 % (183) и 55,0 % (153), соответственно, от общего количества грамотрицательных бактерий каждого отделения. Согласно нашим данным в осенние месяцы – в сентябре, октябре, ноябре наблюдалась наибольшая частота встречаемости ГОБ в ДРО 36,8 % ($p < 0,003$) и ВРО 34,4 % ($p < 0,000$) по сравнению с остальными сезонами года. Сезонность в распределении ГОБ сопровождалась в дополнение трёхмесячными циклами, где низкий уровень ГОБ в первый месяц сменялся его повышением в следующем месяце и снижением в последнем, иногда, значительным. Только один из таких циклов, наблюдаемый в ВРО был определен как статистически значимый с максимумом в феврале ($p < 0,000$). В ВРО второй промежуток исследования характеризовался наиболее высоким уровнем ГОБ по сравнению с ГПБ. Тенденция роста роли грамотрицательных и снижения роли грамположительных микробов наблюдалась в ДРО при переходе от I к III периоду изучения.

III. I. 4. Динамика состава грамотрицательных бактерий стационара

За изученный промежуток времени из реанимационных и хирургических отделений выделили 1401 изолят бактерий. ГОБ составили 63,5 % (889), что в 1,74 раза превысило количество ГПБ 36,5 % (512) ($p < 0,000$). Шесть видов *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli*, *S. maltophilia*, *E. cloacae* составили 88,6 % (788) изолятов всех ГОБ, остальные представители ГОБ практически не влияли на грамотрицательный профиль стационара и по численности отдельных видов не превысили 1,3 % (12) (рис. 21). Основная часть ГОБ пришлась на реанимационные отделения 67,7% (602 изолята), которые, в основном, и определили структуру ГОБ всего стационара, и только 32,3% (287 изолята) – на хирургические отделения ($p < 0,000$) (рис. 22).

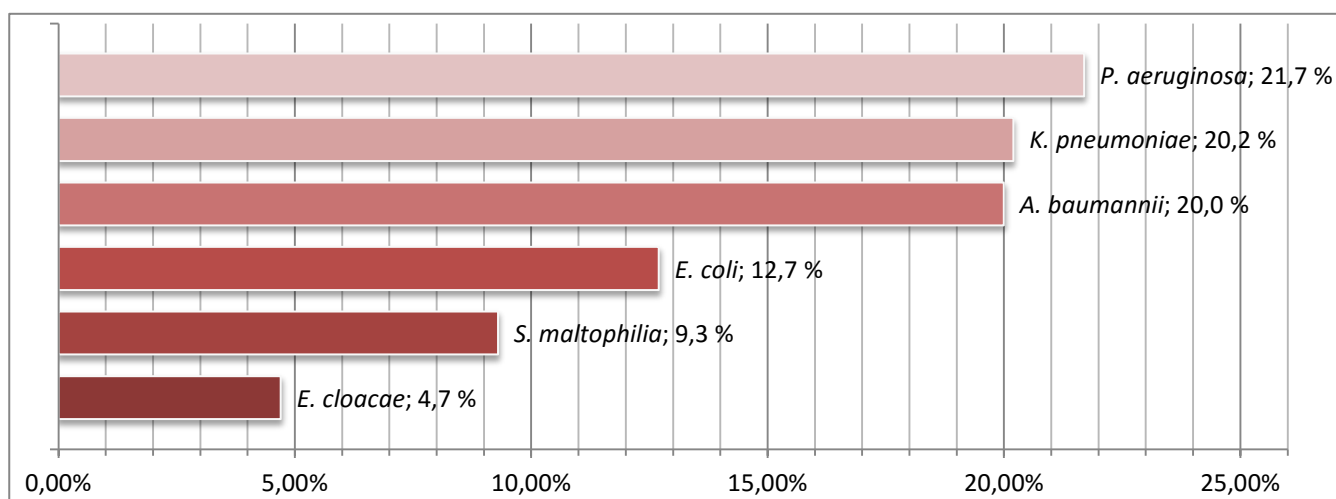


Рисунок 21. Структура видов грамотрицательных бактерий, выделенных в стационаре.

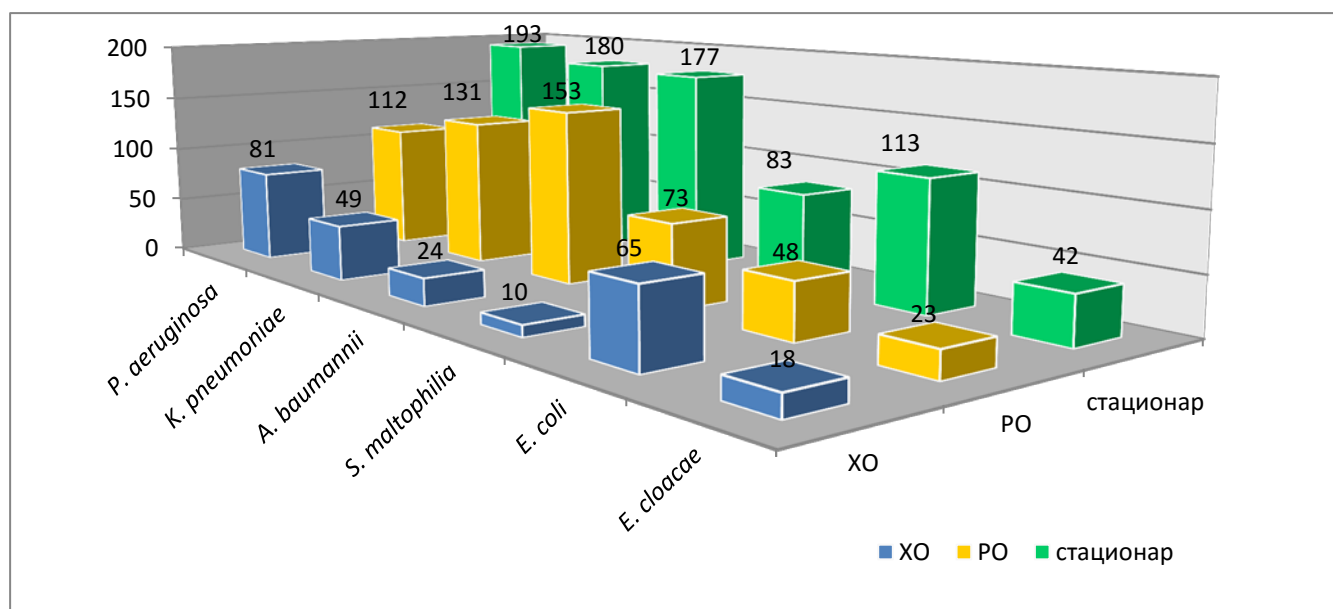


Рисунок 22. Структура доминирующих грамотрицательных бактерий по отделениям: ХО – хирургические отделения; РО – реанимационные отделения; стационар (хирургические и реанимационные отделения) в абсолютных числах.

Кроме двукратного преобладания ГОБ в РО по сравнению с ХО, нами был определён различный вклад отдельных видов ГОБ в данное распределение. Так *P. aeruginosa* ($p < 0,025$), *K. pneumoniae* ($p < 0,000$), *A. baumannii* ($p < 0,000$), *S. maltophilia* ($p < 0,000$) достоверно чаще выделялись в РО, чем ХО. В отличие от них изменение количества выделенных *E. coli* ($p < 0,1$), *E. cloacae* ($p < 0,4$) в РО и ХО не было статистически значимо. Таким образом, для дальнейшего анализа нами были определены 4 вида ГОБ *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*, наиболее важных для стационара, с точки зрения их встречаемости и

распределения в отделениях различного профиля. Несмотря на незначительное преобладание *E. coli* над *S. maltophilia*, последний был отобран, как экзогенный патоген с высоким уровнем естественной устойчивости к антимикробным препаратам и потенциалом внутрибольничного возбудителя, в отличие от *E. coli* – комменсала организма человека.

За анализируемый промежуток времени определена тенденция роста числа изолятов *A. baumannii* от I к III периоду на 34,1 % ($p < 0,00$). В отличие от *A. baumannii*, достоверного увеличения количества *K. pneumoniae* ($p < 0,142$) и *S. maltophilia* ($p < 0,952$) в какой - либо из периодов изучения не происходило. Распределение *P. aeruginosa* характеризовалось преобладанием во II периоде на 31,3% по сравнению с I ($p < 0,031$), число изолятов от II к III периодам уменьшилось на 27,5%, но снижение было недостоверным ($p < 0,06$) (табл. 10).

Таблица 10. Распределение грамотрицательных бактерий по периодам изучения в стационаре

Периоды изучения	Виды грамотрицательных бактерий							
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>A. baumannii</i>		<i>S. maltophilia</i>	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
I (03.2012 – 03.2013)	55	28,5	63	35,0	28	15,8	27	32,5
II (03.2013 – 03.2014)	80	41,5	48	26,6	67	37,9	27	32,5
III (03.2014 – 03.2015)	58	30,0	69	38,3	82	46,3	29	35,0
Всего	193	100,0	180	100,0	177	100,0	89	100,0

Частота встречаемости *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* в различные месяцы была неравномерна и максимальные значения для *P. aeruginosa* определены в августе и сентябре ($p < 0,000$), *K. pneumoniae* – августе, октябре, ноябре ($p < 0,000$) *A. baumannii* – мае, апреле, октябре ($p < 0,000$).

Таким образом, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* имели летне-осеннее преимущество распространения в стационаре, а *A. baumannii* – весенне-осеннее. Изоляты *S. maltophilia* не характеризовались сезонностью выделения из биотопов пациентов ($p < 0,480$) (рис. 23–26).

Кроме сезонной характеристики, данная группа патогенов оценивалась с точки зрения причастности к возрастной и половой принадлежности.

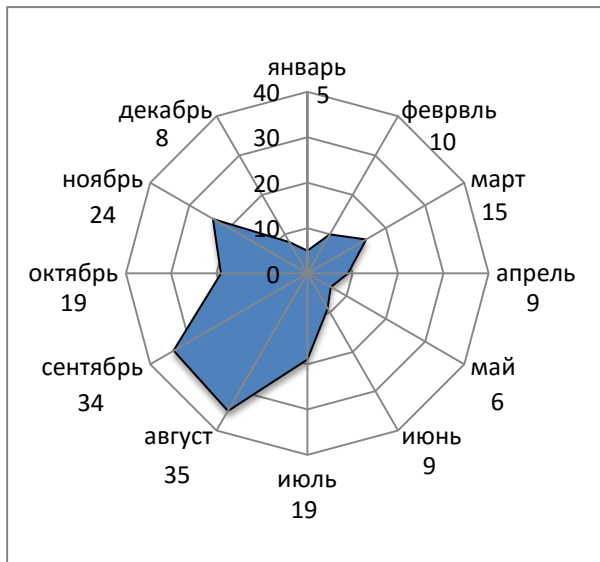


Рисунок 23. Годовая динамика выделения *P. aeruginosa* в абсолютных числах.

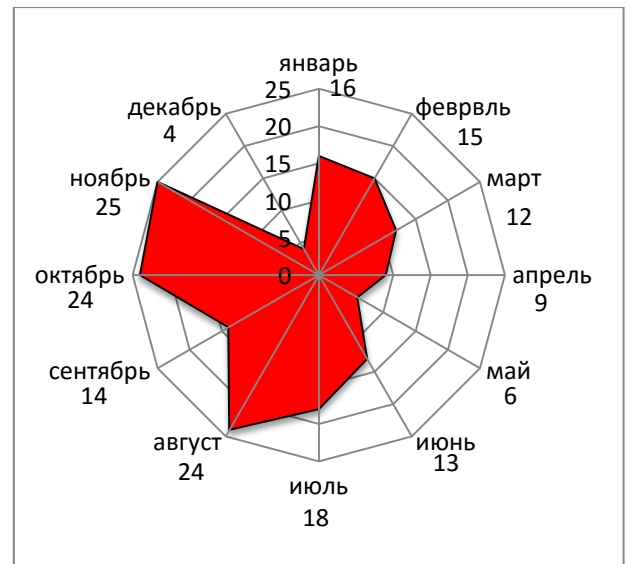


Рисунок 24. Годовая динамика выделения *K. pneumoniae* в абсолютных числах.

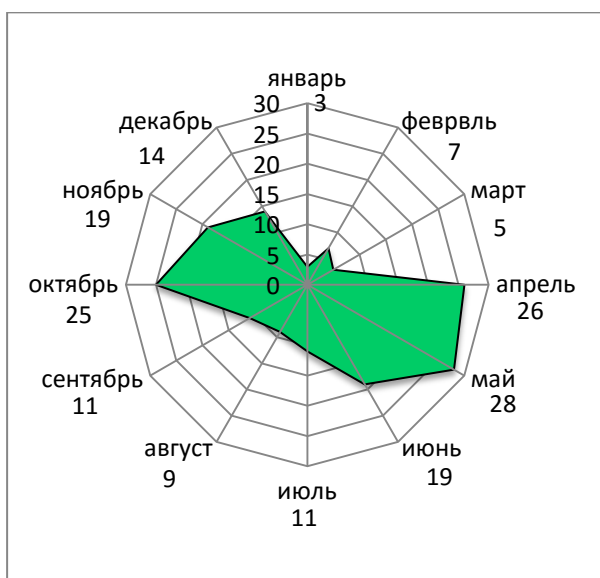


Рисунок 25. Годовая динамика выделения *A. baumannii* в абсолютных числах.

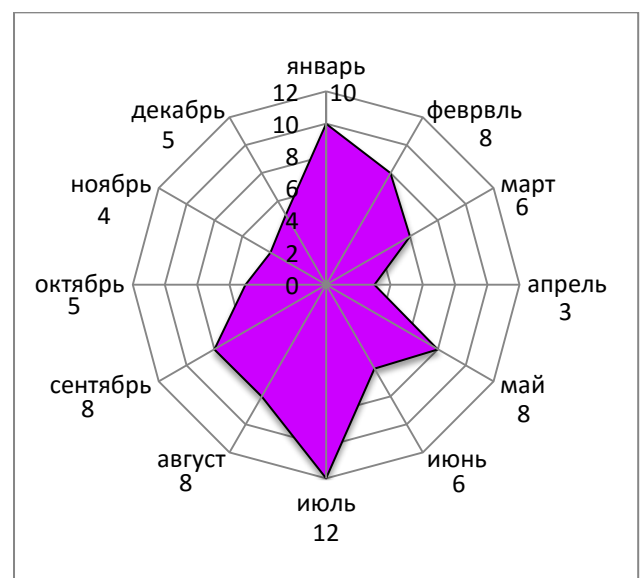


Рисунок 26. Годовая динамика выделения *S. maltophilia* в абсолютных числах.

Изоляты *A. baumannii* и *S. maltophilia* выделяли почти в равном количестве, как от детей, так и от взрослых, и незначительные процентные различия не являлись статистически значимыми ($p < 0,453$ и $p < 0,323$, соответственно). *K. pneumoniae* в 2 раза чаще встречалась у детей, чем у взрослых ($p < 0,000$), а *P. aeruginosa* – напротив в 3,5 раза чаще находили у взрослых пациентов, чем у детей ($p < 0,000$) (рис. 27).

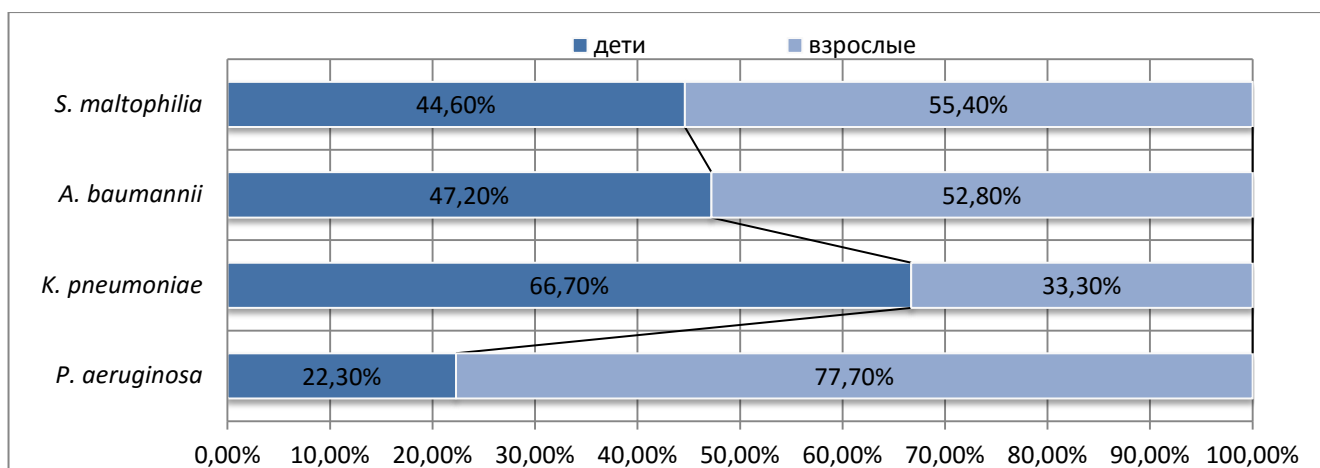


Рисунок 27. Распределение 4 видов ГОБ в зависимости от возрастных групп пациентов.

Половая принадлежность пациентов влияла на различия в распределении *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* среди детей. У девочек преобладал *A. baumannii* ($p < 0,000$), а у мальчиков – *P. aeruginosa* ($p < 0,022$), *K. pneumoniae* ($p < 0,017$). Выделение *S. maltophilia* не зависело от пола детей и небольшой количественный перевес в сторону мальчиков недостоверен ($p < 0,411$) (рис. 28).

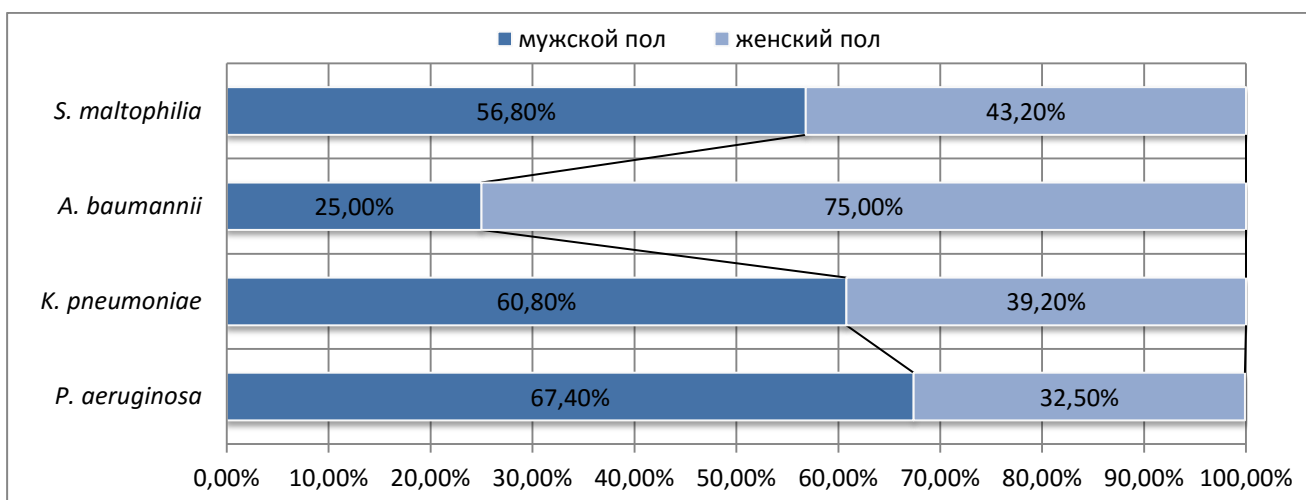


Рисунок 28. Распределение 4 видов ГОБ в зависимости от половой принадлежности детей.

Ситуация у взрослых пациентов по выявлению этих же бактерий у мужчин и женщин складывалась несколько иначе, чем у детей. Изоляты *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* в равных количествах выделяли и от мужчин и от женщин, *A. baumannii* в 1,7 раза чаще встречался у женщин ($p < 0,013$), а *S. maltophilia* в 1,9 раза – у мужчин ($p < 0,039$) (рис.29).

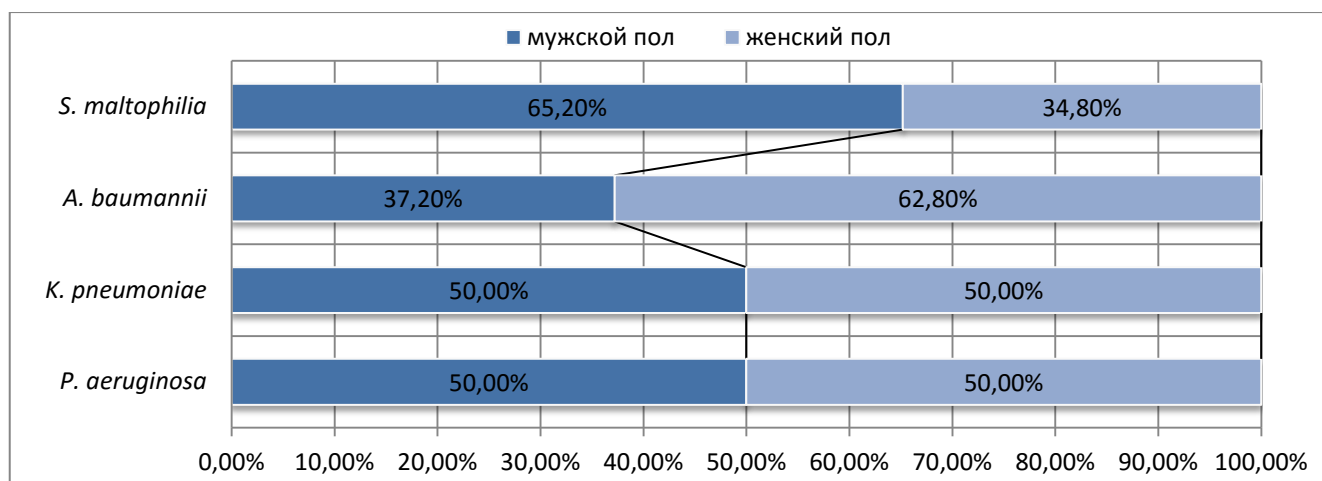


Рисунок 29. Распределение 4 видов ГОБ в зависимости от половой принадлежности взрослых

Исследование состава ассоциаций и монокультур, образованных *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *S. maltophilia* показало, что *P. aeruginosa*, в отличие от 3 остальных, выделялся из биоматериалов совместно с другими бактериями более часто, но различия были незначимы ($p < 0,120$). Основные характеристики ассоциаций данных бактерий представлены в таблице 11.

Таблица 11. Встречаемость 4 видов ГОБ в составе бактериальных ассоциаций

Базовые виды ГОБ	Количество ассоциаций, образованных базовыми видами ГОБ		Состав ассоциаций, включающих базовые виды ГОБ				Количество ассоциаций базовых видов с другими видами ГОБ	
			2-х компонентные		3-х компонентные			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
<i>P. aeruginosa</i>	45	34,0	43	34,0	2	2,0	33	36,3
<i>K. pneumoniae</i>	29	22,0	26	20,0	3	3,0	20	22,0
<i>A. baumannii</i>	29	22,0	29	23,0	0	0,0	21	23,0
<i>S. maltophilia</i>	29	22,0	29	23,0	0	0,0	17	18,7
Итого	132	100,0	127	100,0	5	100,0	91	100,0

Наиболее распространёнными были двухкомпонентные ассоциации изученных бактерий 96,2 % (127), на долю трёхкомпонентных пришлось всего 3,8 % (5). Чаще других (69,0 %) встречались их сочетания с ГОБ, в том числе, друг с другом, что и определило характер преобладающих ассоциаций бактерий ($p < 0,000$). В них вошли *P. aeruginosa* + *S. maltophilia* (10), *P. aeruginosa* + *A. baumannii* (9), *K. pneumoniae* + *S. maltophilia* (7), *A. baumannii* + *S. maltophilia* (6), *P. aeruginosa* + *K. pneumoniae* (4). Среди ГПБ *S. pneumonia* в 7,6 % (10), *E. faecalis* – 6,0 % (8)

случаев обнаруживали в паре ГОБ: *P. aeruginosa* + *S. pneumoniae* (4) и *P. aeruginosa* + *E. faecalis* (3), *K. pneumoniae* + *S. pneumoniae* (3) и *K. pneumoniae* + *E. faecalis* (4), *S. maltophilia* + *S. pneumoniae* (1), *A. baumannii* + *S. pneumoniae* (1), *A. baumannii* + *E. faecalis* (1). Основная часть изолятов *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *S. maltophilia* находилась в биоматериалах в виде монокультур, что с нашей точки зрения, является показателем самостоятельности этих бактерий как патогенных агентов.

Результаты проведённого мониторинга, свидетельствуют, что *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *S. maltophilia* в стационаре являются ведущими внутрибольничными возбудителями. Их значимость для стационара, в первую очередь, определялась отделениями реанимации, несущими основную грамотрицательную бактериальную нагрузку. Нами была показана сезонность в распределении бактерий, согласно которой *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* доминируют в летне-осенний, *A. baumannii* – весенне-осенний периоды, а *S. maltophilia* не подвержена сезонному выявлению в стационаре. В исследовании выявлены возрастные и половые различия в колонизации биотопов пациентов этими бактериями. Изоляты *K. pneumoniae* чаще выделяли у детей, *P. aeruginosa* – взрослых пациентов; *A. baumannii* – у женского пола, *S. maltophilia* – мужского. В составе ассоциаций *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *S. maltophilia* встречаются значительно реже, чем в монокультурах, что характеризует их способность самостоятельно колонизировать пациентов, имеющих сниженную способность к аутостабилизации.

Мониторинг, проведённый в стационаре, показал, что ГОБ *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. baumannii*, являлись доминирующими патогенами в стационаре. Их выделение от пациентов было связано с теми биотопами человека, которые в большей степени подвергались инфицированию в каждом конкретном отделении. Очевидно, некоторые из представителей *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. baumannii*, являлись внутрибольничными штаммами, с чем, возможно, были связаны вспыхивающий характер распределения ГОБ по месяцам и периодам исследования. На этапе идентификации показано, что госпитальные

популяции этих видов бактерий неодинаковы. Так *A. baumannii* и *S. maltophilia* более однородны по биохимическим свойствам, чем популяции *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* (рис. 30).

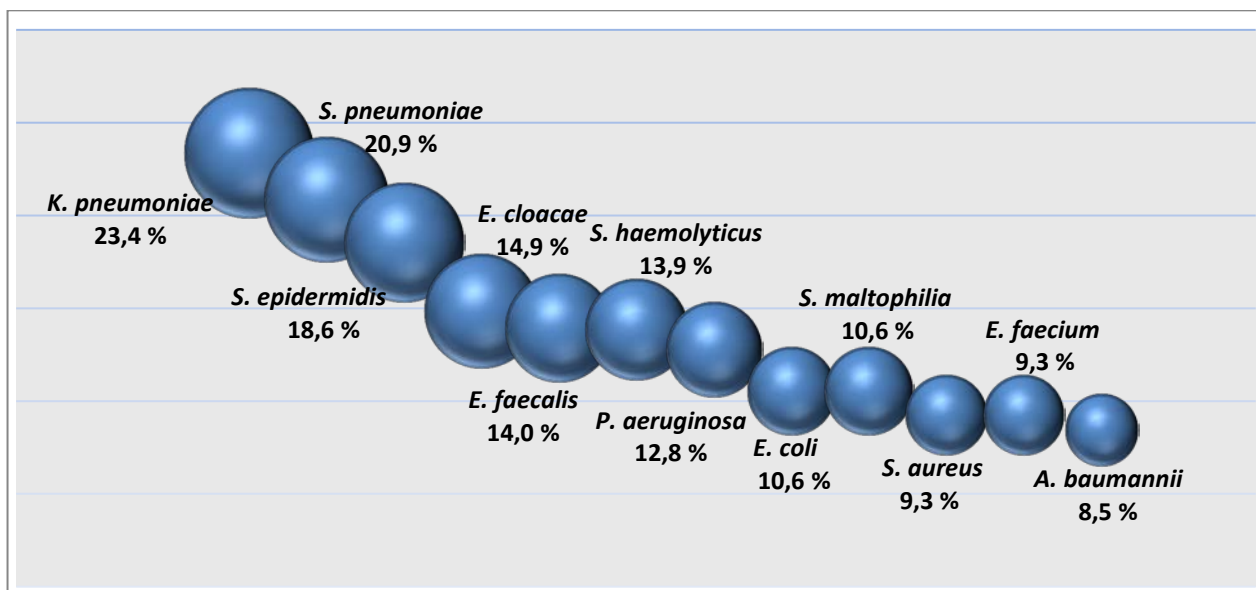


Рисунок 30. Расположение основных видов внутрибольничных патогенов в порядке убывания количества проявленных ими нетипичных биохимических реакций.

В результате чего, можно предположить, что биохимически идентичные изоляты *A. baumannii* и *S. maltophilia* представляли внутрибольничные субпопуляции бактерий. В то же время, более разнообразные биохимические свойства *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* могут свидетельствовать о наличии различных источников этих бактерий в клинических условиях, не исключая происхождение некоторых *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* из внутрибольничной среды.

Глава IV. III. II. Чувствительность к антибактериальным препаратам выделенных изолятов грамотрицательных бактерий

III. II. 1. Комплексная оценка антибиотикорезистентности

Активность антибактериальных препаратов в отношении выделенных изолятов *K. pneumoniae* представлена в таблице 12.

Таблица 12. Чувствительность *K. pneumoniae* к антибиотикам

Антибактериальные препараты	Категория чувствительности					
	Ч		УР		Р	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Ампициллин	0	0,0	НК		180	100,0
Амоксициллин /клавуланат	49	27,2	НК		131	72,8
Цефуроксим	16	8,9	НК		164	91,1
Цефтазидим	35	19,5	15	8,3	130	72,2
Цефтриаксон	21	11,7	0	-	159	88,3
Цефепим	35	19,5	22	12,2	123	68,3
Эртапенем	154	85,5	5	2,8	21	11,7
Имипенем	158	87,8	13	7,2	9	5,0
Меропенем	159	88,3	21	11,7	0	0,0
Амикацин	113	62,8	28	15,6	39	21,6
Гентамицин	80	44,4	10	5,5	90	50,0
Тобрамицин	45	25,0	0	0,0	135	75,0
Ципрофлоксацин	79	43,9	14	7,8	87	48,3
Тигециклин	122	67,8	34	18,9	24	13,3
Триметоприм /сульфометоксазол	68	37,8	0	0,0	112	62,2

Примечание: Ч – чувствительные, УР – умеренно резистентные, Р – резистентные, НК – нет категории.

Восприимчивость *K. pneumoniae* к различным группам β -лактамов антибиотиков значительно различалась. Ампициллин показал абсолютную неэффективность, а активность цефалоспоринов II (цефуроксима), III (цефтриаксона, цефотаксима, цефтазидима) и IV (цефепима) поколений не превышала 20,0%. Чувствительность к данным препаратам была ограничена продукцией ферментов ESBL, которые имеют плазмидное происхождение и чувствительны к ингибиторам ферментов, в частности, клавулановой кислоте. Фенотипический скрининг *K. pneumoniae* на наличие ESBL выявил их присутствие у 78,9 % (142) изолятов (рис.31).

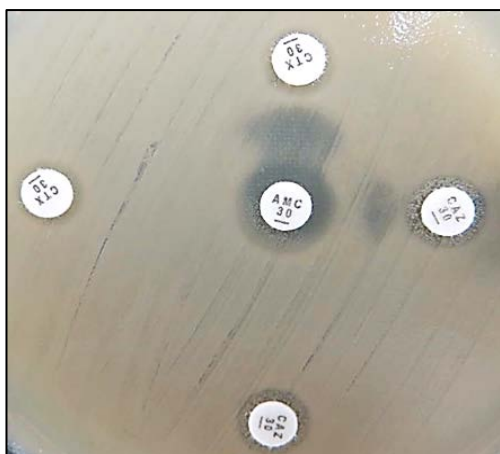


Рисунок 31. Продукция ESBL, выявленная у *K. pneumoniae* фенотипическим методом в тесте с антибиотиками: цефтазидимом (CAZ 30), цефотаксимом (CTX 30), амоксициллин/клавуланатом (AMC 30).



Рисунок 32. Гетерорезистентность *K. pneumoniae* в тесте с антибиотиками меропенемом (MP) и имипенемом (IMP).

В связи с этим заслуживает внимание резистентность *K. pneumoniae* к ингибиторозащищённому аминопенициллину – амоксициллин/клавуланату, указывающая на присутствие ферментов других групп, например, видоспецифических β -лактамаз с их способностью к гиперпродукции, или плазмидных β -лактамаз AmpC.

Единственной высоко активной группой β -лактамов в стационаре являлись карбапенемы, в то же время, было обнаружено снижение чувствительности к этим препаратам вплоть до полной резистентности (эртапенем, имипенем). Наиболее высокий уровень устойчивости *K. pneumoniae* наблюдался в отношении эртапенема, который в 2,3 раза ($p < 0,028$) превысил соответствующее значение имипенема. К меропенему бактерии проявляли умеренную, но не полную резистентность. Все устойчивые к карбапенемам изоляты *K. pneumoniae* характеризовались гетерорезистентностью (наличием субпопуляций с различным уровнем сопротивления антибиотикам). Они выявлялись обнаружением бактериальных колоний внутри зон ингибирования, образованных антибиотиками (рис. 32).

Спектр изучения чувствительности изолятов *K. pneumoniae* к аминогликозидам включал три препарата (амикацин, гентамицин, тобрамицин). Тобрамицин характеризовался наименьшей, а амикацин наибольшей

активностью. Уровень резистентности бактериальных изолятов к амикацину в 2,3 и 3,5 раза был ниже, чем к гентамицину и тобрамицину, соответственно ($p < 0,000$), но количество умеренно резистентных к амикацину *K. pneumoniae* приводит к нивелированию различий в потенциальной эффективности между амикацином и гентамицином. Кроме того, эти два препарата оказались активнее по сравнению с большинством β -лактамов.

Другие антибиотики – ципрофлоксацин, триметоприм/сульфометоксазол характеризовались сниженной активностью против *K. pneumoniae*, которая не превышала 45,0 %. Заслуживает внимание новый препарат тигециклин, в отношении которого в 32,2 % случаев было зарегистрировано снижение чувствительности со стороны *K. pneumoniae* вплоть до полной невосприимчивости к препарату, что, очевидно, связано с внедрением антибиотика в терапевтическую практику стационара.

В течение трёх периодов исследования проводилось изучение восприимчивости *K. pneumoniae* к основным антимикробным препаратам. Динамика этого процесса представлена на рисунке 33. Из представленных на диаграмме данных видно, что потенциально эффективных антибиотиков недостаточно для применения в клинике. Всего четыре из них (меропенем, имипенем, эртапенем, амикацин) не теряли своей активности до уровня ниже 50,0 % за каждый период исследования.

Достоверно выросла устойчивость *K. pneumoniae*, включая умеренно выраженную, от первого к третьему периоду к некоторым препаратам: амоксициллин/клавуланату на 37,2 % ($p < 0,000$), эртапенему – 29,0 % ($p < 0,000$), тигециклину – 39,5 % ($p < 0,000$). Изоляты *K. pneumoniae* со сниженной чувствительностью к меропенему и имипенему были выделены в I и III периодах практически в равных количествах и отсутствовали во II периоде. Остальные антибиотики по количеству чувствительных и устойчивых к ним изолятов распределялись по периодам относительно равномерно и незначительные колебания в активности этих препаратов не были статистически значимы.

Периоды исследования

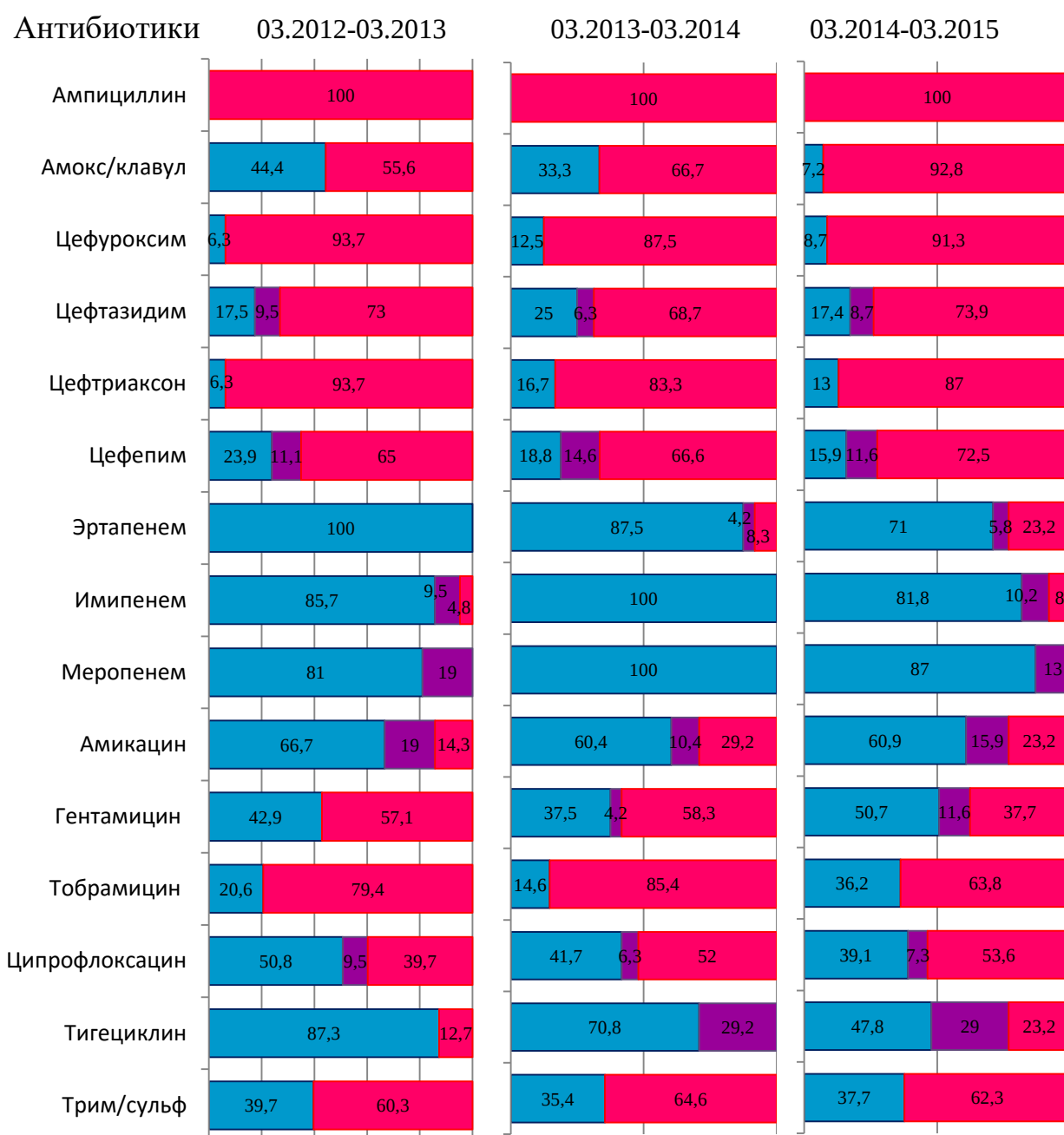


Рисунок 33. Динамика активности *K. pneumoniae* к антибиотикам по периодам изучения
 Примечание: ■ – чувствительные, ■ – умеренно устойчивые, ■ – устойчивые изоляты;
 Амокс/клавул – амоксициллин / клавуланат; Трим/сульф – триметоприм /сульфометоксазол;
 значения внутри цветных полей указаны в процентах.

Активность антибактериальных препаратов в отношении *K. pneumoniae* была оценена по показателям средних диаметров зон ингибирования культуры антибиотиками и определена степень варьирования полученных значений отдельно для категории чувствительных (S), умеренно резистентных (I) и резистентных (R) изолятов (табл. 13).

Таблица 13. Активность антибиотиков в отношении изолятов *K. pneumoniae* (диско-диффузионный метод)

Название антибиотика	Зона задержки роста, мм	Коэфф. вариации, %	Зона задержки роста, мм	Коэфф. вариации, %	Зона задержки роста, мм	Коэфф. вариации, %
	$\bar{x} \pm \sigma$	V	$\bar{x} \pm \sigma$	V	$\bar{x} \pm \sigma$	V
	чувствительные		умеренно резистентные		резистентные	
амикацин	18,5±0,5	2,7	15,7±0,8	4,8	8,5±3,4	40,2
гентамицин	17,4±0,6	3,6	15,5±0,7	4,6	7,1±2,2	31,5
ампициллин	0,0±0,0	0,0	НК		6,2±0,4	6,5
амокс/клавул	19,0±0,0	0,0	НК		8,8±3,8	43,5
цефтазидим	23,0±1,0	4,3	21,0±0,0	0,0	7,5±3,0	39,4
цефепим	26,5±0,5	1,9	23,0±0,0	0,0	7,8±3,6	46,0
цефотаксим	24,0±3,0	12,5	0,0±0,0	0,0	6,2±1,2	19,6
цефуроксим	0,0±0,0	0,0	НК		6,0±0,0	0,0
тримет/сульфомет	22,3±1,4	6,1	16,5±1,1	6,5	6,4±1,9	29,2
эртапенем	25,0±0,0	0,0	22,8±0,4	1,8	16,4±4,9	29,8
имипенем	24,4±1,3	5,5	18,1±4,6	25,6	9,8±3,9	40,0
ципрофлоксацин	25,3±1,7	6,7	20,3±0,8	4,1	9,7±4,7	48,0
тигекцилин	18,4±0,7	4,0	16,0±0,7	4,6	14,1±0,5	3,5

Примечание: амокс/клавул – амоксициллин/клавуланат, тримет/сульфомет – триметоприм/сульфометоксазол, НК – нет категории.

В группе S и I зоны задержки роста культуры характеризовались как стабильные признаки. Резистентность *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам различалась уровнем устойчивости изолятов, в результате чего, в группе R значения измеренных диаметров сильно варьировали у большинства антибиотиков (за исключением ампициллина, цефотаксима, тигекцилина), что может указывать на различные механизмы и/или детерминанты резистентности.

Полирезистентные изоляты *K. pneumoniae*, характеризующиеся ассоциированной устойчивостью к 7 группам антибиотиков (цефалоспорином, аминогликозидам, фторхинолонам, ингибиторзащищённым и незащищённым аминопенициллинам, карбапенемам, глицилциклинам), были выявлены в количестве 11,7 % (21), к 6 группам (тот же набор, без карбапенемов и глицилциклинов) – 35,0 % (63).

Изоляты *A. baumannii* характеризовались значительной устойчивостью практически ко всем группам антибактериальных препаратов и их активность (за

исключением колистина) не превысила 40,0 %. Самая низкая чувствительность (не выше 15,0 %) *A. baumannii* отмечалась к меропенему, цефалоспорином (цефтазидиму и цефепиму), в том числе, ингибиторозащищённым (цефоперазон/сульбактам), фторхинолонам (ципрофлоксацину). Наиболее активной группой антимикробных препаратов оказалась группа аминогликозидов. Колистин – единственный антибиотик, к которому *A. baumannii* был восприимчив на 100,0 % (табл. 14).

Таблица 14. Чувствительность *A. baumannii* к антибиотикам

Антибактериальные препараты	Категория чувствительности					
	Ч		УР		Р	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Амикацин	30	17,0	0	0,0	147	83,0
Нетилмицин	58	32,8	НК		119	67,2
Гентамицин	41	23,2	НК		136	76,8
Тобрамицин	70	39,5	0	0,0	107	60,5
Меропенем	22	12,4	7	4,0	148	83,6
Имипенем	33	18,7	8	4,5	136	76,8
Цефтазидим	24	13,6	0	0,0	153	86,4
Цефепим	24	13,6	0	0,0	153	86,4
Ципрофлоксацин	25	14,1	НК		152	85,9
Цефоперазон/сульбактам	26	14,7	37	20,9	114	64,4
Полимиксин Е (колистин)	177	100,0	0	0,0	0	0,0
Тигециклин	103	58,2	23	13,0	51	28,8

Ч – чувствительные, УР – умеренно резистентные, Р – резистентные, НК – нет категории.

Изоляты *A. baumannii*, устойчивые к карбапенемам, дополнительно тестировались фенотипическими методами на продукцию MBL, но наличия этих ферментов не обнаружилось, что свидетельствовало об иных механизмах резистентности (рис. 34). В отношении *A. baumannii* определялась активность антибиотика тигециклина, который совсем недавно начал применяться в стационаре и его внедрение совпало с периодом нашего исследования (03.2012-03.2015). В результате, были выделены устойчивые к нему изоляты (рис. 35). В динамике изменение активности антибактериальных препаратов по этапам изучения представлено на рисунке 36.



Рисунок 34. Фенотипическое выявление MBL *A. baumannii* в тесте с антибиотиками: цефтазидимом (CAZ 30), меропенемом (MP 10), имипенемом (IMP 10) и ЭДТА (в центре)

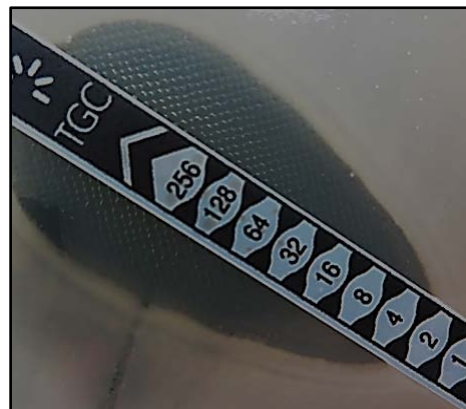


Рисунок 35. Определение чувствительности *A. baumannii* к антибиотiku тигециклину (TGC), методом E-тестов: МПК = 4 мг/л

Карбапенемы (меропенем, имипенем) сохраняли низкую активность против *A. baumannii* в течение всего периода изучения, и значительное её снижение на 15,2 % ($p < 0,001$) отмечалось у имипинема ко II периоду. Достоверно выросла устойчивость *A. baumannii* к цефалоспорином: цефтазидиму и цефепиму на 28,2 % ($p < 0,02$) от I ко II и на 24,7 % ($p < 0,04$) – от I к III периоду. Эффективность цефоперазон/сульбактама снизилась на 44,0 % во II периоде и сохранилась практически на том же уровне в III периоде ($p < 0,000$).

Резистентность к аминогликозидам постепенно нарастала и в конечном итоге увеличилась на 44,8 % ($p < 0,000$) у нетилмицина, 24,7 % ($p < 0,041$) – гентамицина, 60,3 % ($p < 0,000$) – тобрамицина. Устойчивость к тигециклину, включая умеренную резистентность, за весь изученный промежуток времени возросла на 38,5 % ($p < 0,000$).

Оценка значений диаметров ингибирования культуры антибиотиками показала, что в большинстве случаев в группах S, I, R зоны задержки роста культуры характеризовались как стабильные признаки с малым и умеренным варьированием. Исключением стали гентамицин и нетилмицин, которые характеризовались значительными отклонениями от среднего значения диаметра ингибирования в группе R и пределы изменения признака составили 10 мм и 9 мм, соответственно (табл. 15).

Периоды исследования

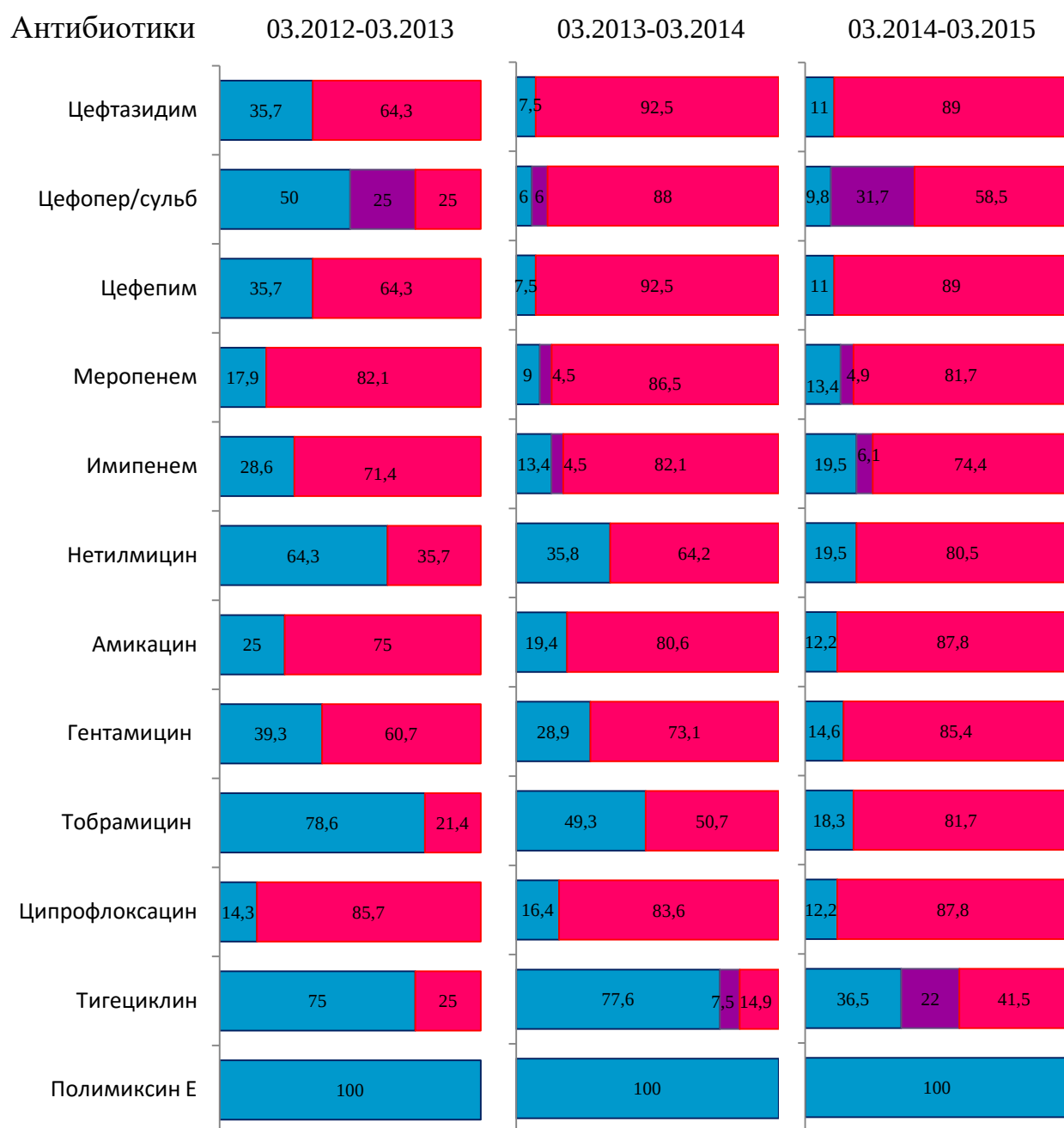


Рисунок 36. Динамика активности *A. baumannii* к антибиотикам по периодам изучения
 Примечание: ■ – чувствительные, ■ – умеренно устойчивые, ■ – устойчивые изоляты;
 цефопер/сульб – цефоперазон/сульбактам, значения внутри цветных полей указаны в процентах.

Полирезистентные изоляты *A. baumannii*, устойчивые одновременно к одному или нескольким представителям четырёх групп антибиотиков (карбапенемам, цефалоспорином, аминогликозидам, фторхинолонам) были выделены в количестве 41,8 % (74).

Таблица 15. Активность антибиотиков в отношении *A. baumannii* (диско-диффузионный метод)

Название антибиотика	Зона задержки роста, мм	Коэфф. вариации, %	Зона задержки роста, мм	Коэфф. вариации, %	Зона задержки роста, мм	Коэфф. вариации, %
	$\bar{x} \pm \sigma$	V	$\bar{x} \pm \sigma$	V	$\bar{x} \pm \sigma$	V
	чувствительные		умеренно резистентные		резистентные	
Амикацин	22,3±0,6	2,9	НК		7,4±2,2	29,9
Нетилмицин	19,4±2,1	10,7	НК		8,1±3,7	45,2
Гентамицин	19,7±1,5	7,6	НК		8,4±3,7	43,6
Меропенем	22,0±1,1	4,9	15,7±1,2	7,4	7,1±2,2	30,3
Имипенем	24,5±1,6	6,7	20,5±1,1	5,3	7,6±2,3	30,4
Цефтазидим	19,0±0,8	4,3	0,0±0,0	0,0	6,4±1,2	19,2
Цефепим	20,2±0,6	3,1	0,0±0,0	0,0	6,7±1,8	26,8
Ципрофлоксацин	22,0±0,8	3,7	НК		6,1±0,7	10,9
Цефопер/сульб	23,0±2,2	9,5	17,6±1,4	8,0	11,1±2,9	26,1

Примечание: цефопер/сульб – цефоперазон/сульбактам, НК – нет категории.

Фенотипические профили устойчивости различались в большей степени по 4 аминогликозидам (амикацину, гентамицину, нетилмицину, тобрамицину). Среди полирезистентных *A. baumannii* удалось выявить три устойчивых морфологических типа, имеющих различия в способности вызывать потемнение столбика мясо-пептонного агар (МПА) до коричневого оттенка и минимальные изменения в антибиотикограмме (табл. 16).

Таблица 16. Фенотипы антибиотикорезистентности *A. baumannii*

Фенотип	Количество	Потемнение столбика МПА	Тигецилин	Ципрофлоксацин	Цефтазидим	Цефоперазон/сульбактам	Амикацин	Гентамицин	Имипенем	Трим./сульфомет.	Меропенем	Нетилмицин	Тобрамицин	Полимиксин Е (колистин)	Цефепим
I	13	-	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
II	10	+	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
III	12	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R

Примечание: S – чувствительный; R – резистентный; «+» – положительная, «-» – отрицательная реакции, ципрофлос. – ципрофлоксацин, трим./сульфомет. – триметоприм/сульфаметоксазол.

Несмотря на низкую информативность фенотипирования МЛУ микроорганизмов, такой подход способствовал дифференциации госпитальных

штаммов *A. baumannii* между собой, что существенно облегчило надзор за их распространением в стационаре.

Активность антибактериальных препаратов в отношении *P. aeruginosa* представлена в таблице 17.

Таблица 17. Чувствительность *P. aeruginosa* к антибиотикам

Антибактериальные препараты	Категория чувствительности					
	Ч		УР		Р	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Тикарциллин	0	0,0	НК		193	100,0
Тикарциллин/клавуланат	25	13,0	НК		168	87,0
Пиперациллин	75	38,9	НК		118	61,1
Пиперациллин/тазобактам	81	42,0	НК		112	58,0
Цефтазидим	94	48,7	НК		99	51,3
Цефепим	93	48,2	НК		100	51,8
Меропенем	89	46,1	17	8,8	87	45,1
Имипенем	91	47,2	12	6,2	90	46,6
Амикацин	137	71,0	6	3,1	50	25,9
Гентамицин	137	71,0	НК		56	29,0
Тобрамицин	140	72,5	НК		53	27,5
Ципрофлоксацин	109	56,5	21	10,9	63	32,6
Полимиксин Е (колистин)	193	100,0	0	0,0	0	0,0

Примечание: Ч – чувствительные, УР – умеренно резистентные, Р – резистентные, НК – нет категории.

Анализ чувствительности *P. aeruginosa* к различным группам β -лактамов антибиотиков показал, что активность ингибиторозащищённого уреидопенициллина (пиперациллин/тазобактама), цефалоспоринов III (цефтазидима) и IV (цефепима) поколений, карбапенемов (меропенема, имипенема) минимально различалась, что не являлось достоверным ($p < 0,96$) и приближалась к 50,0 %. Наиболее эффективными антибиотиками в отношении *P. aeruginosa* были аминогликозиды. Доля восприимчивых изолятов к каждому антибиотику этой группы составила более 70,0 %. Самая низкая чувствительность *P. aeruginosa* наблюдалась к ингибиторозащищённому карбоксипенициллину – тикарциллин/клавуланату, тикарциллин без ингибитора вовсе не оказывал на микроорганизм какого-либо воздействия. Действие фторхинолона ципрофлоксацина на *P. aeruginosa*, было сопоставимо с действием β -лактамов. Колистин – единственный антибиотик, к которому микроб был восприимчив

на 100,0 %. Особое внимание уделялось карбапенемрезистентности изолятов *P. aeruginosa*, одной из причин которой стала продукция ферментов MBL. Присутствие этих лактамаз у бактерий сопровождалось резистентностью ко всем известным группам антибактериальных препаратов, за исключением колистина и высокими значениями МПК карбапенемов. Фенотипический скрининг *P. aeruginosa* на наличие MBL выявил их присутствие у 19,7 % (38) изолятов (рис. 37).



Рисунок 37. Фенотипическое выявление MBL *P. aeruginosa* в тесте с антибиотиками: цефтазидимом (CAZ 30), меропенемом (MP 10), имипенемом (IMP 10) и ЭДТА (диск без надписи).

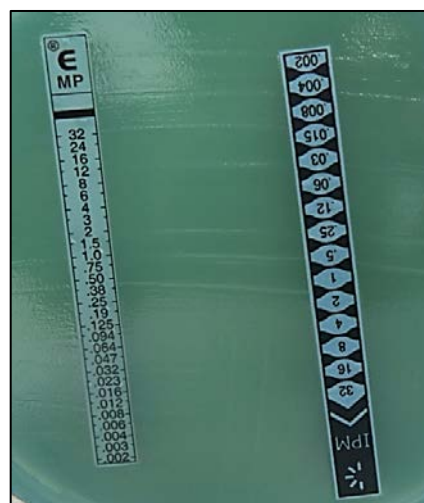
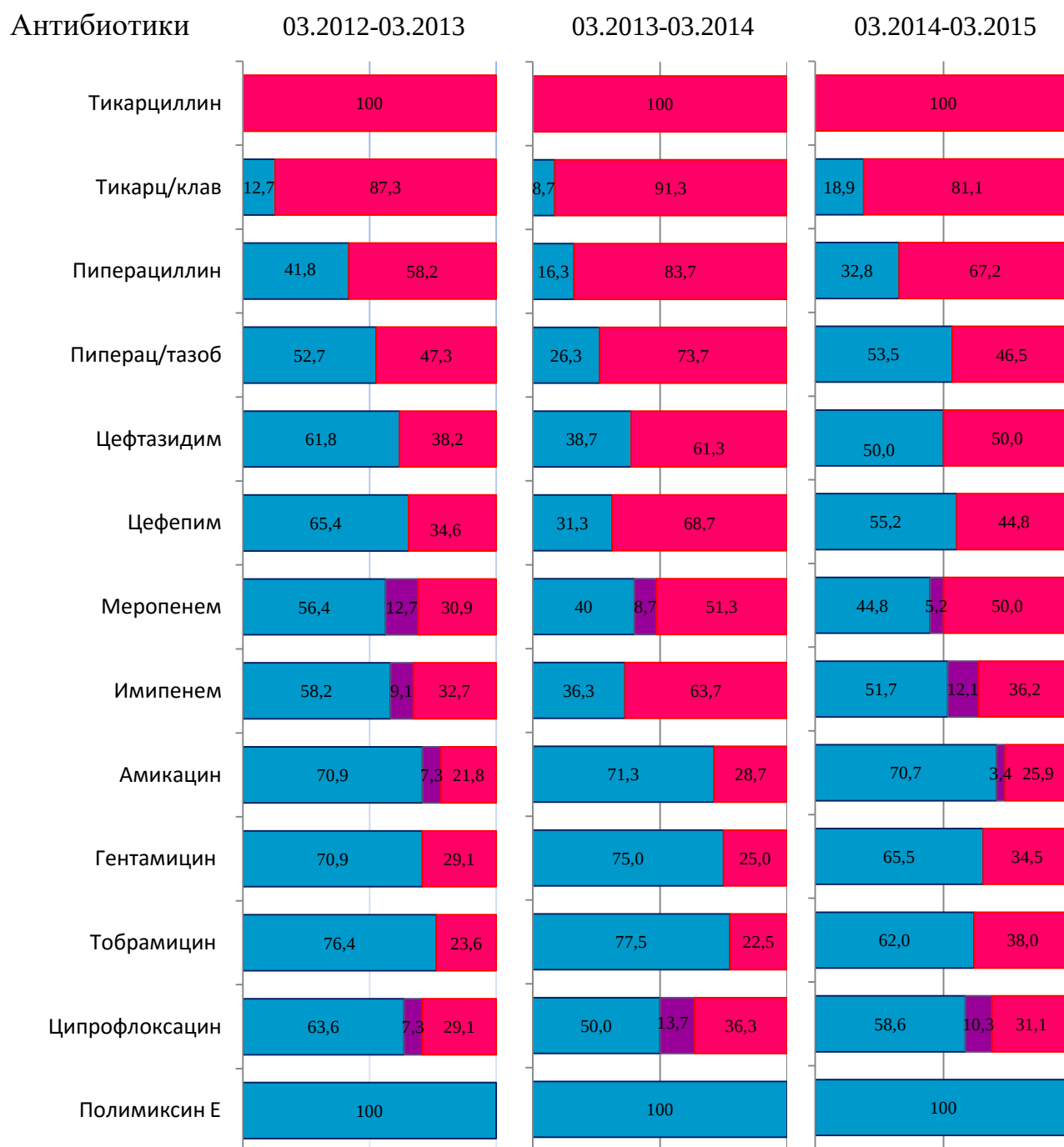


Рисунок 38. Определение чувствительности *P. aeruginosa* к антибиотикам меропенему (MP 10), имипенему (IMP 10) методом Е-тестов: МПК > 32 мг/л; окрашивные среды пигментом пиоцианином.

При этом определение уровня МПК карбапенемов с помощью Е-тестов показало его высокое значение не только у изолятов *P. aeruginosa*, продуцирующих MBL, но и тех, у которых резистентность к карбапенемам была обусловлена иными механизмами. Таким образом, постановка Е-тестов не несла дифференциальной информации о детерминантах устойчивости к данной группе антибиотиков, кроме того, продуценты MBL не обладали способностью синтезировать пигмент пиоцианин (рис. 38).

В динамике на протяжении трёх периодов исследования восприимчивость *P. aeruginosa* к основным антимикробным препаратам изменялась неодинаково (рис. 39).

Периоды исследования

Рисунок 39. Динамика активности *P. aeruginosa* к антибиотикам по периодам изучения

Примечание: ■ – чувствительные, ■ – умеренно устойчивые, ■ – устойчивые изоляты; Тикарц/клавул – тикарциллин / клавуланат; Пиперац/тазоб – пиперациллин/тазобактам; значения внутри цветных полей указаны в процентах.

Нарастание резистентности *P. aeruginosa* от I ко II периоду наблюдалось на 25,5 % к пиперациллину ($p < 0,032$), 26,4 % – пиперациллин/тазобактаму, 23,1 % – цефтазидиму ($p < 0,020$), 34,1 % – цефепиму ($p < 0,000$), 21,9 % – имипенему

($p < 0,032$). На диаграмме видно, что к III периоду произошло некоторое снижение устойчивости *P. aeruginosa* к этим антибиотикам, но достоверным оно было для пиперациллин/тазобактама ($p < 0,013$) и цефепима ($p < 0,024$).

Резистентность к тобрамицину выросла от II к III периоду на 15,5 % ($p < 0,046$). Остальные антибактериальные препараты (тикарциллин/клавуланат, меропенем, ципрофлоксацин, амикацин, гентамицин) отличались равномерным распределением чувствительных и устойчивых к ним изолятов по периодам изучения, а изменения в активности этих препаратов не были статистически значимы. Средние диаметры зон подавления роста *P. aeruginosa* антибиотиками в группе S и I относились к слабо варьирующим признакам с отклонениями в измерениях, не превышающими 3 мм от среднего значения, исключением стал цефепим с более высокой изменчивостью данного признака (табл. 18).

Таблица 18. Активность антибиотиков в отношении *P. aeruginosa* (диско-диффузионный метод)

Название антибиотика	Зона задержки роста, мм	Коэфф. вариации, %	Зона задержки роста, мм	Коэфф. вариации, %	Зона задержки роста, мм	Коэфф. вариации, %
	$\bar{x} \pm \sigma$	V	$\bar{x} \pm \sigma$	V	$\bar{x} \pm \sigma$	V
	чувствительные		умеренно		резистентные	
Тикарц/клавул	18,0±0,0	0,0	НК		8,0±3,5	44,3
Пиперац/тазобак	21,2±2,1	9,9	НК		12,2±4,3	35,8
Цефтазидим	20,9±2,9	14,1	НК		9,2±3,8	41,6
Цефепим	18,3±5,8	31,0	НК		11,4±5,5	48,4
Меропенем	25,5±1,5	5,9	20,7±1,7	8,2	8,1±3,1	38,2
Имипенем	23,7±0,2	3,5	18,1±0,2	1,0	10,7±3,0	28,4
Амикацин	20,2±1,6	7,7	15,8±0,7	4,7	9,3±2,4	25,7
Гентамицин	17,5±2,0	11,4	НК		7,3±2,7	36,4
Ципрофлоксацин	29,5±2,9	9,8	23,4±1,5	6,4	7,3±3,3	45,9

Примечание: тикарц/клавул – тикарциллин/клавуланат, пиперац/тазобак – пиперациллин/тазобактам, НК – нет категории.

В группе R ингибирование большинством антибиотиков данных изолятов сильно варьировало, что нашло отражение в измеренных диаметрах подавления роста культур. Среди всех препаратов, всего лишь, имипенем и амикацин в группе R отличались стабильностью измеряемых зон ингибирования.

Полирезистентность *P. aeruginosa* определялась в 23,8 % (46) случаев к основным группам антибиотиков, включая пенициллины с антисинегнойной активностью (пиперациллин, пиперациллин/тазобактам, тикарциллин, тикарциллин/клавуланат), цефалоспорины, карбапенемы, аминогликозиды, фторхинолоны, которые составили набор из 12 антимикробных препаратов. Из них 41,3 % (19) обладали ферментами MBL.

Вид *S. maltophilia* обладает природной резистентностью к карбапенемам, в результате чего, все выделенные бактериальные изоляты (83) показали 100% резистентность к меропенему и имипенему. Наиболее активными антибиотиками в отношении *S. maltophilia* оказался левофлоксацин, наименее активным – цефтазидим. Хлорамфеникол практически не используется в качестве терапевтического агента против грамотрицательных бактерий. При этом выявленный высокий уровень резистентности к хлорамфениколу, свидетельствовал об эффективности эффлюксного оттока у *S. maltophilia*, и в связи с этим, ограничении чувствительности ко многим антимикробным агентам (табл. 19).

Таблица 19. Чувствительность *S. maltophilia* к антибиотикам

Антибактериальные препараты	Категория чувствительности					
	Ч		УР		Р	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Тикарциллин/клавуланат	22	39,3	0	-	34	60,7
Цефтазидим	0	-	3	10,3	26	89,7
Триметоприм/сульфаметоксазол	49	59,0	6	7,2	28	33,7
Левофлоксацин	47	84,0	4	7,1	5	8,9
Ципрофлоксацин	55	66,3	9	10,8	19	22,9
Хлорамфеникол	18	32,2	4	7,1	34	60,7
Тигециклин	24	42,9	3	5,3	29	51,8

Примечание: Ч – чувствительные, УР – умеренно резистентные, Р – резистентные, НК – нет категории; абс. – абсолютное число изолятов бактерий.

Изменение активности антибактериальных препаратов по этапам изучения представлено на рисунке 40. Триметоприм/сульфаметоксазол сохранил активность более 50,0 % в отношении *S. maltophilia* в течение всего периода, а некоторое её увеличение в III периоде недостоверно ($p < 0,25$).

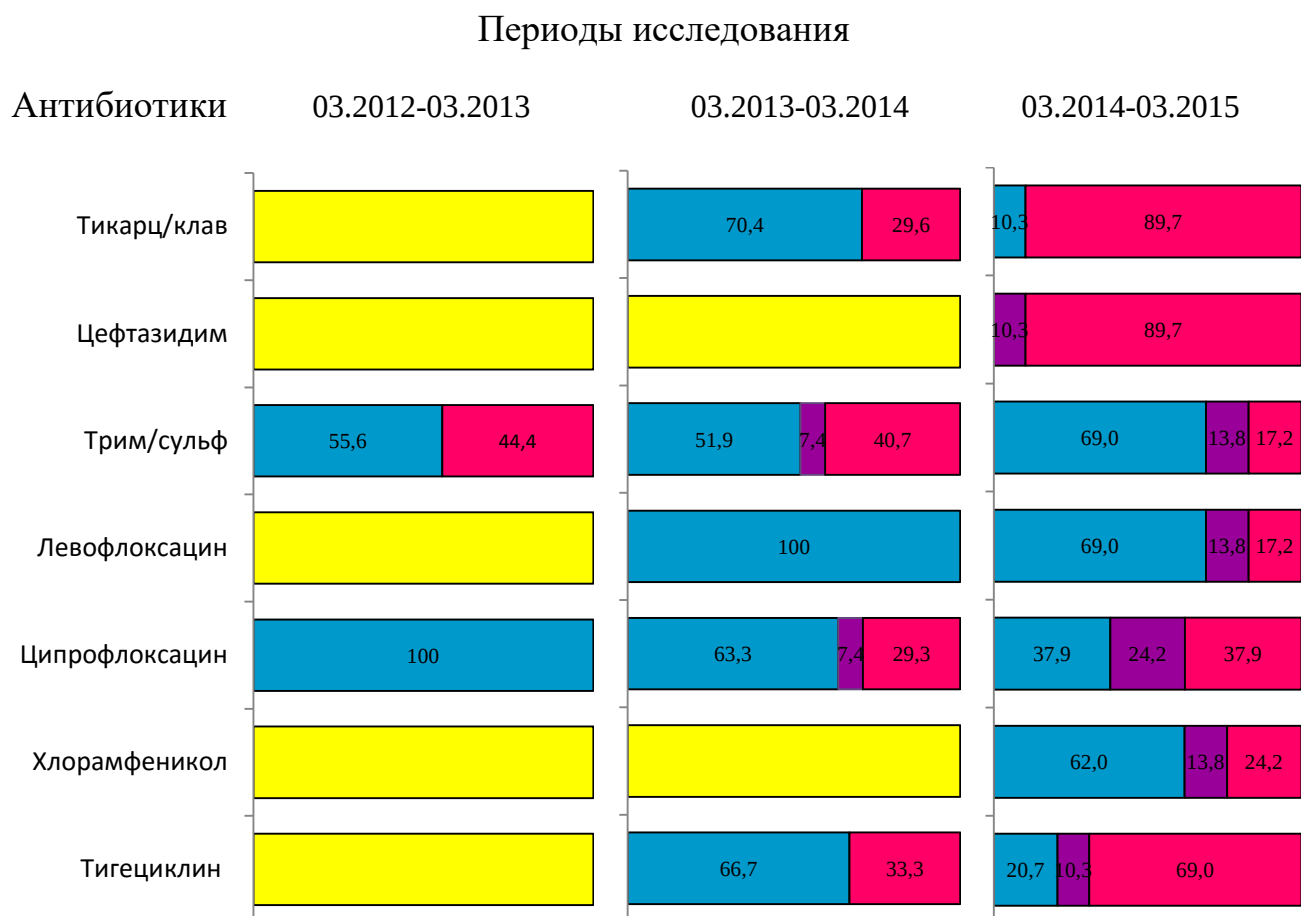


Рисунок 40. Динамика активности *S. maltophilia* к антибиотикам по периодам изучения
 Примечание: ■ – чувствительные, ■ – умеренно устойчивые, ■ – устойчивые изоляты; ■ – измерение не проводилось; тикарц/клавул – тикарциллин/клавуланат; трим/сульф. – триметоприм/сульфометоксазол, значения внутри цветных полей указаны в процентах.

За изученный промежуток времени устойчивость, включая умеренную, к левофлоксацину возросла на 31,0 % ($p < 0,011$); тигециклину – 46,0 % ($p < 0,000$); тикарциллин/клавуланату – 60,1 %. Эффективность ципрофлоксацина снизилась в 2,6 раза ($p < 0,008$) от I к III периоду. Оценка значений диаметров ингибирования культуры антибиотиками показала, что в большинстве случаев в группах S, I, R зоны задержки роста культуры характеризовались как стабильные признаки с малым и умеренным варьированием. Исключением стали ципрофлоксацин и левофлоксацин, которые характеризовались значительными отклонениями от среднего значения диаметра ингибирования в группе R, и пределы изменения признака составили 9 мм и 6 мм, соответственно (табл. 20).

Таблица 20. Активность антибиотиков в отношении *S. maltophilia* (диско-диффузионный метод)

Название антибиотика	Зона задержки роста, мм	Коэфф. вариации, %	Зона задержки роста, мм	Коэфф. вариации, %	Зона задержки роста, мм	Коэфф. вариации, %
	$\bar{x} \pm \sigma$	V	$\bar{x} \pm \sigma$	V	$\bar{x} \pm \sigma$	V
	чувствительные		умеренно		резистентные	
Трим/сульфомет.	23,5±14,2	17,8	13,7±1,9	13,8	6,5±0,5	7,7
Левифлоксацин	23,2±3,2	13,9	15,1±1,1	7,5	8,5±2,6	30,56
Ципрофлоксацин	24,5±2,8	11,5	18,7±1,1	5,8	10,8±3,4	31,7
Хлорамфеникол	24,3±3,6	14,7	13,8±1,1	7,71	9,1±2,0	22,0

Примечание: трим/сульфомет – триметоприм/сульфометоксазол, НК – нет категории.

Устойчивость к основным группам современных антибиотиков (ингибиторзащищённым пенициллинам, цефалоспорином III и IV поколений, аминогликозидам, фторхинолонам, карбапенемам) в различных комбинациях выявлена у всех четырёх изученных бактерий. Наибольшая частота встречаемости 41,8 % полирезистентных штаммов отмечена у *A. baumannii*. Различный уровень антибиотикорезистентности изученных микроорганизмов отражает прессинг применяемых антибиотиков в стационаре, а увеличение антибиотикоустойчивых штаммов *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. maltophilia* в пределах одного стационара в период 03.2012 – 03.2015 гг. – их распространение.

III. II. 2. Определение минимальных подавляющих концентраций антибиотиков и молекулярно-генетический анализ детерминант резистентности

Наиболее достоверная информация о формировании резистентных внутрибольничных субпопуляции бактерий и потенциальной эффективности используемых антибиотиков в стационаре может быть получена с помощью анализа распределения их МПК.

При определении МПК ампициллина выявлено мономодальное распределение изолятов *K. pneumoniae* ($M_o = 256$ мкг/мл) с образованием

устойчивой к этому антибиотику популяции (рис. 41а). МПК ингибиторзащищённых β -лактамов амоксициллин/клавуланата и тикарциллин/клавуланата также характеризовались наличием единственной моды для каждого антибиотика в категории «устойчивые», которая составила 128 мкг/мл и 256 мкг/мл, соответственно. Резистентность к ампициллину и незначительное (23,8 %) её восстановление при воздействии амоксициллин/клавуланата на *K. pneumoniae* свидетельствуют о наличии в популяции *K. pneumoniae* ингибиторрезистентных β -лактамаз, и в случае с клавуланатрезистентными β -лактамазами их встречаемость отмечена более чем у 76,0 % изолятов (рис. 41б, 41г). Распределение *K. pneumoniae* в соответствии с МПК пиперациллин/тазобактама носило бимодальный характер с $M_o = 4$ мкг/мл и $M_o = 64$ мкг/мл, что является признаком различия в популяции и, в данном случае, означало наличие как чувствительной, так и резистентной субпопуляций к данному препарату, соответственно (рис. 41в).

Мономодальный профиль МПК цефалоспоринов III поколения цефтазидима и цефотаксима и IV поколения (цефепима) показал однородность популяции *K. pneumoniae* по уровню приобретённой устойчивости к этим антибиотикам. Моды их МПК находились в высоких концентрациях препаратов и составили для цефтазидима и цефотаксима 256 мкг/мл, цефепима – 128 мкг/мл (рис. 41д, 41ж, 42а). Большая часть (85,7 %) *K. pneumoniae* несла ферменты ESBL, присутствие которых прослеживалось и на сопоставлении диаграмм распределения МПК незащищённых ингибитором цефалоспоринов и защищённых клавуланатом (цефтазидим/клавуланата, цефотаксим/клавуланата, цефепим/клавуланата) (рис. 41е, 41з, 42б). Для этих антибиотиков также наблюдалось мономодальное распределение их МПК, но находящееся в области низких концентраций антибиотиков, при этом клавулановая кислота ингибировала действие ESBL, снимая устойчивость *K. pneumoniae* к цефтазидиму и цефотаксиму.

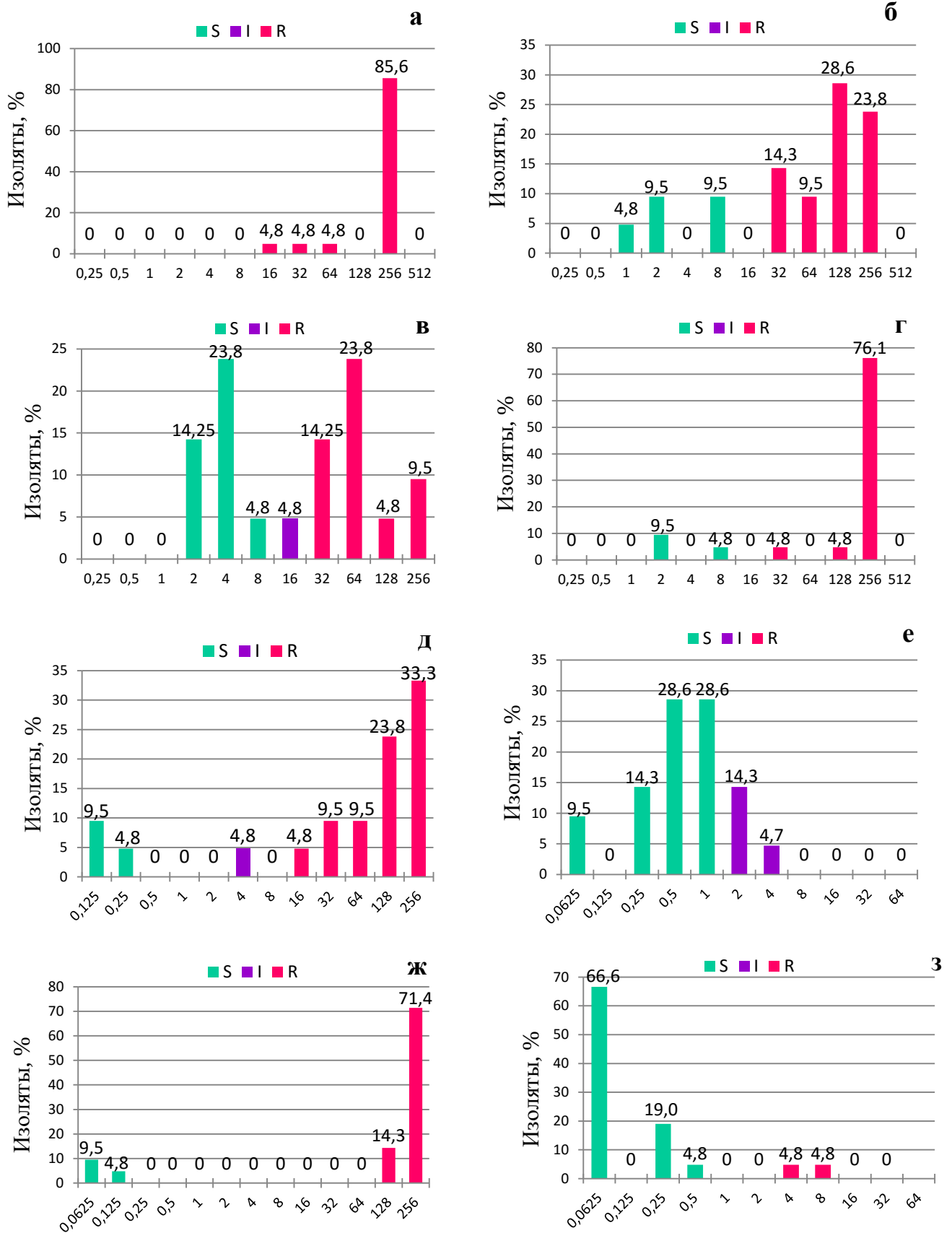


Рисунок 41. Распределение МПК (мкг/мл) антибиотиков: а – ампициллина, б – амоксициллин/клавуланата, в – пиперациллин/тазобактама, г – тикарциллин/клавуланата, д – цефтазидима, е – цефтазидим/клавуланата, ж – цефотаксима, з – цефотаксим/клавуланата в отношении изолятов *K. pneumoniae*; S – чувствительные, I – умеренно-резистентные, R – резистентные.

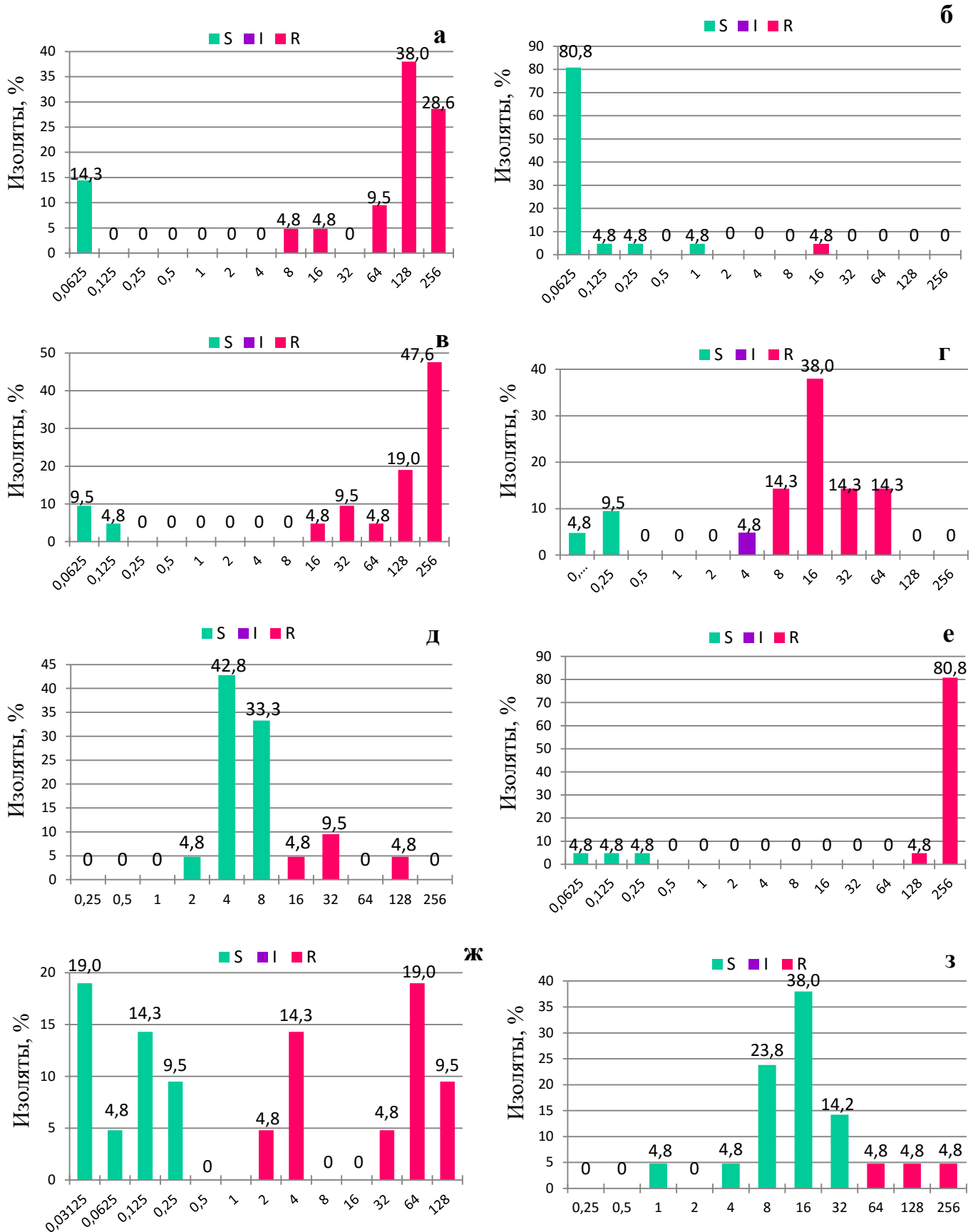


Рисунок 42. Распределение МПК (мкг/мл) антибиотиков: а – цефепима, б – цефепим/клавуланата, в – азтреонама, г – цефоперазон/сульбактама, д – цефокситина, е – цефтаролина, ж – ципрофлоксацина, з – фосфомицина в отношении изолятов *K. pneumoniae*; S – чувствительные, I – умеренно-резистентные, R – резистентные.

Мода цефтазидим/клавуланата составила 0,5 мкг/мл и 1,0 мкг/мл, цефотаксим/клавуланата – 0,0625 мкг/мл, что существенно ниже значений моды МПК незащищённых ингибитором одноимённых препаратов. МПК монобактама азтреонама, защищённого цефалоспорином цефоперазон/сульбактама, цефалоспорином V поколения цефтаролина в отношении *K. pneumoniae* характеризовались мономодальным распределением. Моды располагались в зонах высоких концентраций этих антибиотиков и составили 256 мкг/мл, 16 мкг/мл, 256 мкг/мл, соответственно (рис. 42в, 42г, 42е). Что касается цефокситина, МПК антибиотика в 80,0 % случаев находились в диапазоне концентраций, определяющих чувствительность к данному препарату, при этом единственная мода представлена концентрацией 4 мкг/мл (рис. 42д). По данным чувствительности *K. pneumoniae* к цефокситину, который используется для скрининга AmpC (МПК > 8 мкг/мл) у энтеробактерий, выявлена активность препарата в отношении 80,9 % изолятов, что свидетельствует о преобладании в популяции ферментов ESBL.

Распределение изолятов по МПК ципрофлоксацина ближе к мультимодальному, три вершины определили их моды: 0,03125 мкг/мл – бактериальные изоляты «дикого типа» с очень высоким уровнем чувствительности, 4 мкг/мл и 64 мкг/мл – с приобретённой устойчивостью (рис. 42ж). На диаграмме активности фосфомицина наблюдается единственная мода (16 мкг/мл) показателя МПК, находящегося в зоне предполагаемой чувствительности *K. pneumoniae* к препарату (рис. 42з). При этом следует отметить, что критерии чувствительности для *K. pneumoniae* не разработаны, поэтому для интерпретации результата взяты критерии для *E. coli*.

Анализ ингибирующих концентраций гентамицина, показал бимодальное распределение изолятов *K. pneumoniae* в зависимости от МПК антибиотика, что характеризовало популяцию как гетерогенную: одна субпопуляция – чувствительная (Мо = 0,25 мкг/мл), другая – устойчивая (Мо = 64 мкг/мл и Мо = 128 мкг/мл) (рис. 43б). Для амикацина распределение МПК было мономодальным с образованием популяции, где большая часть изолятов (95,2 %)

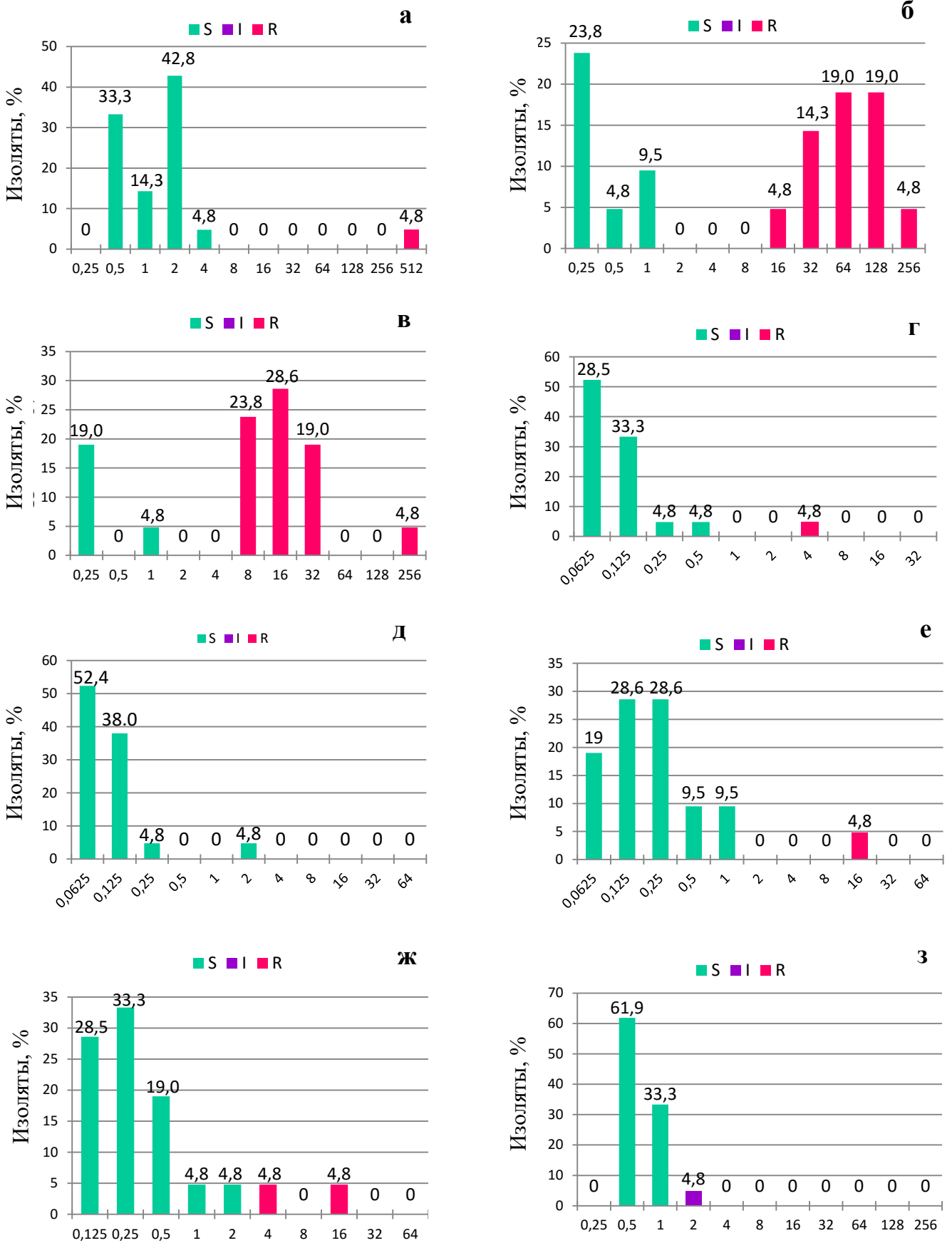


Рисунок 43. Распределение МПК (мкг/мл) антибиотиков: а – амикацина, б – гентамицина, в – тобрамицина, г – эртапенема, д – меропенема, е – имипенема, ж – колистина, з – тигециклина в отношении изолятов *K. pneumoniae*; S – чувствительные, I – умеренно-резистентные, R – резистентные.

была чувствительна к амикацину ($M_o = 2$ мкг/мл), для тобрамицина – ближе к бимодальному, при этом у большинства изолятов (76,2 %) МПК находились в области концентраций антибиотика ($M_o = 16$ мкг/мл), обуславливающих к нему устойчивость (рис. 43а, 43в).

По чувствительности к карбапенемам (эртапенему, меропенему, имипенему) мономодальное распределение МПК данных антибиотиков выявило гомогенность популяции *K. pneumoniae* по признаку восприимчивости к меропенему ($M_o = 0,0625$ мкг/мл), эртапенему ($M_o = 0,0625$ мкг/мл), имипенему ($M_o = 0,125$ мкг/мл, $M_o = 0,25$ мкг/мл) (рис. 43г-е). Несмотря на значительное преобладание «диких» по отношению к карбапенемам бактериальных фенотипов (более 95,0 %), выявлены изоляты устойчивые к эртапенему и имипенему. Это обстоятельство можно рассматривать как начало формирования резистентной к ним внутрибольничной субпопуляции. При этом молекулярно-генетический анализ не выявил ни одного из типов MBL (VIM, IMP, NDM), OXA и KPC β -лактамаз. Высокие значения МПК эртапенема и имипенема вероятно были обусловлены производством ESBL или AmpC в сочетании со снижением проницаемости внешней мембраны.

Мономодальное расположение МПК колистина и тигециклина в зонах низких концентраций характеризует однородность популяции *K. pneumoniae* по признаку чувствительности к этим препаратам. При этом мода колистина составляла 0,25 мкг/мл, мода тигециклина – 0,5 мкг/мл (рис. 43ж, 43з). В то же время, профиль МПК выявил изоляты с более высокими ингибирующими концентрациями, постепенно переходящими у колистина в категорию «устойчивые» и у тигециклина в категорию «умеренно устойчивые», что так же, как и в ситуации с карбапенемами свидетельствует о формировании госпитальных субпопуляций, резистентных к колистину и тигециклину.

Характер распределения МПК ингибиторзащищённого пенициллина ампициллин/сульбактама в отношении *A. baumannii* определялся как мономодальный ($M_o = 64$ мкг/мл) с преобладанием резистентных изолятов, а цефоперазон/сульбактама – бимодальный с модой 4 мкг/мл у «дикой»

субпопуляции и модой 64 мкг/мл – резистентной субпопуляции. Цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы подавляли рост *A. baumannii* только в высоких концентрациях (16 – 256 мкг/мл). На диаграммах при этом наблюдались мономодальные профили МПК антибиотиков, где мода цефепима составила 256 мкг/мл, азтреонама – 256 мкг/мл, дорипенема – 128 мкг/мл, меропенема – 128 мкг/мл, имипенема – 128 мкг/мл (рис. 44 г-з). Отличительной чертой МПК-профиля этих антибиотиков являлось совпадение их максимальных значений МПК с величиной моды для каждого антибактериального препарата, за исключением цефтазидима, у которого МПК-распределение было ближе к бимодальному и обе моды находились в диапазоне резистентности ($M_o = 64$ мкг/мл, $M_o = 256$ мкг/мл). Необходимо отметить, что 94,7 % (18) изолятов в качестве детерминанты резистентности несли гены фермента ОХА-40, что определило формирование популяции с приобретённой устойчивостью к β -лактамам антибиотикам, в том числе, и к карбапенемам. Локализованы гены ОХА-40 на плазмидах, которые легко распространились в популяции *A. baumannii*. Один изолят бактерии кроме ОХА-40 содержал в своём генетическом материале MBL VIM. Другие типы ферментов ОХА-23, ОХА-58 и MBL IMP и NDM не были обнаружены.

В зависимости от МПК тобрамицина в отношении *A. baumannii* выявлены чувствительная ($M_o = 0,25$ мкг/мл) и устойчивая ($M_o = 256$ мкг/мл) субпопуляции микроорганизма (рис. 45в). Для амикацина, гентамицина, ципрофлоксацина, левофлоксацина, триметоприм/сульфаметоксазола распределение их МПК показало мономодальный характер с соответствующими модами 512 мкг/мл, 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 32 мкг/мл, 16 мкг/мл, определяя преобладание приобретённых антибиотикоустойчивых фенотипов в популяции *A. baumannii* (рис. 45а, 45б, 45г-е). Единственным антибиотиком с одной модой МПК (0,5 мкг/мл), расположенной в «зоне» чувствительных изолятов, явился колистин (рис. 45ж). При определении МПК тигециклина выявлено две моды МПК, находящиеся на границе восприимчивости антибиотика и его резистентности ($M_o = 1$ мкг/мл и $M_o = 2$ мкг/мл) (рис. 45з).

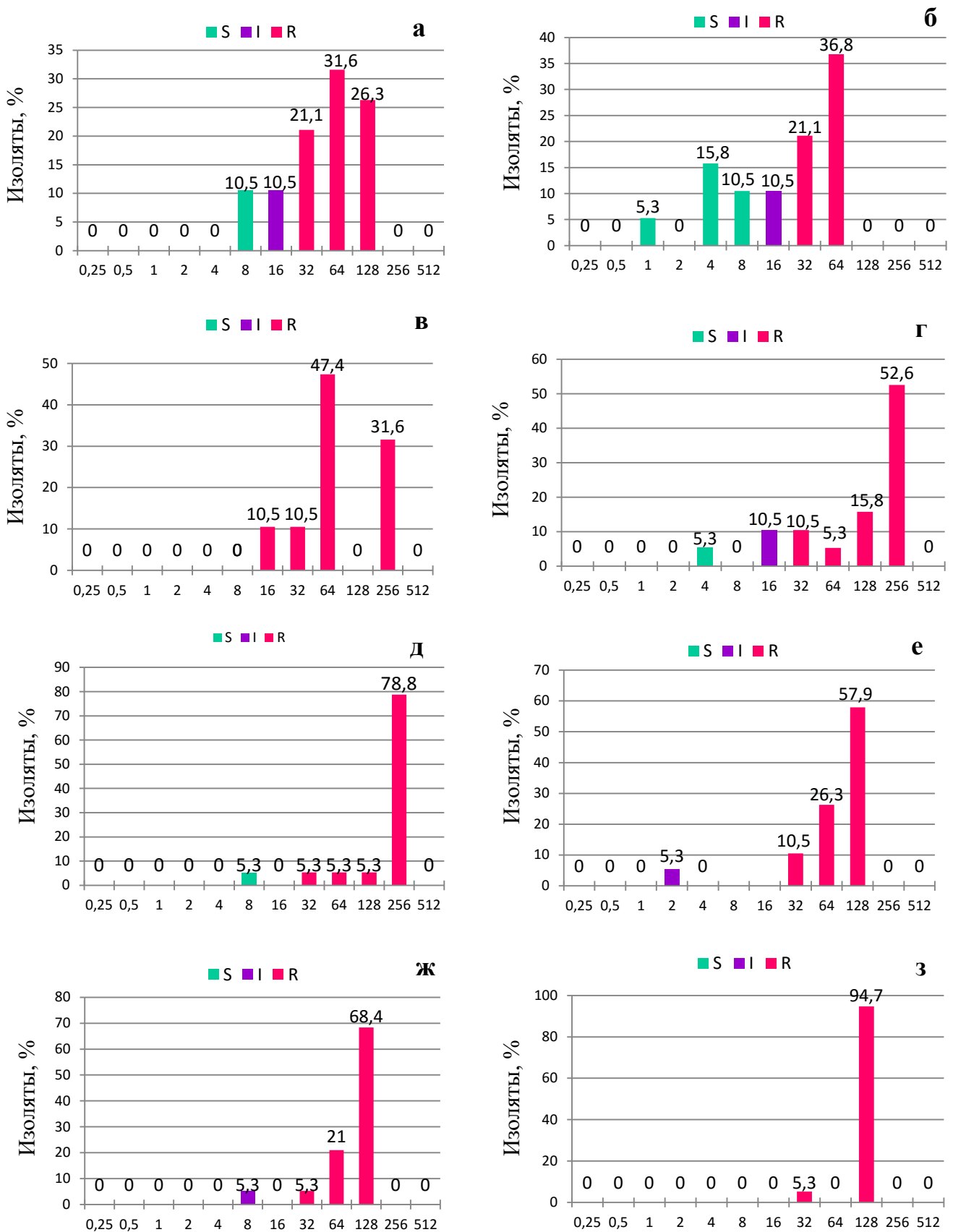


Рисунок 44. Распределение МПК (мкг/мл) антибиотиков: а – ампициллин/сульбактама, б – цефоперазон/сульбактама, в – цефтазидима, г – цефепима, д – азтреонама, е – дорипенема, ж – меропенема, з – имипенема в отношении изолятов *A. baumannii*; S – чувствительные, I – умеренно-резистентные, R – резистентные.

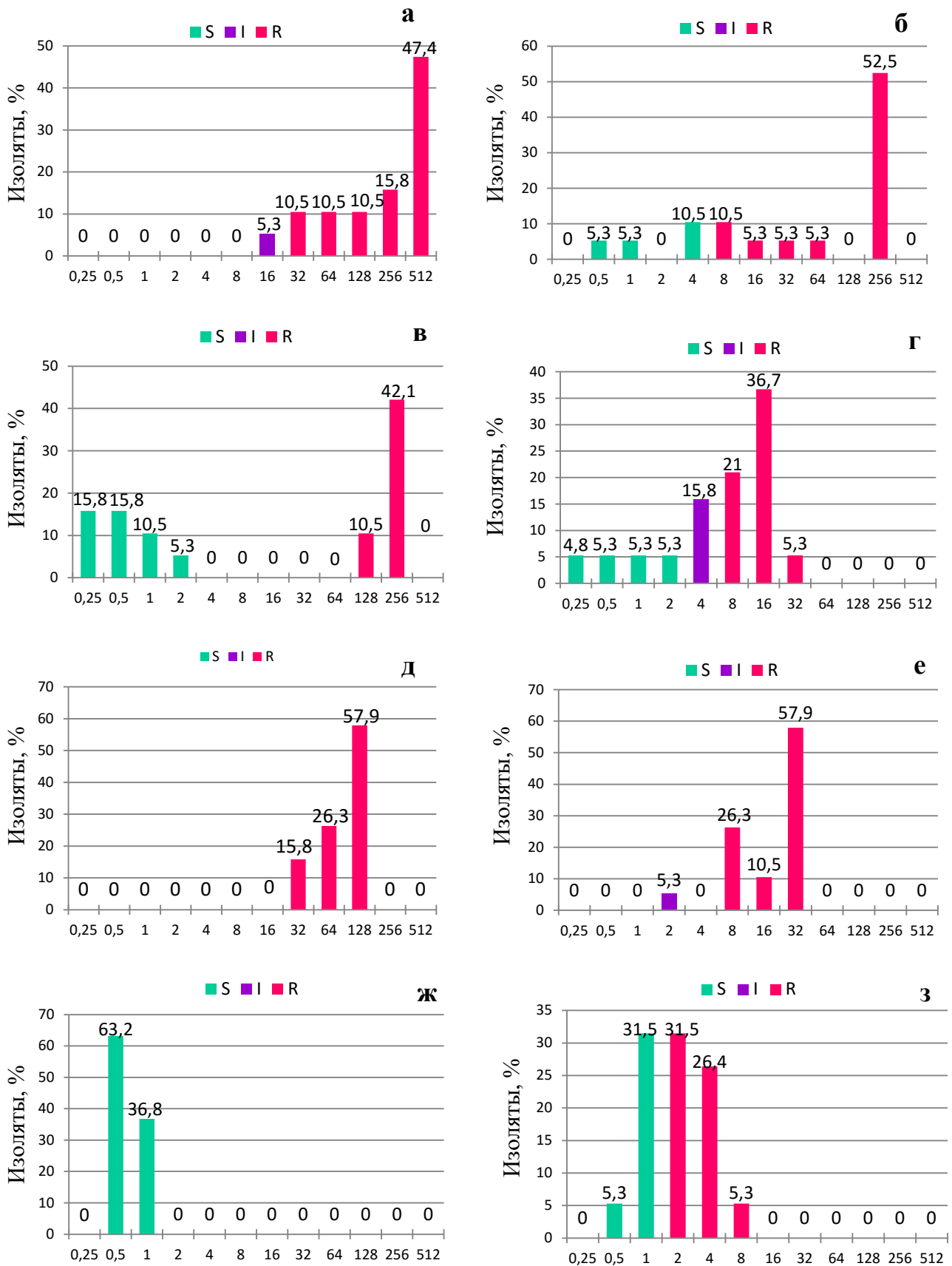


Рисунок 45. Распределение МПК (мкг/мл) антибиотиков: а – амикацина, б – гентамицина, в – тобрамицина, г – триметоприм/сульфаметоксазол, д – ципрофлоксацина, е – левофлоксацина, ж – колистина, з – тигециклина в отношении изолятов *A. baumannii*; S – чувствительные, I – умеренно-резистентные, R – резистентные.

МПК тигециклина большинства (31,5 %) чувствительных изолятов расположилась рядом с пограничным значением, что можно рассматривать как вероятность последующего роста устойчивости к препарату внутрибольничной популяции *A. baumannii*.

На приведенных диаграммах показано бимодальное распределение МПК по признаку чувствительности *P. aeruginosa* к аминогликозидам (рис. 46а-в). В результате чего, можно говорить о гетерогенности популяции микроорганизма по восприимчивости каждого антибиотика группы: амикацина, гентамицина и тобрамицина. Она обнаруживалась наличием 2 субпопуляций: с природным уровнем чувствительности и приобретённой устойчивостью. Мода (Мо) чувствительных изолятов к амикацину составила 4 мкг/мл, гентамицину – 2 мкг/мл, тобрамицину – 1 мкг/мл. Мода показателя резистентности для амикацина выявлена на уровне МПК 128 мкг/мл, гентамицина и тобрамицина – 256 мкг/мл.

В зависимости от различных МПК меропенема распределение изолятов *P. aeruginosa* также носило бимодальный характер, но одна субпопуляция – умеренно-устойчивая (Мо = 8 мкг/мл), а вторая – устойчивая (Мо = 128 мкг/мл) (рис. 46 д, е). Исходя из этого, можно предположить, что резистентность к меропенему одной части популяции находилась в сформированном состоянии, а другой – продолжала формироваться. В отличие от меропенема МПК имипенема характеризовались мономодальным распределением (Мо = 128 мкг/мл), что свидетельствовало о гомогенности бактериальных изолятов по данному признаку. При этом MBL были выявлены не у всех изолятов, показавших высокие МПК к карбапенемам; 38,9 % (7) *P. aeruginosa* несли MBL VIM, которые обусловили устойчивость ко всем антибиотикам, за исключением колистина.

Моды МПК в категории «чувствительные» к цефалоспорином цефтазидиму и цефепиму составили 2 мкг/мл и 4 мкг/мл, соответственно. При этом распределение МПК можно описать как мономодальное с преобладанием в популяции изолятов с приобретённой устойчивостью и равным количеством наиболее часто встречающейся МПК, которая у цефтазидима соответствовала 64 мкг/мл, цефепима – 16 мкг/мл (рис. 46 ж, з).

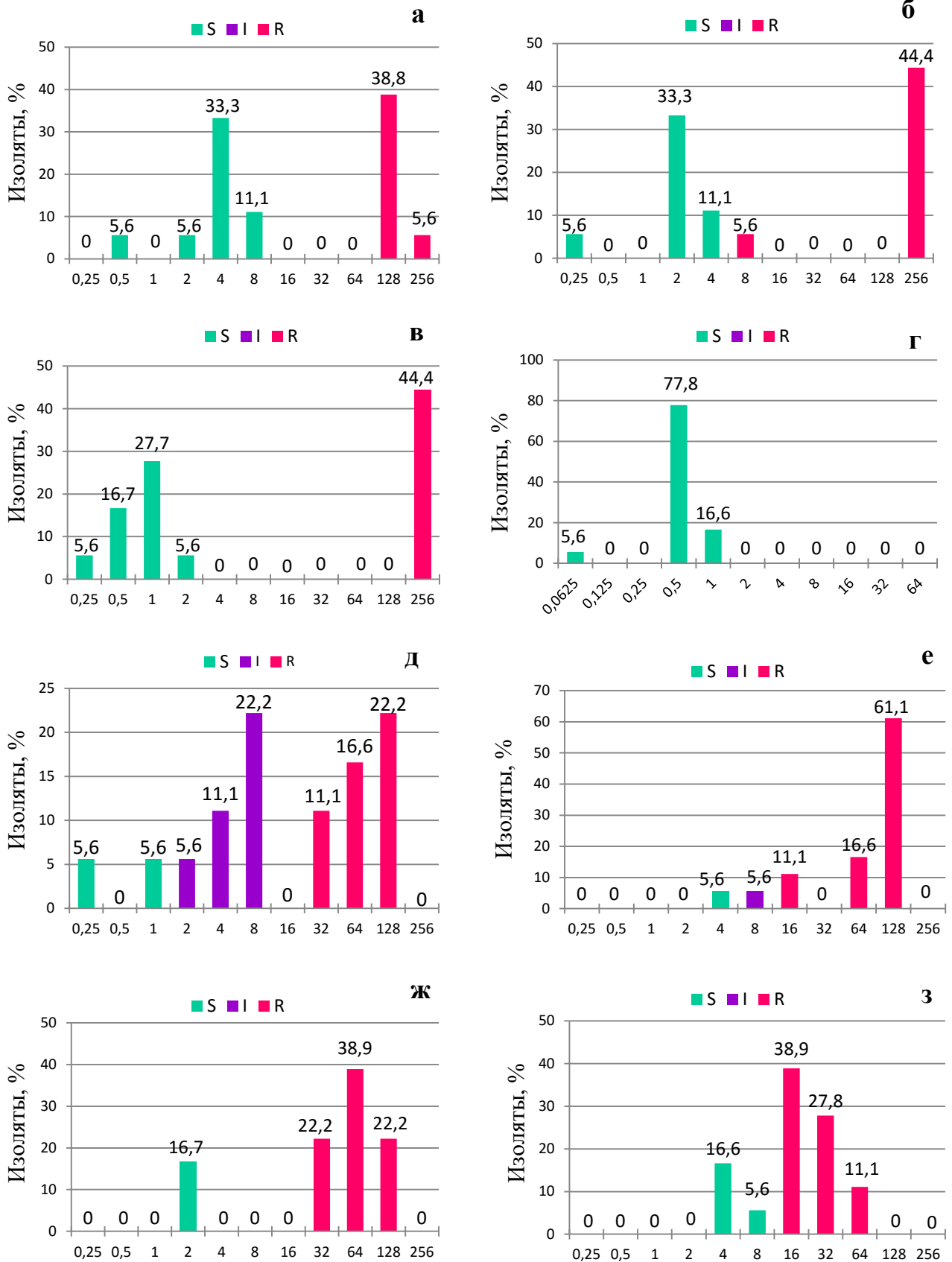


Рисунок 46. Распределение МПК (мкг/мл) антибиотиков: а – амикацина, б – гентамицина, в – тобрамицина, г – колистина, д – меропенема, е – имипенема, ж – цефтазидима, з – цефепима в отношении изолятов *P. aeruginosa*; S – чувствительные, I – умеренно-резистентные, R – резистентные.

Единственным препаратом с мономодальным профилем МПК, находящегося в спектре «чувствительные», являлся колистин ($M_o = 0,5$ мкг/мл) (рис. 46 г).

По признаку чувствительности к фторхинолонам (ципрофлоксацину, левофлоксацину) МПК-распределение показало неоднородность популяции *P. aeruginosa* и носило бимодальный характер (рис. 47 а-б). Мода резистентности как ципрофлоксацина, так и левофлоксацина составила 16 мкг/мл.

МПК пиперациллина и ингибиторзащищённых β -лактамов (пиперациллин/тазобактама, тикарциллин/клавуланата, цефоперазон/сульбактама) характеризовались наличием хорошо выраженных пиков в зоне категории «устойчивые», причём мода МПК пиперациллина, пиперациллин/тазобактама, тикарциллин/клавуланата в отношении преобладающей части популяции (более 70,0 %) *P. aeruginosa* составила 256 мкг/мл. Это свидетельствует об её однородности в отношении к данным антибиотикам и, возможно, наличию сходных механизмов резистентности (рис. 47 в-е).

Мономодальное расположение МПК азтреонама и фосфомицина в зонах высоких концентраций также характеризует гомогенность популяции *P. aeruginosa* по признаку приобретённой устойчивости к этим препаратам (рис. 47ж, 47з). На диаграмме МПК азтреонама наблюдается переход популяции *P. aeruginosa* от умеренно-устойчивой к устойчивой с постепенным увеличением МПК препарата. Мода показателя резистентности для азтреонама составила 64 мкг/мл, фосфомицина – 128 мкг/мл. Надо отметить, что у фосфомицина выявлено максимальное значение МПК 512 мкг/мл по сравнению со всеми изученными антибиотиками.

В отношении 4 изолятов *S. maltophilia* определены МПК цефтазидима, тикарциллин/клавуланата, ципрофлоксацина, левофлоксацина, триметоприм/сульфаметоксазола. Антибиотики с наименьшими значениями МПК – фторхинолоны и триметоприм/сульфаметоксазол, с наибольшими – β -лактамы. МПК тикарциллин/клавуланата свидетельствует о присутствии β -лактамаз, минимум у 3 изолятов, несмотря на их чувствительность *in vitro* к цефтазидиму (табл. 21).

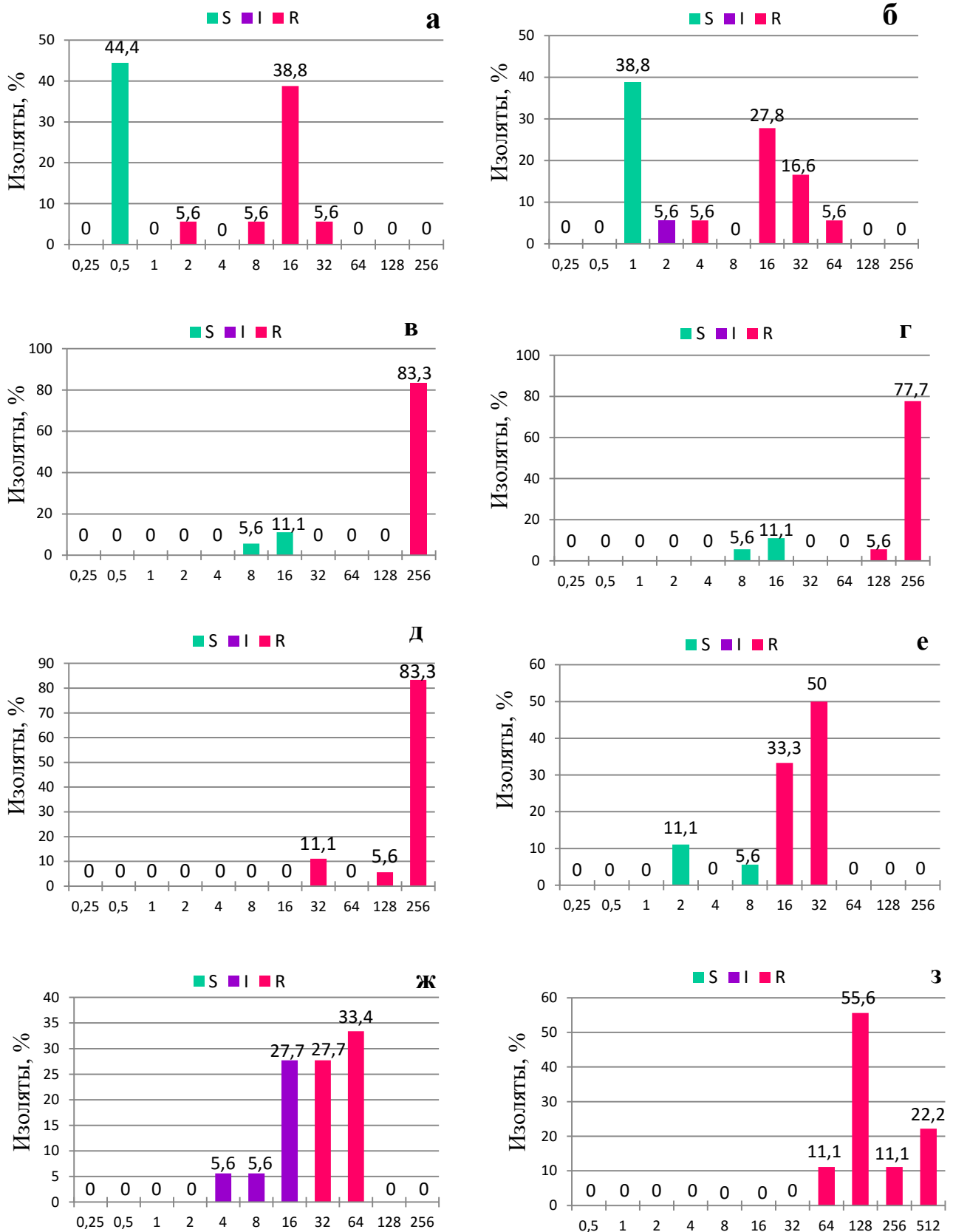


Рисунок 47. Распределение МПК (мкг/мл) антибиотиков: а – ципрофлоксацина, б – левофлоксацина, в – пиперациллина, г – пиперациллин/тазобактама, д – ткарциллин/клавуланата, е – цефоперазон/сульбактама, ж – азтреонама, з – фосфомицина в отношении изолятов *P. aeruginosa*; S – чувствительные, I – умеренно-резистентные, R – резистентные

Таблица 21. Распределение МИК антибиотиков в отношении изолятов *S. maltophilia*

Антибиотики	МПК, мкг/мл										
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
			Количество изолятов								
цефтазидим					3						1
тикар/клавул.							1	1		1	1
ципрофлоксацин			1	1		1	1				
левофлоксацин	1		1		4	1					
трим/сульфомет.		3		1							

Примечание: тикар/клавул. – тикарциллин/клавуланат трим/сульфомет –
 триметоприм/сульфометоксазол; – чувствительные, – умеренно устойчивые,
 – устойчивые.

Мониторинг антибиотикочувствительности клинических изолятов *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* показал высокий уровень их устойчивости к основным группам применяемых в настоящее время антибиотиков: ингибиторзащищенным и незащищенным пенициллинам, цефалоспорином, аминогликозидам, фторхинолонам, карбапенемам, глицилциклином. Бактериальные популяции каждого вида характеризовались гетерогенностью в отношении большинства антибактериальных препаратов, т.е. наличием двух субпопуляций, одна из которых обычно была восприимчива, другая устойчива к антибиотикам. Наличие последней свидетельствует о формировании внутрибольничной популяции бактерий с селективными преимуществами антибиотикорезистентности. В связи с этим, выявленные полирезистентные антибактериальные фенотипы с одинаковыми детерминантами резистентности служили подтверждением присутствия внутрибольничных штаммов среди представителей изученных видов, которые являлись потенциальной угрозой распространения в стационаре. Кроме того, в отношении подобных патогенов была показана неэффективность абсолютного большинства антибиотиков. Эти обстоятельства способствовали проведению исследования, направленного на выявление эфирных масел и их компонентов, активных против антибиотикоустойчивых *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*.

Глава IV. III. III. Исследование антибактериальных эффектов эфирных масел различного происхождения и их сочетанного действия с антибиотиками в отношении некоторых видов грамотрицательных бактерий

III. III. 1. Чувствительность *Stenotrophomonas maltophilia*

В проведённом исследовании эфирные масла розы, лаванды, пихты, эвкалипта, розового дерева, некоторых сортов мяты показали антибактериальную активность в отношении внутрибольничного возбудителя *S. maltophilia*, при этом было выявлено их бактерицидное и/или бактериостатическое действие. Первичный диско-диффузионный скрининг способности эфирных масел подавлять культуру *S. maltophilia* определил средние значения зон ингибирования изолята, которые находились в диапазоне 6,7 – 9,4 мм (рис. 48).



Рисунок 48. Чувствительность *S. maltophilia* к эфирным маслам: а) мяты сорта Заграва (З), б) мяты сорта Бергамотная (Б), в) лаванды.

Полученные значения можно рассматривать как стабильные характеристики, так как определено их умеренное варьирование (коэффициенты вариации $< 30\%$) для всех эфирных масел за исключением ЭМ эвкалипта (обр.1). Статистические результаты активности эфирных масел различного происхождения и компонентного состава в отношении *S. maltophilia* представлены в таблице 22. Дальнейшее изучение антибактериального действия эфирных масел включало определение их МПК, а также степени подавления ими роста *S. maltophilia* в различных концентрациях и соответствующих этим значениям продолжительности логарифмической фазы роста (лаг-фазы). В результате измерений уровня чувствительности *S. maltophilia* к ЭМ методом

кинетики роста микроорганизмов самая высокая активность в отношении бактерии среди мятных масел наблюдалась у сорта Прилукская карвонная, а его МПК находилась в концентрации 1,95 мкл/мл (рис. 49).

Таблица 22. Антибактериальная активность эфирных масел в отношении *S. maltophilia* (диско-диффузионный метод)

Название растений - продуцентов эфирного масла	Зона задержки роста, мм		Коэффициент вариации, % V
	lim	$\bar{x} \pm \sigma$	
Мята сорта Прилукская карвонная	6,0...10,0	7,7+1,8	23,7
Мята сорта Заграва	7,0...11,0	8,4+2,4	28,7
Мята сорта Бергамотная	6,0...11,0	7,8+1,2	10,6
Мята сорта Оксамитовая	7,0...15,0	8,5+1,8	21,7
Мята сорта Украинская перечная	6,0...8,0	6,7+0,6	8,9
Роза крымская	6,0...15,0	9,0+2,1	23,8
Роза болгарская	7,0...17,0	8,7+2,5	28,7
Пихта	6,0...9,0	9,3+2,4	25,6
Эвкалипт (образец 1)	7,0...16,0	9,0+2,8	31,0
Эвкалипт (образец 2)	6,0...13,0	7,8+1,8	22,8
Лаванда	7,0...12,0	8,0+1,5	18,2
Розовое дерево	7,0...13,0	9,4+1,7	18,0

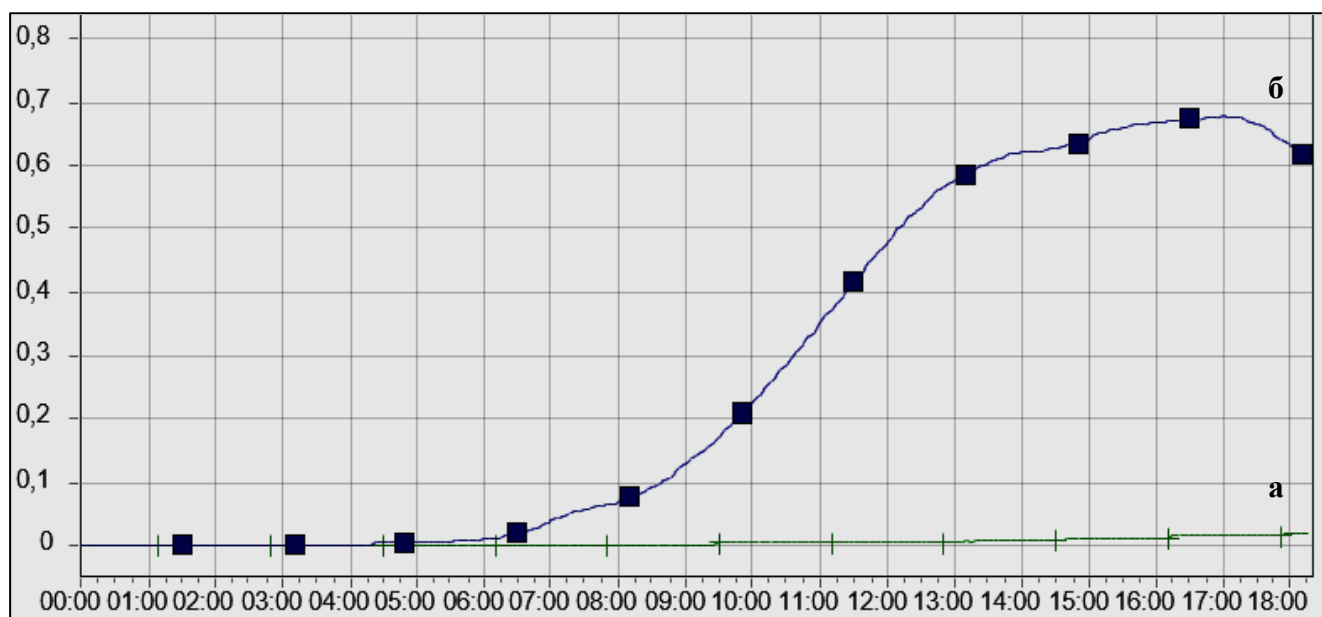


Рисунок 49. Кривые роста *S. maltophilia* в среде с эфирным маслом мяты сорта Прилукская карвонная в разведении 1:1024 – а; в среде без эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности, ось абсцисс – время в часах.

МПК остальных масел не менее чем в 2 раза превысили это значение и поэтому регистрировались в разведениях $\leq 1:256$ ($p < 0,000$). В меньших концентрациях масла мяты проявляли бактериостатическое действие (табл. 23).

Таблица 23. Антибактериальная активность мятных эфирных масел в отношении *S. maltophilia* (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Мятное эфирное масло различных сортов				
	Прилуцкая карвонная	Заграва	Бергамотная	Оксамитовая	Украинская перечная
	гибель бактериальных клеток ($\bar{x} \pm \sigma$), %				
3,9 (1:256)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1,95 (1:512)	100,0	52,3±1,7	20,3±2,0	41,6±3,2	28,0±1,4
0,97 (1:1024)	97,0±2,0	23,3±2,0	12,6±0,9	18,0±0,8	13,0±2,4
0,48 (1:2048)	56,6±3,3	13,3±1,2	0,0±0,0	7,6±1,2	0,0±0,0

Чувствительность *S. maltophilia* к ЭМ розы крымской была сопоставима с восприимчивостью изолята к ЭМ мяты карвонной. МПК эфирных масел эвкалипта, розового дерева и лаванды составили 3,9 мкл/мл, как и МПК большинства мятных масел. В бактериостатической концентрации 0,97 мкл/мл ЭМ эвкалипта по своей активности уступало только ЭМ розы крымской в 1,5 раза ($p < 0,01$). Наименее эффективным эфирным маслом, с точки зрения его антимикробного воздействия, показало себя ЭМ пихты, значение МПК которого находилось выше 3,9 мкл/мл и не менее чем в 2 раза превышало значения МПК всех изученных масел (табл. 24).

Таблица 24. Антибактериальная активность эфирных масел в отношении *S. maltophilia* (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Эфирное масло					
	роза крымская	роза болгарская	розовое дерево	лаванда	эвкалипт (обр. 1)	пихта
	Гибель бактериальных клеток, % ($\bar{x} \pm \sigma$)					
3,9 (1:256)	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	0,0±0,0
1,95 (1:512)	100,0±0,0	26,0±1,4	39,3±0,5	38,6±2,9	67,6±0,5	0,0±0,0
0,97 (1:1024)	83,25±4,0	14,7±0,5	29,75±5,1	31,6±1,2	55,7±4,5	0,0±0,0
0,48 (1:2048)	57,5±10,5	5,6±0,9	13,6,0±,09	12,3±0,5	25,3±7,5	0,0±0,0

Графические модели роста *S. maltophilia* под влиянием некоторых эфирных масел в разведении 1:1024 в сравнении с интактной культурой *S. maltophilia* представлены в порядке убывания их активности (рис. 50). Бактериостатическое действие изученных эфирных масел сопровождалось изменением длительности лаг-фазы роста бактерии в сторону её увеличения (табл. 25, табл. 26).

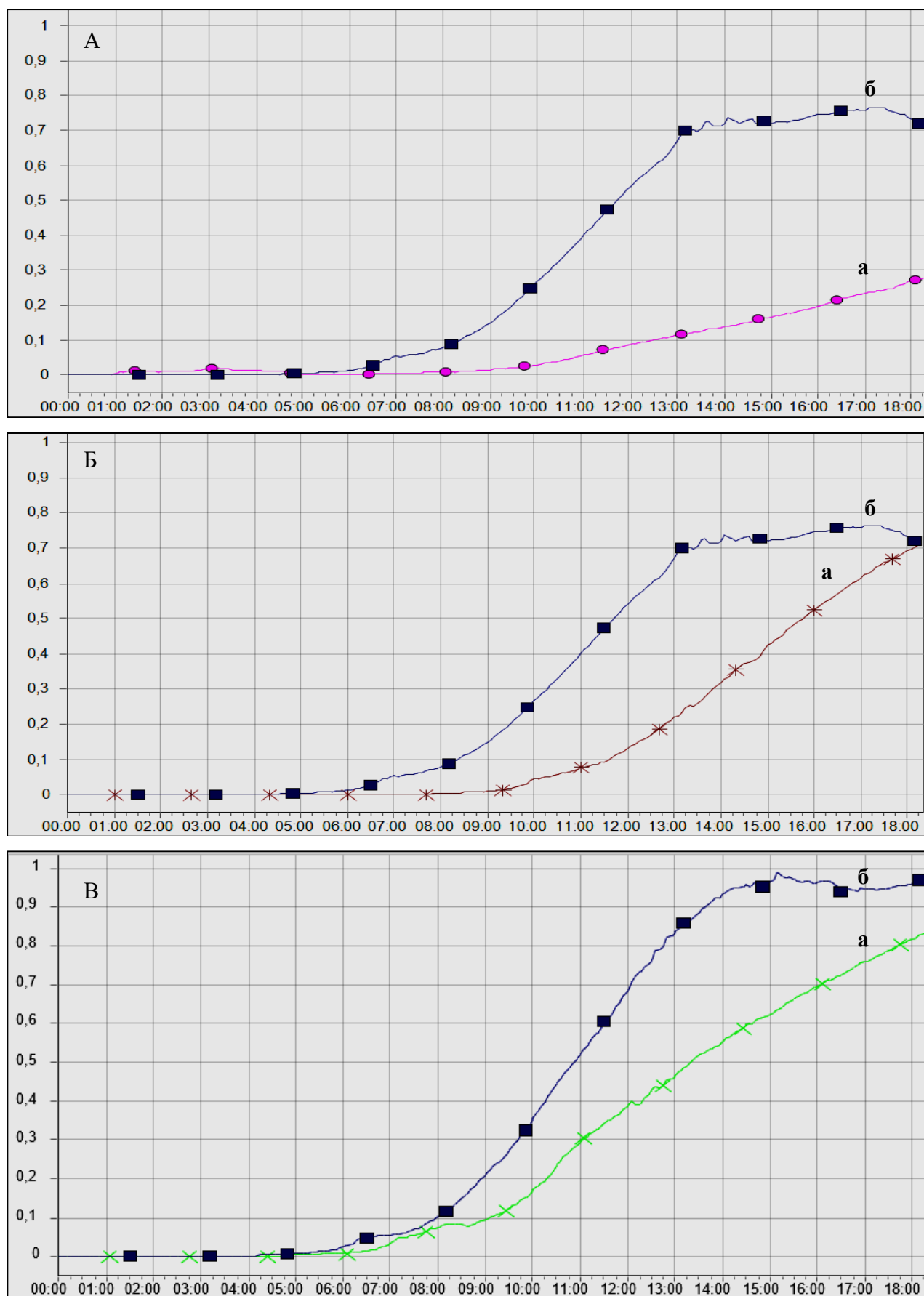


Рисунок 50. Кривые роста *S. maltophilia* в среде с эфирными маслами: розы крымской – А, эвкалипта – Б, лаванды – В в разведении 1:1024 – а; в среде без эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

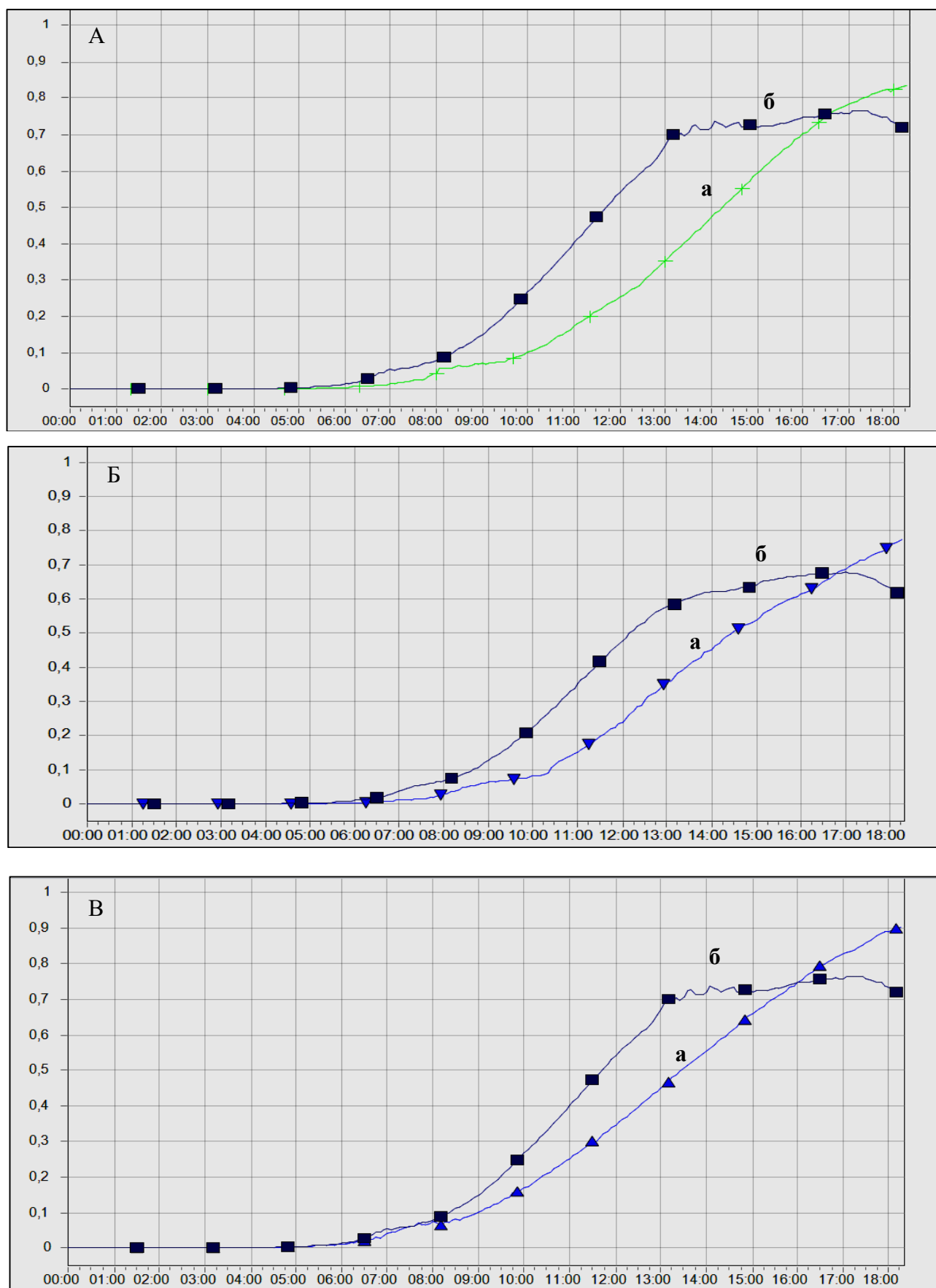


Рисунок 51. Кривые роста *S. maltophilia* в среде с эфирными маслами: розового дерева – А, мяты сорта Заграва – Б, розы болгарской – В в разведении 1:1024 – а; в среде без эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

Таблица 25. Время удлинения лаг-фазы роста *S. maltophilia* под влиянием мятных эфирных масел (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мл/см ³ (степень разведения)	Мятное эфирное масло различных сортов				
	Прилуцкая карвонная	Заграва	Бергамотная	Оксамитовая	Украинская перечная
	удлинение лаг-фазы, в минутах ($\bar{x} \pm \sigma$)				
1,95 (1:512)	-	176,6 $\pm$ 4,7	80,0 $\pm$ 4,0	98,3 $\pm$ 6,2	140,0 $\pm$ 7,0
0,97 (1:1024)	-	61,7 $\pm$ 2,4	41,7 $\pm$ 2,4	45,0 $\pm$ 0,0	73,3 $\pm$ 12,5
0,48 (1:2048)	125,0 $\pm$ 4,8	33,3 $\pm$ 2,4	21,7 $\pm$ 6,2	25,0 $\pm$ 7,0	30,0 $\pm$ 7,0

Таблица 26. Время удлинения лаг-фазы роста *S. maltophilia* под влиянием эфирных масел различного происхождения (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мл/см ³ (степень разведения)	эфирное масло					
	роза крымская	роза болгарская	розовое дерево	лаванда	эвкалипт (обр. 1)	пихта
	удлинение лаг-фазы, в минутах ($\bar{x} \pm \sigma$)					
1,95 (1:512)	-	86,7,3 $\pm$ 8,5	71,7 $\pm$ 4,7	171,25 $\pm$ 12,9	613,3 $\pm$ 30,0	38,3 $\pm$ 8,5
0,97 (1:1024)	195,6 $\pm$ 8,2	50,0 $\pm$ 8,2	33,3 $\pm$ 2,4	68,3 $\pm$ 11,8	210,0 $\pm$ 10,0	20,0 $\pm$ 5,0
0,48 (1:2048)	120,0 $\pm$ 35,0	25,0 $\pm$ 0,0	16,7 $\pm$ 2,4	38,3 $\pm$ 6,2	106,7 $\pm$ 22,5	0,0 $\pm$ 0,0

Прирост продолжительности лаг-фазы бактериостатического роста бактерии под воздействием различных ЭМ и их разведений был неодинаков, при этом показана значимая корреляция между временем, необходимым на удлинение лаг - фазы, и уровнем ингибирования *S. maltophilia* эфирными маслами в различных бактериостатических концентрациях ($R = 0,76$, $p = 0,006$; максимальные значения удлинения лаг-фазы). Таким образом, отсроченное вступление бактерии в стадию экспоненциального роста в среде с эфирными маслами может характеризовать их бактериостатическое действие наряду со степенью подавления роста бактерии, полученной при измерении.

Антибактериальные эффекты, оказываемые эфирными маслами на *S. maltophilia*, обусловлены входящими в них антимикробными компонентами. Некоторые из них были протестированы на способность к подавлению роста изолята *S. maltophilia*. Результаты данного исследования представлены в таблице 27. Индивидуальные соединения эфирных масел показали бактерицидное действие в концентрациях от 1,95 до 0,24 мкл/мл, в которых большинство масел либо оказывали бактериостатическое действие, либо не проявляли активность.

Таблица 27. Антибактериальная активность компонентов эфирных масел в отношении *S. maltophilia* (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мл/см ³ (степень разведения)	Компоненты эфирных масел				
	Ментол	β -фенилэтанол	Нерол	Линалоол	Цитраль
	Гибель бактериальных клеток, % ($\bar{x} \pm \sigma$)				
7,8 (1:128)	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
3,9 (1:256)	13,3 $\pm$ 1,2	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
1,95 (1:512)	8,0 $\pm$ 2,4	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
0,97 (1:1024)	3,3 $\pm$ 0,9	77,7 $\pm$ 6,6	100,0 $\pm$ 0,0	75,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
0,48 (1:2048)	0,0 $\pm$ 0,0	51,0 $\pm$ 5,35	51,0 $\pm$ 5,0	42,7 $\pm$ 0,5	100,0 $\pm$ 0,0
0,24 (1:4086)	0,0 $\pm$ 0,0	25,0 $\pm$ 0,0	25,0 $\pm$ 0,0	19,0 $\pm$ 0,7	100,0 $\pm$ 0,0

Монотерпеновый ациклический альдегид цитраль, входящий в состав минорных компонентов масел лаванды и розового дерева, показал наибольшую активность в отношении *S. maltophilia*. В концентрации 0,48 мкл/мл и 0,24 мкл/мл примерно в 2 и 4 раза, соответственно, он превысил степень подавления роста микроорганизма другими компонентами ($p < 0,000$) (рис. 52).

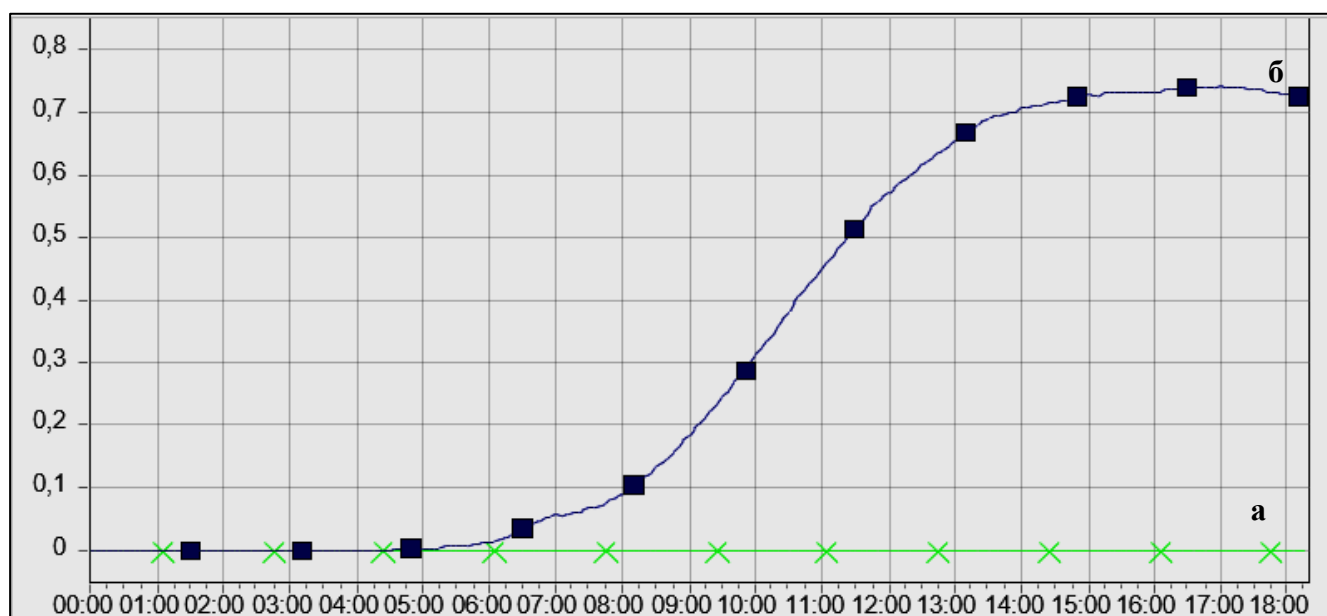


Рисунок 52. Кривые роста *S. maltophilia* в среде с цитралем в разведении 1:2048 – а; в среде без цитраля – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

По убыванию антимикробного воздействия без значимых различий ($p < 0,621$) за цитралем расположились терпеновый спирт нерол – один из основных компонентов розовых масел, фенольный основной компонент розовых масел – β -фенилэтанол, терпеновый спирт линалоол, входящий в состав масел

нементольных сортов мяты Оксамитовой и Бергамотной, лаванды. Ментол, составляющий основное индивидуальное соединение эфирных масел мяты сортов Заграва и Украинская перечная, показал самую незначительную эффективность в отношении *S. maltophilia*, которая не менее чем на 72,0 % была ниже антибактериальной активности прочих изученных компонентов ($p < 0,000$). Графические модели роста *S. maltophilia* под влиянием различных химических соединений, входящих в состав исследуемых эфирных масел, в сравнении с культуральным ростом *S. maltophilia*, представлены на рисунках 53, 54.

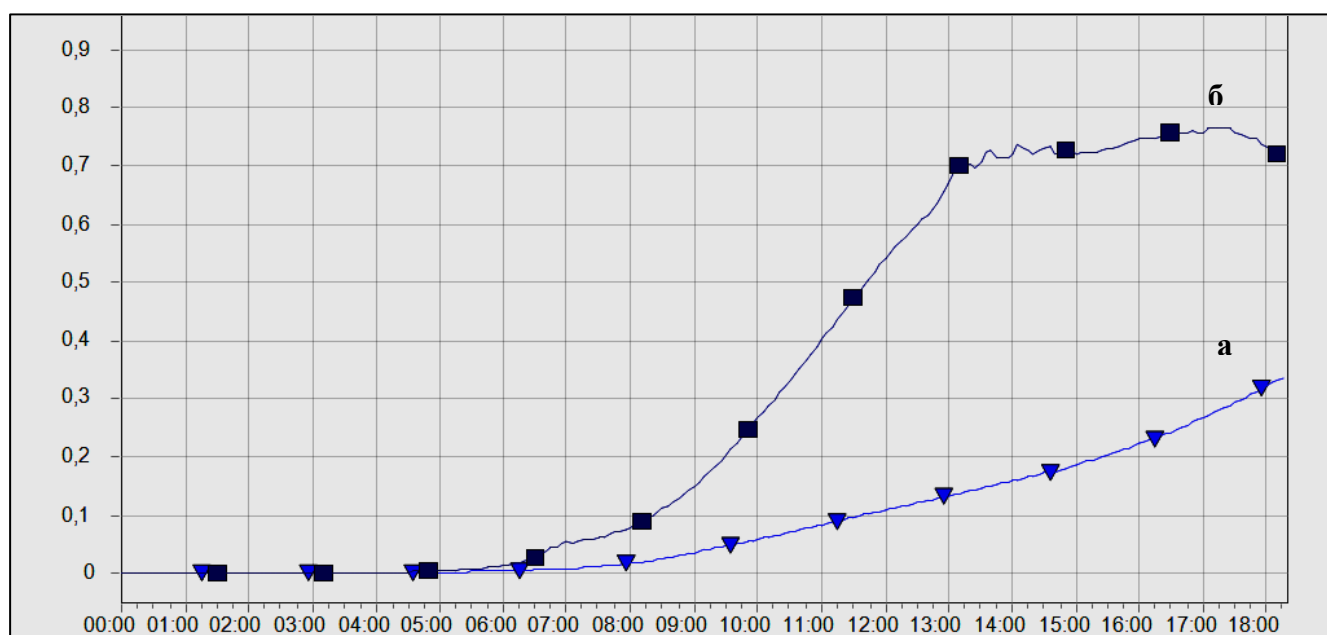


Рисунок 53. Кривые роста *S. maltophilia* в среде с компонентами эфирного масла: β -фенилэтанолам в разведении 1:1024 – а; в среде без компонентов эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

В состав каждого эфирного масла входят основные антимикробные компоненты, в различном процентном соотношении между собой. Взаимосвязь уровней преобладающих индивидуальных соединений в ЭМ со степенью подавления роста *S. maltophilia* была оценена как недостоверная ($R = 0,1$; $p = 0,79$). В то же время, на примере линалоола показано, что при содержании в эфирном масле этого вещества в количестве, превышающем 68,4 %, существует прямая зависимость подавления роста *S. maltophilia* от уровня линалоола в ЭМ ($R = 1,0$; $p < 0,05$). При более низкой концентрации линалоола в ЭМ как, например, у лавандового масла, его активность, тем не менее, отмечена на высоком уровне,

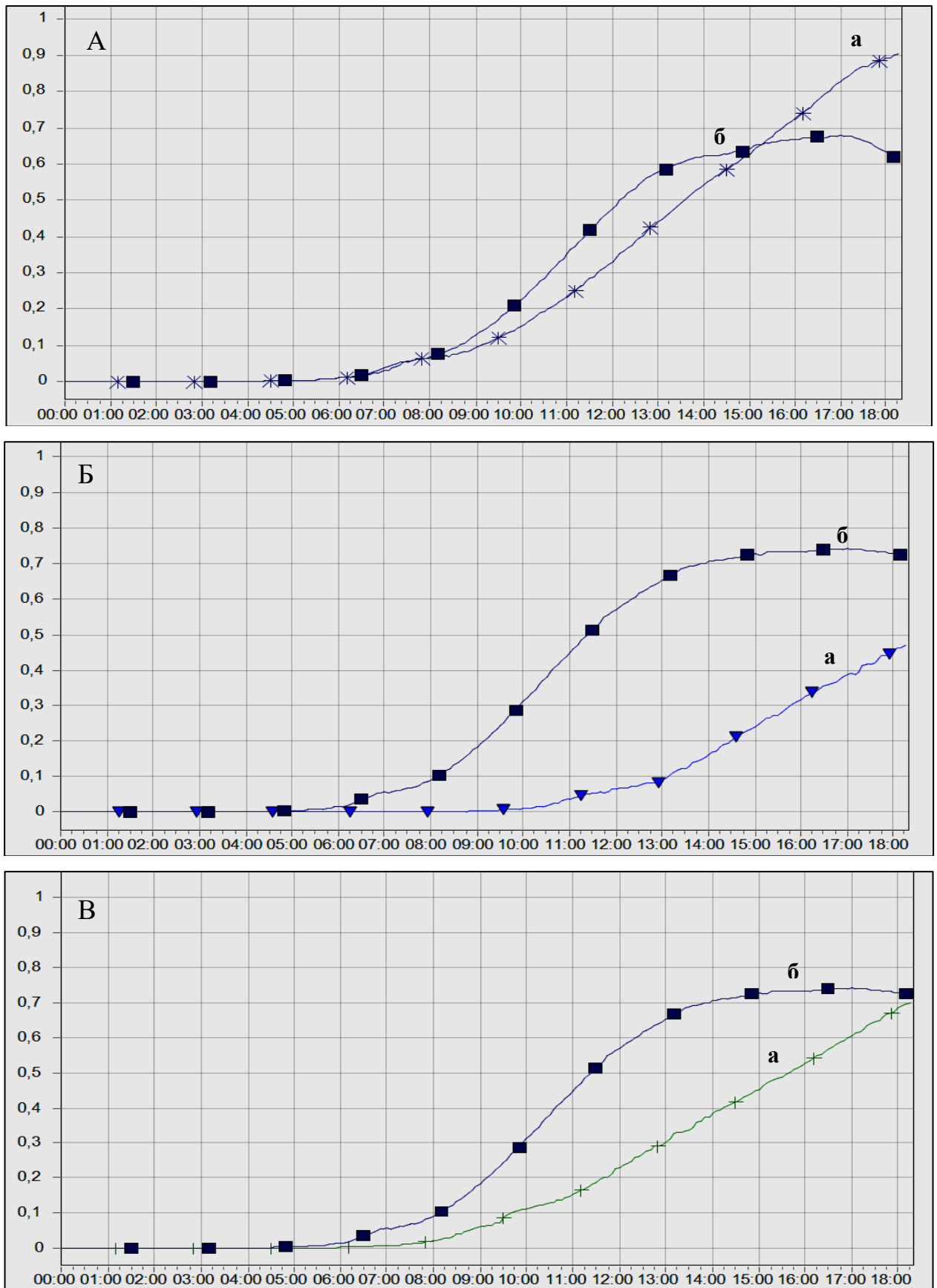


Рисунок 54. Кривые роста *S. maltophilia* в среде с компонентами эфирного масла: ментолом – А в разведении 1:1024, неролом – Б, линалоолом – В в разведении 1:2048 – а; в среде без компонентов эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

вероятно, за счёт минорных компонентов, в том числе, высокоактивного в отношении *S. maltophilia* цитраля, входящего в состав ЭМ лаванды (рис. 55).

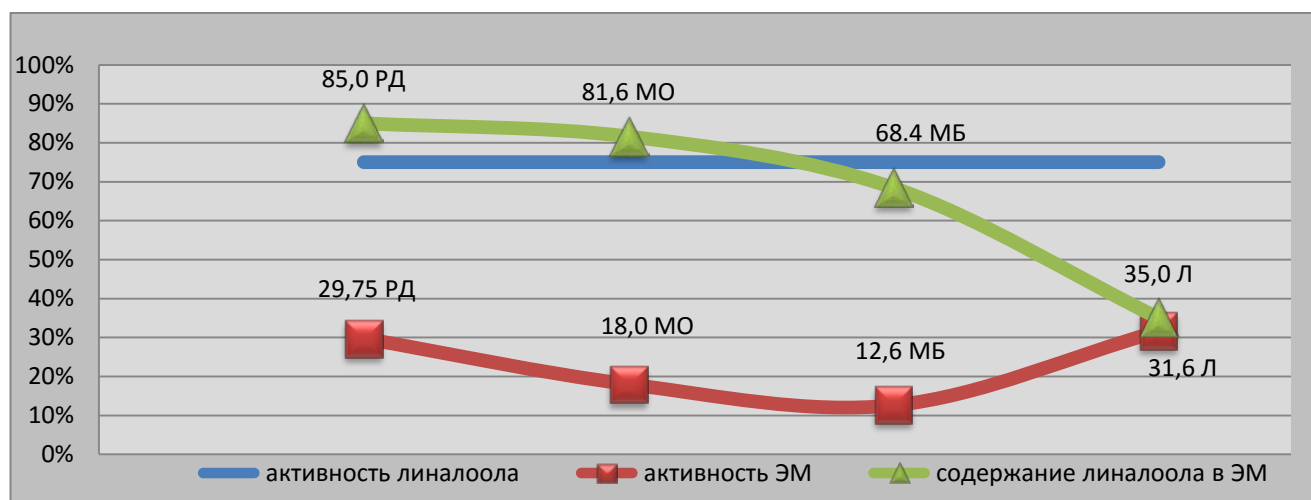


Рисунок 55. Активность эфирных масел розового дерева – РД, мяты Оксамитовой – МО, мяты Бергамотной – МБ, лаванды – Л в разведении 1:1024 в отношении *S. maltophilia* в зависимости от содержания в них линалоола (контроль – активность линалоола).

Антибактериальная активность ЭМ и отдельных компонентов в отношении *S. maltophilia* была изучена не только как самостоятельных субстратов, но и в сочетании с антибиотиками: левофлоксацином, тигециклином, хлорамфениколом, триметоприм/сульфаметоксазолом, тикарциллин/клавуланатом. Взаимодействие между ЭМ и антибактериальными препаратами либо уменьшало, либо усиливало их противомикробное действие. Полученные данные по совокупной активности данных субстанций в отношении *S. maltophilia* представлены в приложении Г и таблице 28. Изменение антимикробного действия антибиотиков определялось в сочетании со всеми изученными эфирными маслами, но достоверные различия в активности антибактериальных препаратов в результате взаимодействия с ЭМ отмечались не во всех случаях. Комбинации ЭМ лаванды, мяты Бергамотной, эвкалипта (обр. 1) с триметоприм/сульфаметоксазолом на 57,3 %, 45,0 %, 26,6 %, соответственно, уменьшили диаметр ингибирования культуры *S. maltophilia* антибиотиком ($p < 0,001$), сочетания триметоприм/сульфаметоксазола с остальными эфирными маслами – менее чем на 22,5 %, что в сравнении с соответствующим значением антибиотика незначимо ($p < 0,525$).

Таблица 28. Антибактериальная активность антибиотиков и их сочетаний с эфирными маслами в отношении *S. maltophilia*

Зоны задержки роста антибиотиков и их сочетаний с эфирными маслами, мм ($\bar{x} \pm \sigma$)							
Мята Бергамотная + SXT	Эвкалипт + SXT	Лаванда + SXT	Эвкалипт + TGC	Лаванда + TGC	Розовое дерево + TIM	Мята Украинская Перечная + С	Роза крымская + С
12,0±4,6	16,0±1,0	9,3±0,5	18,3±0,5	17,0±0,0	18,5±0,5	11,0±2,0	12,5±0,5
SXT			TGC		TIM	С	
21,8±3,0			24,7±2,1		11,0±0,6	7,9±0,8	

Примечание: SXT – триметоприм/сульфаметоксазол, TGC – тигециклин, TIM – тикарциллин/клавуланат, С – хлорамфеникол

Взаимодействие сочетаний тигециклина, левофлоксацина (4 из 7) и тикарциллин/клавуланата (3 из 7) с ЭМ также уменьшали зоны ингибирования изолята. Ослабление действия тигециклина произошло под влиянием эфирных масел лаванды на 31,2% и эвкалипта (обр. 1) на 26,0 % ($p < 0,043$) (рис. 56).

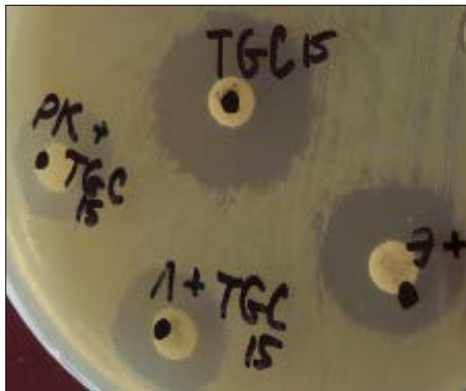


Рисунок 56. Чувствительность *S. maltophilia* к антибиотику тигециклину (TGC 15) и комбинациям: роза крымская (РК) + тигециклин (РК+TGC15); лаванда + тигециклин (Л+TGC15); эвкалипт (Э) + тигециклин (Э+TGC15).

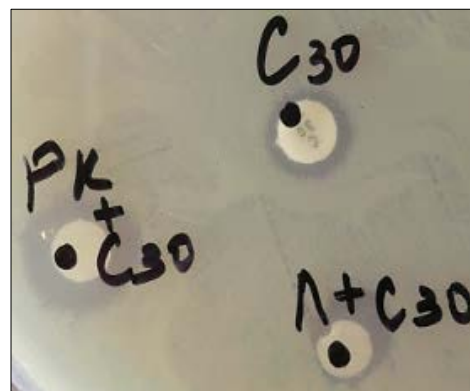


Рисунок 57. Чувствительность *S. maltophilia* к антибиотику хлорамфениколу (С 30) и комбинациям: роза крымская (РК) + хлорамфеникол (РК + С 30); лаванда (Л) + хлорамфеникол (Л + С 30).

Остальные сочетания ЭМ с данными антибиотиками показали недостоверное снижение эффективности тигециклина, которое составило менее 19,0 % ($p < 0,686$), левофлоксацина – 25,5% ($p < 0,646$), тикарциллин/клавуланата – 9,1 % ($p < 0,892$).

Комбинации хлорамфеникола, тикарциллин/клавуланата (4 из 7) и левофлоксацина (2 из 7) с эфирными маслами увеличили зоны ингибирования изолята *S. maltophilia* антибиотиками. Максимальное усиление антибактериального эффекта хлорамфеникола против *S. maltophilia* проявили ЭМ розы крымской и мяты сорта Украинская перечная на 58,2 % и на 39,2 %, соответственно ($p < 0,048$), тикарциллин/клавуланата – ЭМ розового дерева на 68,2 % ($p < 0,000$), превысив первоначальные значения зон ингибирования данными антибиотиками (рис. 57). Сочетания прочих изученных ЭМ с антибиотиками показали недостоверное усиление антимикробного эффекта хлорамфеникола, которое составило менее 35,5 % ($p < 0,519$), левофлоксацина – 15,5% ($p < 0,769$), тикарциллин/клавуланата – 13,0 % ($p < 0,842$).

Комбинации антибактериальных препаратов с ЭМ, которые имеют различное происхождение и компонентный состав, привели к аналогичным результатам взаимодействия, определив, в большинстве случаев, для одних и тех же антибиотиков усиление, а для других – ослабление антимикробного эффекта. Можно предположить, что активные химические соединения каждого эфирного масла в отдельности действуют на одинаковые мишени в бактериальной клетке, что и определило общую тенденцию их взаимодействия с антибиотиками. Эффлюксные системы *S. maltophilia*, играют исключительную роль в антибиотикорезистентности этой бактерии ко многим препаратам, в том числе, к хлорамфениколу, тикарциллин/клавуланату, левофлоксацину. В проведённом исследовании антимикробные компоненты, входящие в состав различных эфирных масел, возможно, уменьшили активное выведение этих антибиотиков из клеток *S. maltophilia*, что и усилило наблюдаемый антимикробный эффект.

III. III. 2. Чувствительность *Acinetobacter baumannii*

В отношении внутрибольничного полирезистентного *A. baumannii* было выявлено бактерицидное и/или бактериостатическое действие эфирных масел мяты различных сортов, розы, лаванды, пихты, эвкалипта, розового дерева, а также

отдельных компонентов, входящих в их состав. Средние значения зон ингибирования бактериальной культуры *A. baumannii* под влиянием ЭМ были определены в диапазоне 6,9 – 8,6 мм и слабо различались между собой ($p < 0,999$) (рис. 58, табл. 29).

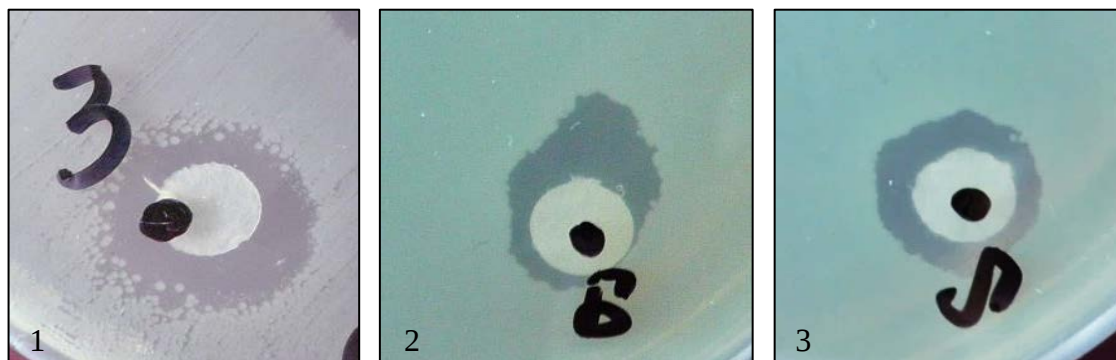


Рисунок 58. Чувствительность *A. baumannii* к эфирным маслам: 1 – мяты сорта Заграва (З), 2 – мяты сорта Бергамотная (Б), 3 – лаванды.

Таблица 29. Антибактериальная активность эфирных масел в отношении *A. baumannii* (диско-диффузионный метод)

Название растений - продуцентов эфирного масла	Зона задержки роста, мм		Коэффициент вариации, %
	lim	$(\bar{x} \pm \sigma)$	
Мята сорта Прилукская карвонная	6,0...11,0	$7,5 \pm 1,4$	18,7
Мята сорта Заграва	6,0...14,0	$8,6 \pm 2,3$	27,0
Мята сорта Бергамотная	6,0...10,0	$7,3 \pm 1,2$	16,6
Мята сорта Оксамитовая	6,0...14,0	$7,9 \pm 2,0$	25,9
Мята сорта Украинская перечная	6,0...14,0	$7,7 \pm 1,9$	24,2
Роза крымская	6,5...8,5	$7,1 \pm 0,6$	8,4
Роза болгарская	6,5...10,0	$7,5 \pm 1,0$	13,7
Пихта	6,0...9,0	$7,1 \pm 0,8$	11,3
Эвкалипт (образец 1)	6,0...10,0	$7,5 \pm 1,2$	16,0
Эвкалипт (образец 2)	6,0...9,0	$7,2 \pm 0,9$	12,5
Лаванда	6,0...12,0	$8,6 \pm 2,1$	24,4
Розовое дерево	6,0...9,5	$6,9 \pm 0,9$	13,0

Анализ чувствительности *A. baumannii* к мятным маслам методом кинетики роста микроорганизмов показал самую высокую активность против него масел мяты Заграва и Прилукская карвонная. Степень ингибирования ими культуры превысил более чем в 1,3 раза соответствующие значения других ЭМ мяты в разведении 1:1024 ($p < 0,028$). МПК всех мятных масел составила 3,9 мкл/мл (табл. 30).

Таблица 30. Антибактериальная активность мятных эфирных масел в отношении *A. baumannii* (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Мятное эфирное масло различных сортов				
	Прилуцкая карвонная	Заграва	Бергамотная	Оксамитовая	Украинская перечная
	гибель бактериальных клеток, % ($\bar{x} \pm \sigma$)				
3,9 (1:256)	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
1,95 (1:512)	71,5 $\pm$ 4,5	76,0 $\pm$ 1,0	39,3 $\pm$ 3,3	53,0 $\pm$ 0,0	48,0 $\pm$ 8,0
0,97 (1:1024)	38,5 $\pm$ 0,5	37,0 $\pm$ 0,0	13,5 $\pm$ 1,5	29,0 $\pm$ 5,0	21,0 $\pm$ 6,0
0,48 (1:2048)	16,0 $\pm$ 0,0	19,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Самая высокая восприимчивость *A. baumannii* к ЭМ отмечена для масла эвкалипта, его МПК соответствовала концентрации 0,97 мкл/мл. Сопоставимые значения активности показали ЭМ лаванды и розы крымской, их МПК составили 1,95 мкл/мл. ЭМ розового дерева, розы болгарской, пихты одинаково влияли на рост *A. baumannii*, не имея достоверных различий ($p < 0,236$, разведение 1:1024), их МПК – 3,9 мкл/мл, как и МПК мятных масел (табл. 31).

Таблица 31. Антибактериальная активность эфирных масел различного происхождения в отношении *A. baumannii* (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Эфирное масло					
	роза крымская	роза болгарская	розовое дерево	лаванда	эвкалипт (обр. 1)	пихта
	Гибель бактериальных клеток, % ($\bar{x} \pm \sigma$)					
3,9 (1:256)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1,95 (1:512)	100,0	32,8 $\pm$ 2,0	45,7 $\pm$ 2,0	100,0	100,0	38,7 $\pm$ 8,8
0,97 (1:1024)	50,7 $\pm$ 1,2	24,5 $\pm$ 0,5	32,0 $\pm$ 0,0	54,7 $\pm$ 4,5	100,0	20,0 $\pm$ 1,0
0,48 (1:2048)	25,0 $\pm$ 6,0	16,0 $\pm$ 0,0	14,0 $\pm$ 2,0	23,5 $\pm$ 4,5	87,7 $\pm$ 4,5	12,5 $\pm$ 3,5

Графические модели роста *A. baumannii* под влиянием некоторых эфирных масел в концентрации 1:1024 в сравнении с интактной культурой *A. baumannii* представлены в порядке убывания их активности (рис. 59 – 61). Продолжительность лаг-фазы роста *A. baumannii* в присутствии бактериостатических концентраций различных эфирных масел увеличивалась относительно её длительности в процессе роста бактерии в свободной от ЭМ питательной среде (табл. 32, табл. 33).

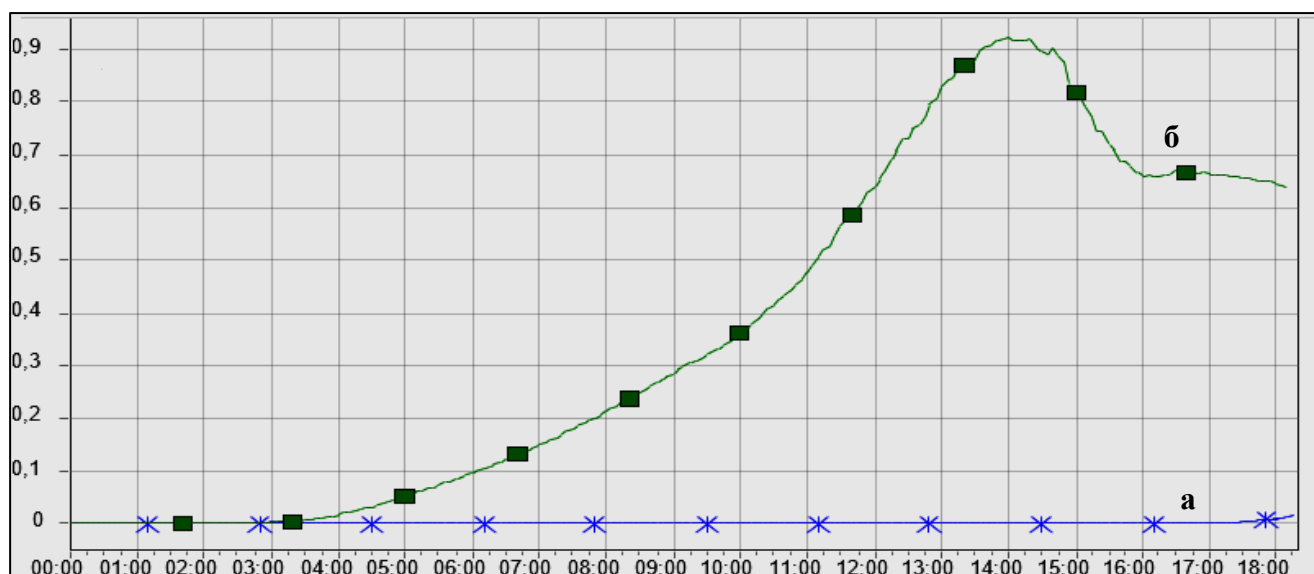


Рисунок 59. Кривые роста *A. baumannii* в среде с эфирным маслом эвкалипта (обр. 1) в разведении 1:1024 – а; в среде без эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

Таблица 32. Время удлинения лаг-фазы роста *A. baumannii* под влиянием мятных эфирных масел (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Мятное эфирное масло различных сортов				
	Прилукская карвонная	Заграва	Бергамотная	Оксамитовая	Украинская перечная
	удлинение лаг-фазы, в минутах ($\bar{x} \pm \sigma$)				
1,95 (1:512)	126,7±4,7	81,7 ±16,5	40,0±0,0	42,5±7,5	63,3±4,7
0,97 (1:1024)	48,3±4,7	38,3 ±10,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
0,48 (1:2048)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Определена значимая корреляция между удлинением лаг-фазы роста *A. baumannii* и уровнем ингибирования эфирными маслами ($R = 0,73$ $p = 0,01$ максимальные значения удлинения лаг-фазы). В результате чего увеличение времени адаптации бактерии к новым условиям сопровождалось повышением степени подавления роста бактерии в течение 18 часов.

Таблица 33. Время удлинения лаг-фазы роста *A. baumannii* под влиянием эфирных масел различного происхождения (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Эфирное масло					
	роза крымская	роза болгарская	розовое дерево	лаванда	эвкалипт (обр. 1)	пихта
	удлинение лаг - фазы, в минутах ($\bar{x} \pm \sigma$)					
1,95 (1:512)	-	0,0±0,0	132,5±32,	-	-	57,5±2,5
0,97 (1:1024)	71,7±20,1	0,0±0,0	0,0±0,0	211,7±33,2	-	0,0±0,0
0,48 (1:2048)	11,7±2,4	0,0±0,0	0,0±0,0	127,5±37,5	457,5±27,5	0,0±0,0

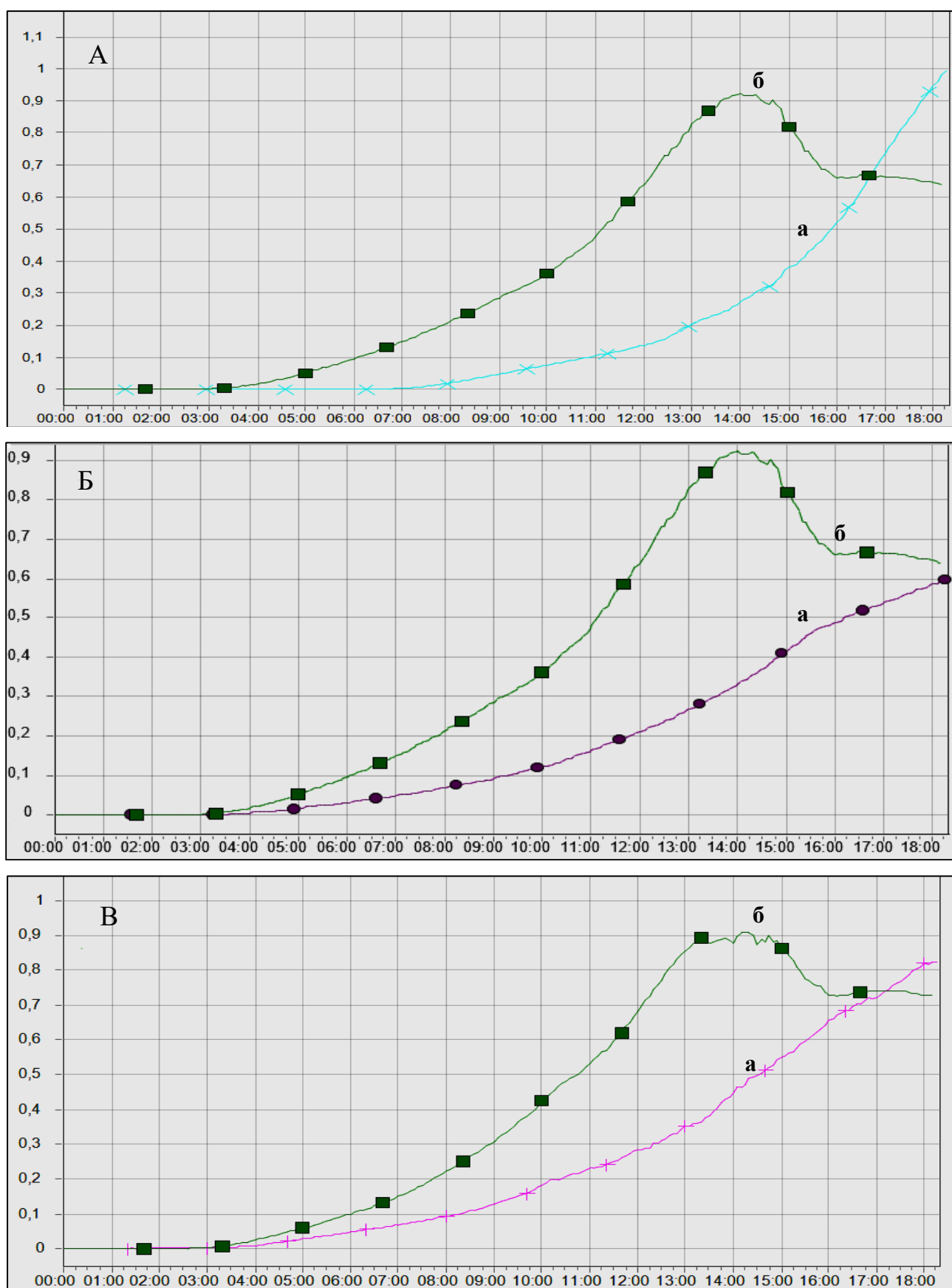


Рисунок 60. Кривые роста *A. baumannii* в среде с эфирными маслами: лаванды – А, розы крымской – Б, мяты сорта Прилукская карвонная – В в разведении 1:1024 – а; в среде без эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

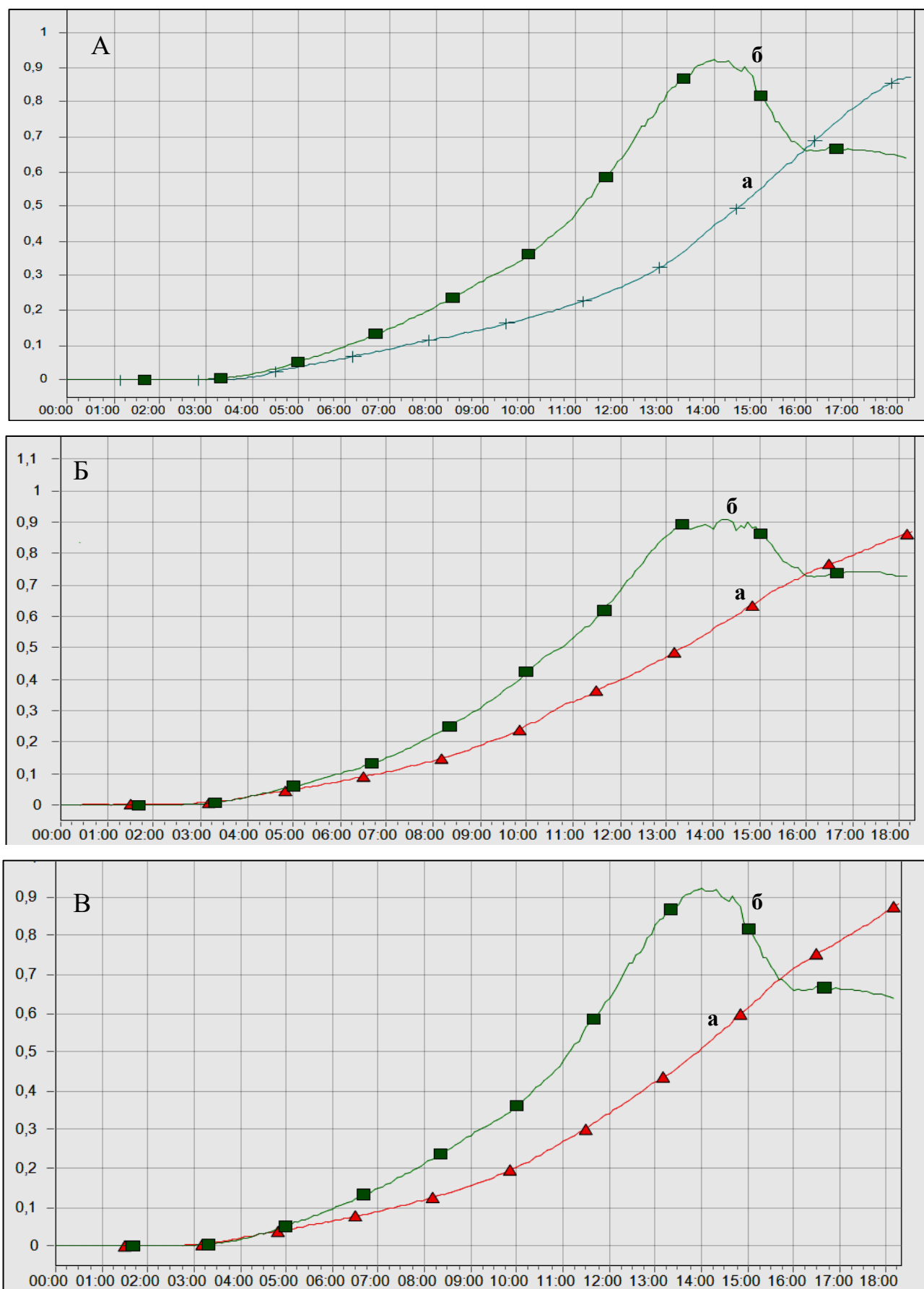


Рисунок 61. Кривые роста *A. baumannii* в среде с эфирными маслами: розового дерева – А, мяты сорта Оксамитовая – Б, розы болгарской – В в разведении 1:1024 – а; в среде без эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

Отдельные компоненты эфирных масел в различной степени проявляли антибактериальную активность в отношении *A. baumannii* (табл. 34).

Таблица 34. Антибактериальная активность компонентов эфирных масел в отношении *A. baumannii* (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Компоненты эфирных масел				
	Ментол	β -фенилэтанол	Нерол	Линалоол	Цитраль
	Гибель бактериальных клеток, % ($\bar{x} \pm \sigma$)				
3,9 (1:256)	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
1,95 (1:512)	56,0 $\pm$ 1,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	59,5 $\pm$ 1,5
0,97 (1:1024)	26,0 $\pm$ 0,0	59,7 $\pm$ 4,5	53,0 $\pm$ 2,0	52,0 $\pm$ 3,8	18,7 $\pm$ 5,2
0,48 (1:2048)	0,0 $\pm$ 0,0	32,0 $\pm$ 1,0	34,5 $\pm$ 4,5	35,5 $\pm$ 2,5	8,0 $\pm$ 2,0
0,24 (1:4086)	0,0 $\pm$ 0,0	15,3 $\pm$ 0,0	12,0 $\pm$ 0,0	14,5 $\pm$ 1,5	0,0 $\pm$ 0,0

Наименее активными компонентами показали себя ментол (рис. 62) и цитраль, их МПК составили 3,9 мкл/мл, а уровни бактериостатического подавления роста *A. baumannii* достоверно не различались ($p < 0,274$).

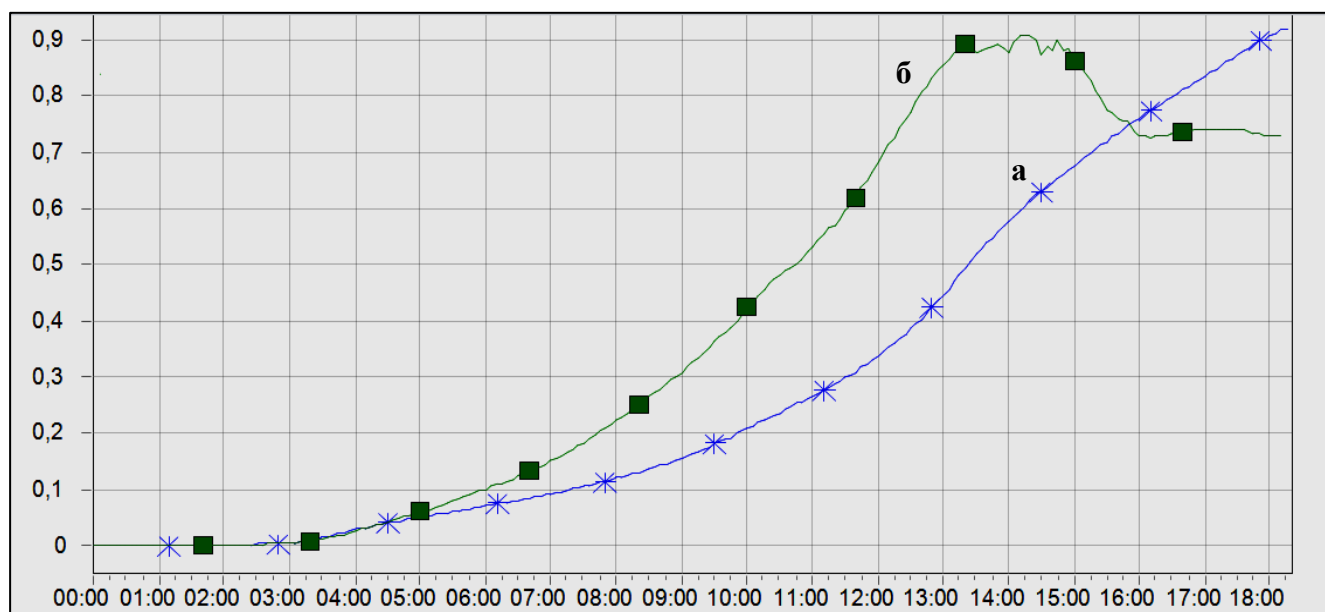


Рисунок 62. Кривые роста *A. baumannii* в среде с ментолом в концентрации 1:1024 –а; в среде без ментола – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

Бактерицидное действие на *A. baumannii* в концентрации 1,95 мкл/мл оказывали β -фенилэтанол, нерол, линалоол, которые в последующих разведениях проявляли бактериостатическое действие. Значения степени подавления роста бактерии данными компонентами статистически не различались ($p < 0,726$ при концентрации 1:1024) (рис. 63).

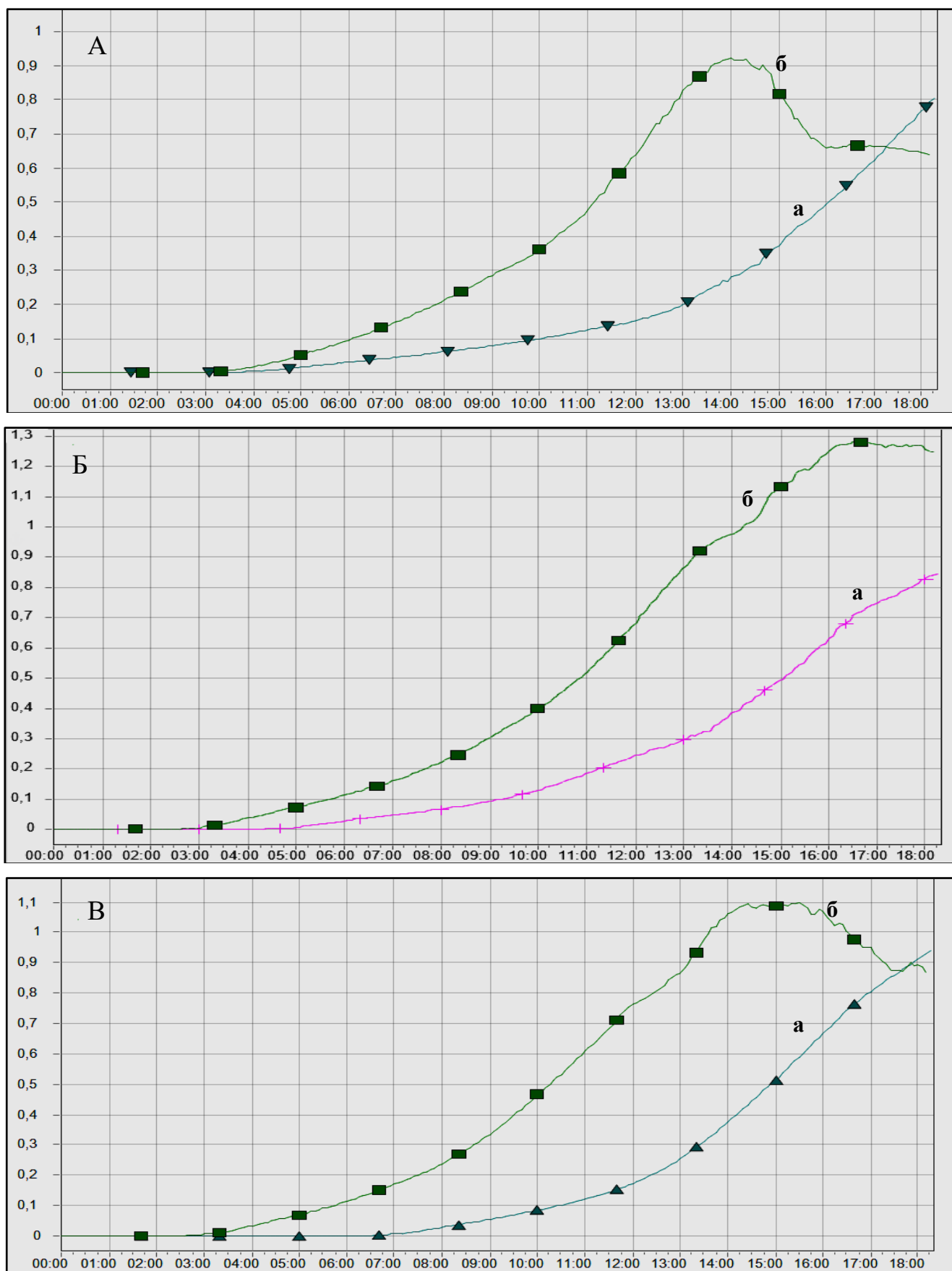


Рисунок 63. Кривые роста *A. baumannii* в среде с компонентами эфирного масла: β -фенилэтанолом – А, линалоолом – Б, неролом – В в разведении 1:1024 – а; в среде без компонентов эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

Взаимосвязь количественного содержания компонентов эфирных масел со степенью подавления роста *A. baumannii* не может быть оценена как достоверная ($R = 0,35$; $p = 0,28$), что свидетельствует о различной активности субстанций, составляющих ЭМ различного происхождения. В то же время, для отдельно взятого масла, эта взаимосвязь прослеживается. Например, процентное содержание линалоола в мяте сортов Оксамитовая и Бергамотная, а также в масле розового дерева в высокой степени коррелирует с ингибированием ими роста *A. baumannii* ($R = 1,0$; $p < 0,05$). При низкой же концентрации линалоола в лавандовом масле активность последнего даже превышает антибактериальное действие самого линалоола (рис. 64).

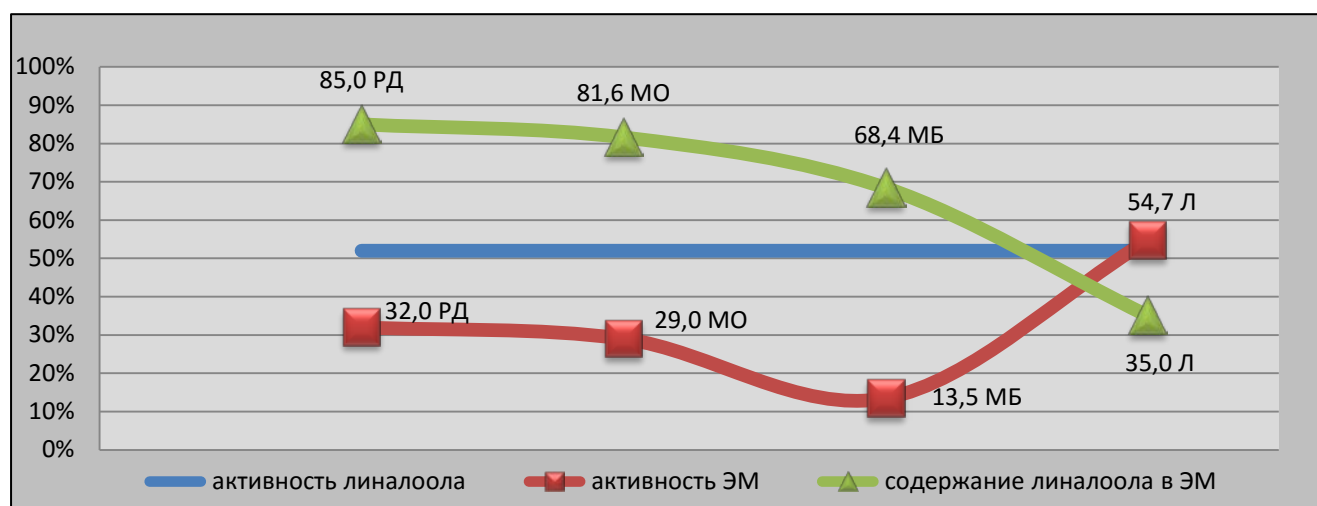


Рисунок 64. Активность эфирных масел розового дерева – РД, мяты Оксамитовой – МО, мяты Бергамотной – МБ, лаванды – Л в разведении 1:1024 в отношении *A. baumannii* в зависимости от содержания в них линалоола (контроль – активность линалоола)

В последнем случае, очевидно, что существует нижний порог концентрации основных антимикробных компонентов в составе ЭМ, которые лимитируют функциональную связь между ними и степенью подавления роста изолята эфирными маслами.

Полирезистентный *A. baumannii* отличался устойчивостью ко многим антибактериальным препаратам. В большинстве случаев, зоны ингибирования бактерии вокруг дисков с антибиотиками отсутствовали, а в сочетании с эфирными маслами, напротив, проявлялась антибактериальная активность в

отношении *A. baumannii* с образованием участков подавления роста. Часто такие комбинации не превышали значения диаметра зон, образованных ЭМ самостоятельно. Полученные данные по совокупной активности антибиотиков и эфирных масел в отношении *A. baumannii* представлены в приложении «Г» и таблице 35.

Таблица 35. Антибактериальная активность эфирных масел в сочетании с антибиотиками в отношении *A. baumannii*

Зоны задержки роста антибиотиков и их сочетаний с эфирными маслами, мм ($\bar{X} \pm \sigma$)								
Тигецилин (TGC)	Лаванда + TGC	Роза крымская + TGC	Эвкалипт + TGC	Меропенем (MEM)	Мята Заграва + MEM	Мята Бергамотная + MEM	Мята Оксамитовая + MEM	
13,9 $\pm$ 1,6	8,8 $\pm$ 0,3	8,8 $\pm$ 1,4	8,5 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,0	13,25 $\pm$ 2,9	10,5 $\pm$ 4,0	12,2 $\pm$ 3,5	
Нетилицин (NET)	Мята Заграва + NET	Мята Бергамотная + NET	Мята Оксамитовая + NET	Амикацин (AK)	Мята Заграва + АК	Мята Оксамитовая + АК	Ципрофлоксацин (CIP)	Мята Заграва + CIP
6,0 $\pm$ 0,0	15,25 $\pm$ 4,0	11,25 $\pm$ 4,	11,9 $\pm$ 4,7	6,0 $\pm$ 0,0	10,6 $\pm$ 2,5	11,0 $\pm$ 3,8	6,0 $\pm$ 0,0	9,8 $\pm$ 2,5

Достоверные различия в активности антибактериальных препаратов в результате взаимодействия с ЭМ отмечались не во всех случаях. Комбинации ЭМ эвкалипта (обр. 1), ЭМ лаванды и ЭМ розы крымской с тигециклином на 38,6 %, 36,7 % и 36,7 %, соответственно, уменьшили диаметр ингибирования культуры антибиотиком ($p < 0,05$), а сочетания тигециклина с мятными эфирными маслами – менее чем на 31,0 %, что в сравнении с соответствующим значением антибиотика незначимо ($p < 0,25$) (рис. 65 а, б).

Взаимодействие цефоперазон/сульбактама с ЭМ мяты сортов Заграва, Оксамитовая, Бергамотная также характеризовалось ослаблением активности, но менее чем на 20,5 % ($p < 0,2$). Остальные комбинации изученных антибактериальных препаратов с эфирными маслами показали усиление антимикробного эффекта в отношении изолята *A. baumannii*.

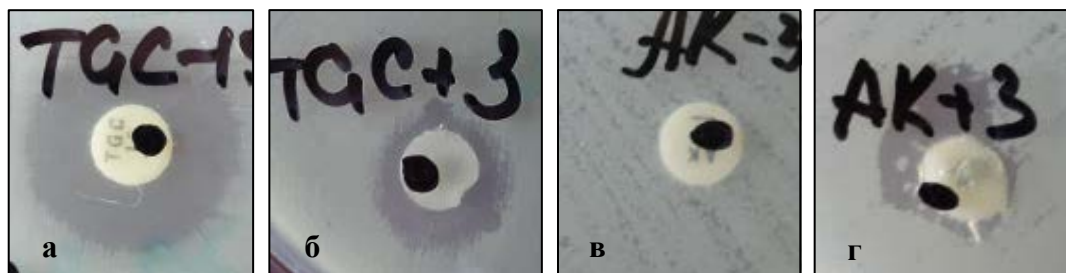


Рисунок 65. Чувствительность *A. baumannii* к эфирным маслам и антибиотикам:

а) тигециклин (TGC), б) ЭМ мяты сорта Заграва (3) + (TGC), в) амикацин (AK), г) (3) + (AK).

В большинстве случаев подобное увеличение диаметров ингибирования изолята было незначительно и обусловлено в основном самостоятельным антибактериальным действием эфирных масел, которое часто превышало активность антибиотиков. В частности, такое взаимодействие показали цефтазидим ($p < 0,9$), цефепим ($p < 0,7$), азтреонам ($p < 0,2$), имипенем ($p < 0,8$) в комбинациях с изученными маслами. Достоверное усиление антибактериального действия наблюдалось в сочетаниях мятного эфирного масла сорта Заграва с нетилмицином на 60,7 %, меропенемом – 54,7 %, амикацином – 43,4 %, ципрофлоксацином – 38,8 % ($p < 0,000$) (рис. 30 в, г). Масло сорта Бергамотная повысило активность нетилмицина на 46,7 %, меропенема – 42,8 % ($p < 0,04$), а масло мяты сорта Оксамитовая увеличило антибактериальный эффект меропенема на 50,8 %, нетилмицина – 49,6 %, амикацина – 45,5% ($p < 0,000$).

Таким образом, ЭМ мяты сортов Заграва, Бергамотная, Оксамитовая снижали лекарственную устойчивость полирезистентного *A. baumannii* к отдельным антибактериальным препаратам из группы β -лактамов, аминогликозидов, фторхинолонов, проявляя с ними синергетическое взаимодействие. Необходимо также отметить, что активные монотерпеновые спирты этих эфирных масел различались: ментол – основной компонент мятного масла сорта Заграва, а линалоол – сортов Бергамотная и Оксамитовая, что не исключает, по нашему мнению, наличия сходных механизмов и/или мишеней действия эфирных масел, реализуемых при совокупном влиянии вышеупомянутых сочетаний ЭМ с антибиотиками на *A. baumannii*.

III. III. 3. Чувствительность *Pseudomonas aeruginosa*

Определение действия эфирных масел мяты на *P. aeruginosa* выявило очень незначительные антибактериальные эффекты, при этом средние значения диаметра подавления роста микроорганизма находились в диапазоне 6,3 – 7,8 мм и практически не различались между собой ($p < 1,00$) (табл. 36, рис. 66).

Таблица 36. Антибактериальная активность эфирных масел в отношении *P. aeruginosa*, измеренная диско-диффузионным методом

Название растений - продуцентов эфирного масла	Зона задержки роста, мм		Коэффициент вариации, %
	lim	$(\bar{x} \pm \sigma)$	
Мята сорта Прилукская	6,0...15,0	7,1 $\pm$ 1,9	26,8
Мята сорта Заграва	6,0...11,0	6,8 $\pm$ 1,5	22,0
Мята сорта Бергамотная	6,0...9,0	6,7 $\pm$ 0,8	12,3
Мята Оксамитовая	6,0...8,0	6,3 $\pm$ 0,8	12,9
Мята Украинская перечная	6,0...9,0	6,6 $\pm$ 0,8	12,1
Роза крымская	6,0...11,0	7,8 $\pm$ 1,3	16,7
Роза болгарская	6,0...10,00	7,6 $\pm$ 1,5	19,7
Эвкалипт (обр. 1) С	6,0...9,0	7,2 $\pm$ 0,9	12,5
Эвкалипт (обр. 2)	6,0...8,0	6,9 $\pm$ 0,8	11,6
Лаванда	6,0...9,0	7,5 $\pm$ 1,1	11,7
Розовое дерево	6,0...11,5	7,5 $\pm$ 1,6	21,3
Пихта	6,0...10,0	6,9 $\pm$ 1,3	18,8



Рисунок 66. Чувствительность *P. aeruginosa* к эфирным маслам: мяты сорта Заграва (З), розового дерева (РД), эвкалипта обр. 1 (ЭС), розы крымской (РК).

Уровень чувствительности *P. aeruginosa* к ЭМ, определяемый методом кинетики роста микроорганизмов, также оказался низким. Активность в отношении бактерии среди мятных масел наблюдалась в высоких концентрациях и проявлялась бактериостатическим действием, а их МПК находились выше 7,8 мкл/мл. Статистически значимые различия в антибактериальной эффективности ЭМ мяты разных сортов не наблюдались ($p < 0,4$) (табл. 37, рис. 67).

Таблица 37. Антибактериальная активность мятных эфирных масел в отношении *P. aeruginosa* (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Мятное эфирное масло различных сортов				
	Прилукская карвонная	Заграва	Бергамотная	Оксамитовая	Украинская перечная
	гибель бактериальных клеток, % ($\bar{x} \pm \sigma$)				
7,8 (1:128)	23,0±1,0	32,5±2,5	29,3±0,5	25,0±0,0	27,0±2,9
3,9 (1:256)	11,7±2,4	19,3±0,5	14,7±1,2	10,0±2,8	12,3±1,7
1,95 (1:512)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Среди изученных эфирных масел наиболее высокую антимикробную активность в отношении *P. aeruginosa* показало ЭМ розы крымской, МПК которого составила 1,95 мкл/мл, за ним расположились ЭМ эвкалипта и ЭМ лаванды – 3,9 мкл/мл и 7,8 мкл/мл, соответственно. В бактериостатических концентрациях ЭМ розы крымской достоверно превышало на 85,5 % эффективность ЭМ эвкалипта и на 67,8 % ЭМ лаванды ($p < 0,000$; разведение 1:1024). Масла розового дерева, розы болгарской, пихты одинаково слабо влияли на рост *P. aeruginosa*, не имея значимых различий ($p < 0,9$; разведение 1:128); их МПК находились выше 7,8 мкл/мл, как и МПК мятных масел (рис. 68, табл. 38).

Таблица 38. Антибактериальная активность эфирных масел различного происхождения в отношении *P. aeruginosa* (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Эфирное масло					
	роза крымская	роза болгарская	розовое дерево	лаванда	эвкалипт (обр. 1)	пихта
	Гибель бактериальных клеток, % ($\bar{x} \pm \sigma$)					
7,8 (1:128)	100,0±0,0	22,0±3,6	24,0±3,6	100,0±0,0	100,0±0,0	21,7±6,2
3,9 (1:256)	100,0±0,0	0,0±0,0	10,0±1,6	57,3±2,0	100,0±0,0	0,0±0,0
1,95 (1:512)	100,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	24,3±6,9	41,0±12,3	0,0±0,0
0,97 (1:1024)	82,8±10,0	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±1,6	26,7±6,2	0,0±0,0
0,48 (1:2048)	50,0±1,9	0,0±0,0	0,0±0,0	6,0±0,0	8,0±1,4	0,0±0,0

Графики кривых роста *P. aeruginosa* под влиянием мятных эфирных масел в концентрации 1:256 представлены на рисунке 67, под влиянием других эфирных масел в концентрации 1:1024 в сравнении с интактной культурой – на рисунке 68.

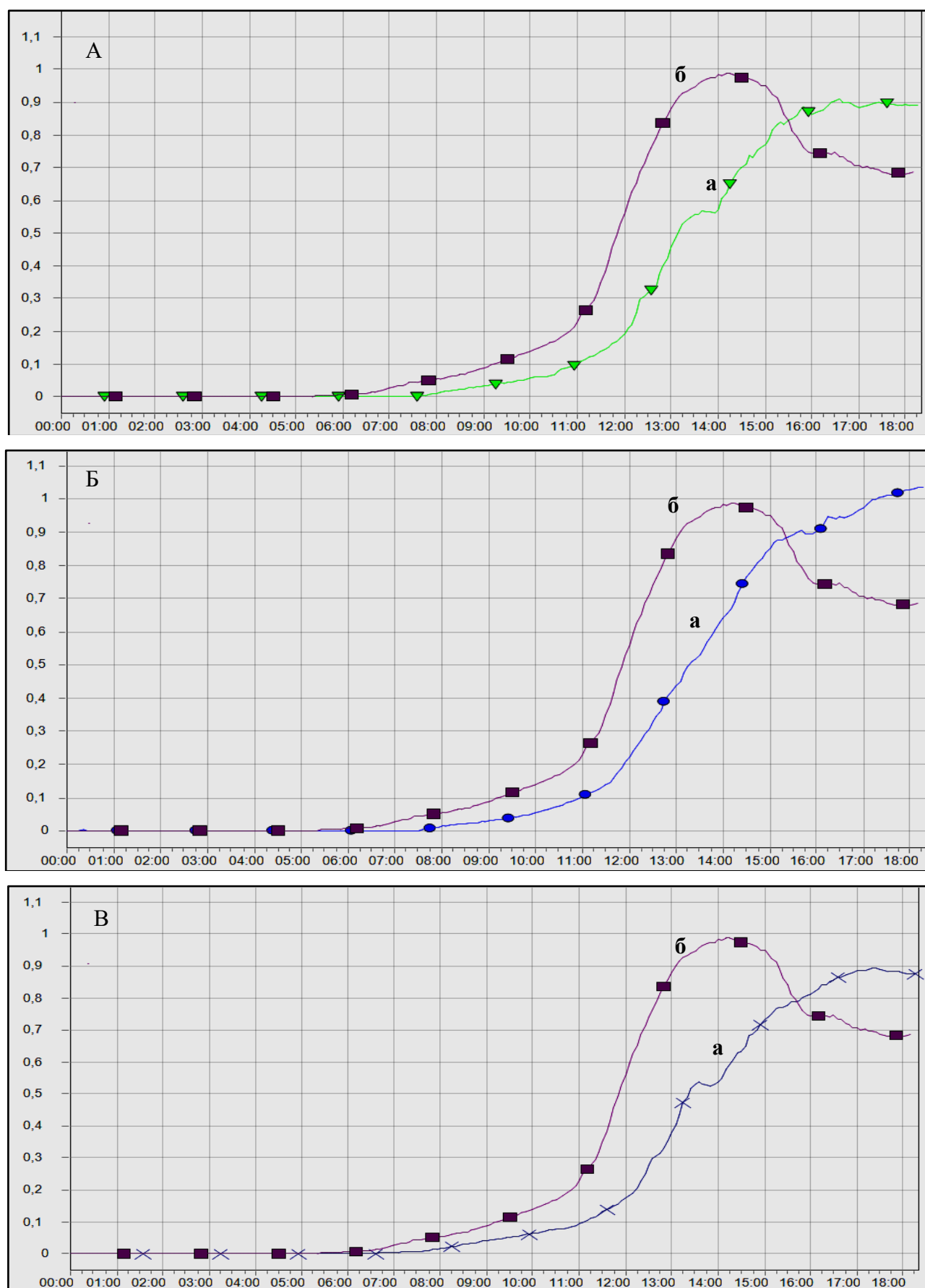


Рисунок 67. Кривые роста *P. aeruginosa* в среде с эфирными маслами мяты сортов: Заграва – А, Бергамотная – Б, Украинская перечная – В в разведении 1:256 – а; в среде без эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

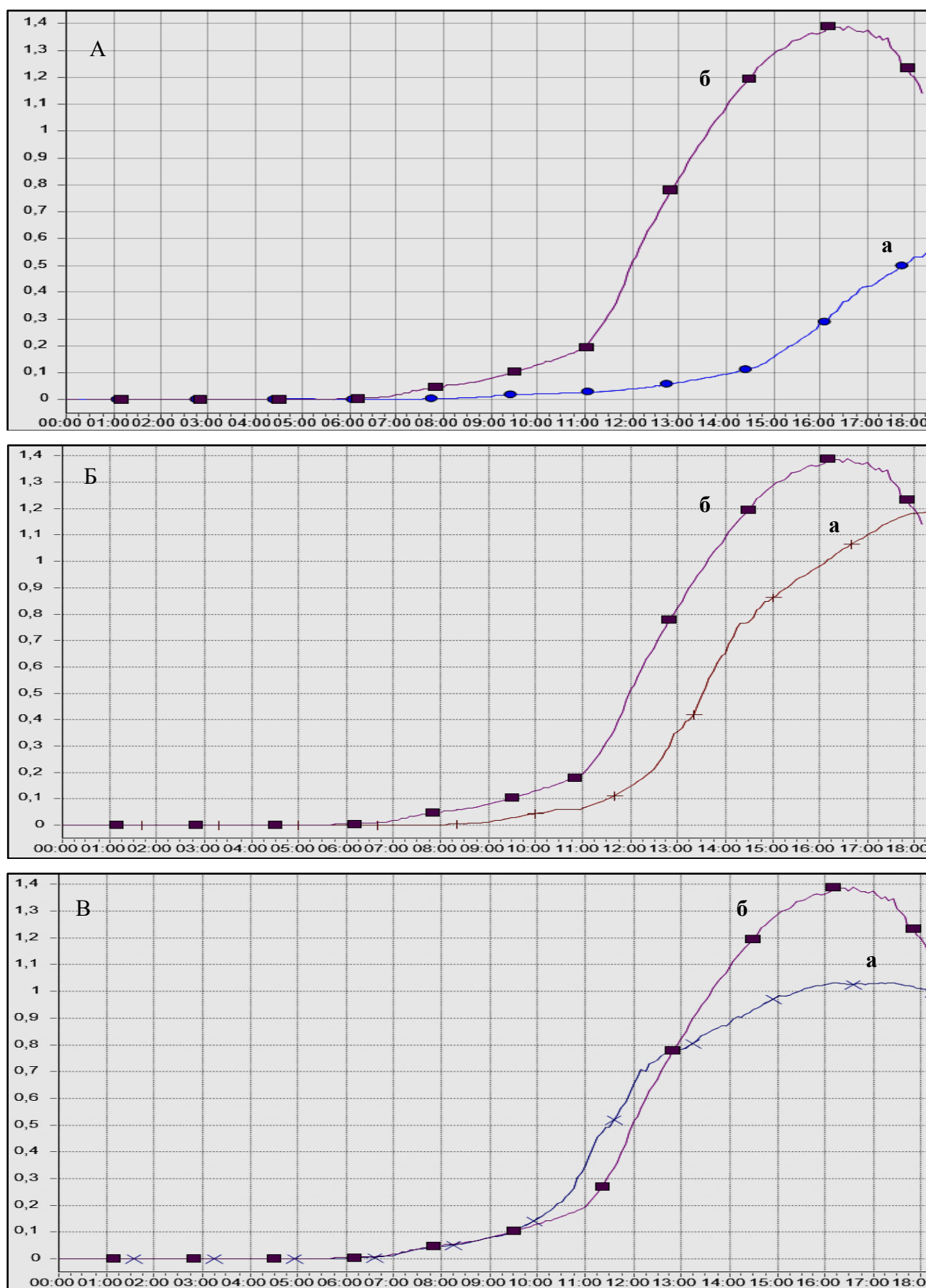


Рисунок 68. Кривые роста *P. aeruginosa* в среде с эфирными маслами: розы крымской – А, эвкалипта – Б, лаванды – В в разведении 1:1024 – а; в среде без эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

Продолжительность лаг-фазы роста *P. aeruginosa* в присутствии бактериостатических концентраций эфирных масел увеличивалась по сравнению с длительностью этого периода в процессе роста *P. aeruginosa* в питательной среде, не содержащей ЭМ (табл. 39, табл. 40).

Таблица 39. Увеличение продолжительности лаг-фазы роста *P. aeruginosa* под влиянием мятных эфирных масел (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Мятное эфирное масло различных сортов				
	Прилукская карвонная	Заграва	Бергамотная	Оksamитовая	Украинская перечная
	удлинение лаг-фазы, в минутах ($\bar{x} \pm \sigma$)				
3,9 (1:256)	48,3 $\pm$ 2,4	63,3 $\pm$ 2,4	61,7 $\pm$ 2,3	46,7 $\pm$ 2,4	73,3 $\pm$ 2,3
1,95 (1:512)	25,0 $\pm$ 7,0	10,0 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 0,0	20,0 $\pm$ 0,0
0,97 (1:1024)	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Таблица 40. Увеличение продолжительности лаг-фазы роста *P. aeruginosa* под влиянием эфирных масел различного происхождения (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Эфирное масло					
	роза крымская	роза болгарская	розовое дерево	лаванда	эвкалипт (обр. 1)	пихта
	удлинение лаг - фазы, в минутах ($\bar{x} \pm \sigma$)					
3,9 (1:256)	0,0 $\pm$ 0,0	33,3 $\pm$ 2,3	60,0 $\pm$ 4,0	233,3 $\pm$ 62,3	0,0 $\pm$ 0,0	61,7 $\pm$ 2,4
1,95 (1:512)	0,0 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 0,0	125,0 $\pm$ 0,0	333,3 $\pm$ 64,0	0,0 $\pm$ 0,0
0,97 (1:1024)	233,3 $\pm$ 26,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	66,7 $\pm$ 6,2	118,3 $\pm$ 28,7	0,0 $\pm$ 0,0
0,48 (1:2048)	38,3 $\pm$ 2,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	48,3 $\pm$ 2,3	28,3 $\pm$ 8,5	0,0 $\pm$ 0,0

Показана значимая корреляция между промежутком времени, на величину которого произошло удлинение лаг-фазы, и уровнем ингибирования *P. aeruginosa* эфирными маслами ($R = 0,83$ $p < 0,001$, максимальные значения удлинения лаг-фазы).

Некоторые компоненты эфирных масел были протестированы на антибактериальную активность в отношении *P. aeruginosa* (табл. 41). Наиболее эффективно подавлял рост *P. aeruginosa* β -фенилэтанол, МПК которого составила 3,9 мкл/мл. Нерол, линалоол, цитраль не менее чем в 2 раза уступали в активности β -фенилэтанола, МПК – 7,8 мкл/мл ($p < 0,000$) и статистически не

различались между собой ($p < 0,4$) (рис. 69, 70) Самым неэффективным компонентом показал себя ментол, его МПК находилась выше 7,8 мкл/мл.

Таблица 41. Антибактериальная активность компонентов эфирных масел в отношении *P. aeruginosa* (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Компоненты эфирных масел				
	Ментол	β -фенилэтанол	Нерол	Линалоол	Цитраль
	Гибель бактериальных клеток, % ($\bar{x} \pm \sigma$)				
7,8 (1:128)	25,0 $\pm$ 0,8	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
3,9 (1:256)	12,0 $\pm$ 1,6	100,0 $\pm$ 0,0	48,3 $\pm$ 3,0	22,0 $\pm$ 5,7	32,7 $\pm$ 6,1
1,95 (1:512)	0,0 $\pm$ 0,0	97,7 $\pm$ 1,7	22,0 $\pm$ 4,5	14,0 $\pm$ 0,0	17,3 $\pm$ 3,3
0,97 (1:1024)	0,0 $\pm$ 0,0	57,3 $\pm$ 13,9	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	8,7 $\pm$ 0,5
0,48 (1:2048)	0,0 $\pm$ 0,0	13,7 $\pm$ 3,9	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	4,3 $\pm$ 1,2

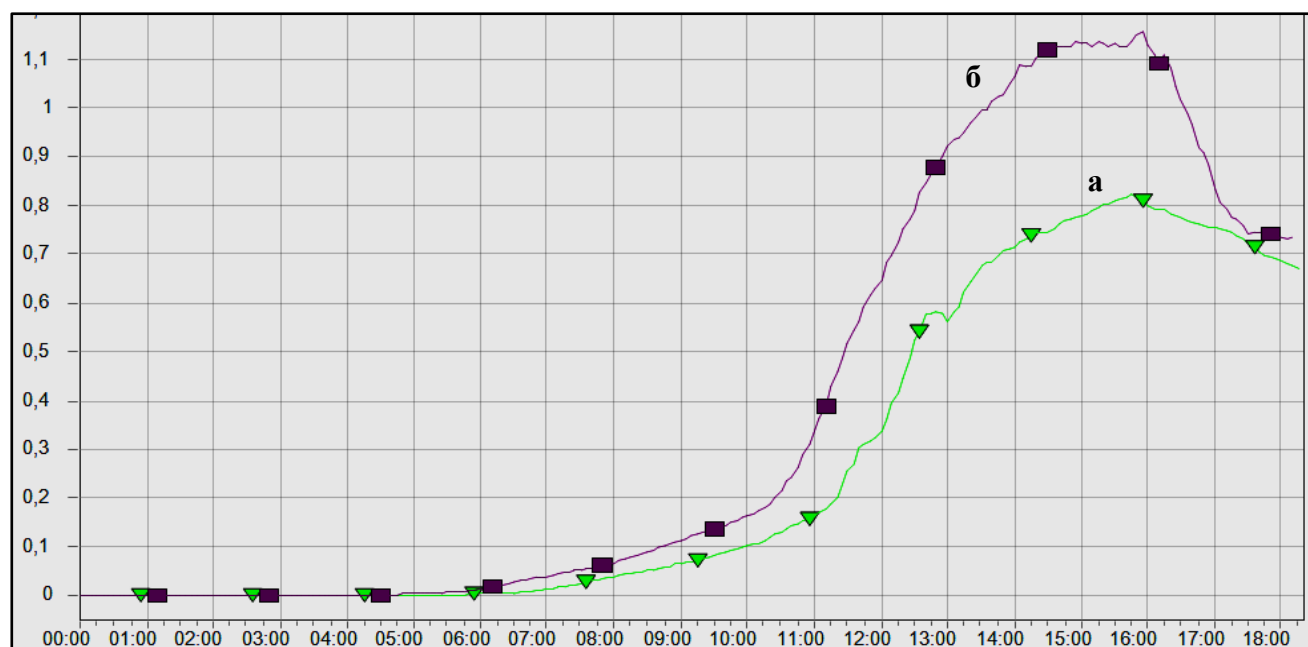


Рисунок 69. Кривые роста *P. aeruginosa* в среде с компонентом эфирных масел линалоолом в разведении 1:256 – а; в среде без компонентов эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

Взаимосвязь процентного содержания основных антимикробных компонентов эфирных масел со степенью подавления роста *P. aeruginosa* не прослеживалась (Spearman $R = 0,03$; $p = 0,93$). Корреляция между содержанием линалоола в ЭМ различного происхождения и ингибированием ими роста *P. aeruginosa* отсутствовала (Spearman $R = - 0,86$; $p < 0,33$). При этом антибактериальная активность линалоола определялась как низкая и не превышала 22,0 % (рис. 71).

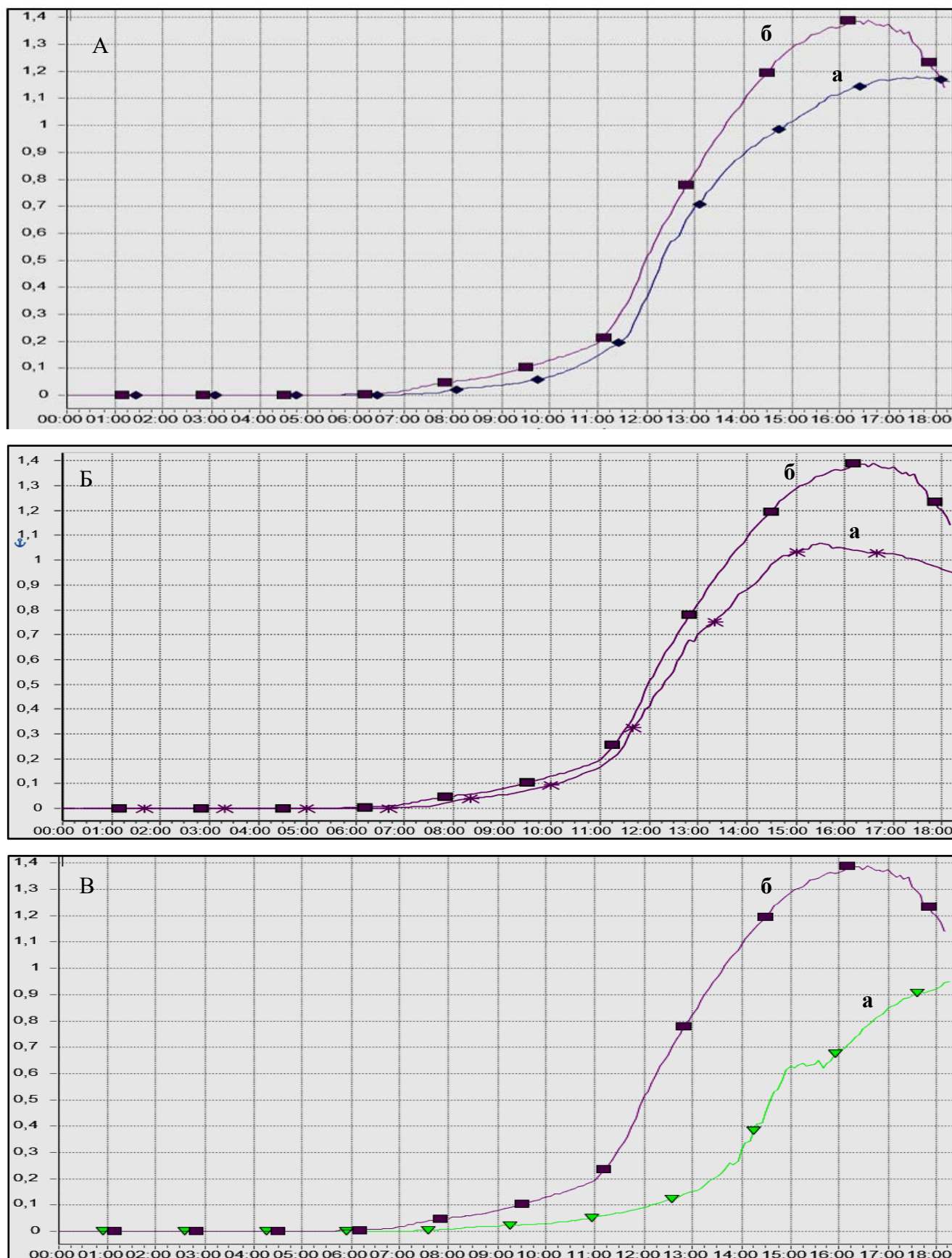


Рисунок 70. Кривые роста *P. aeruginosa* в среде с компонентами эфирных масел: цитралем – А, неролом – Б в разведении 1:512, β-фенилэтаноном – В в разведении 1:1024 – а, в среде без компонентов эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

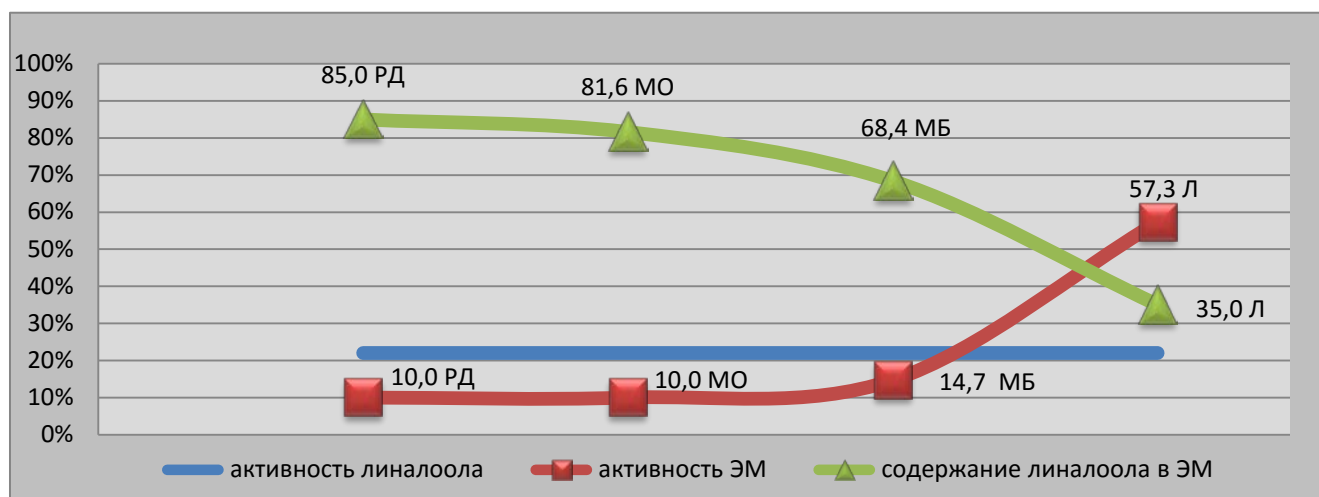


Рисунок 71. Активность эфирных масел розового дерева – РД, мяты Оксамитовой – МО, мяты Бергамотной – МБ, лаванды – Л в отношении *P. aeruginosa* в разведении 1:256 в зависимости от содержания в них линалоола (контроль – активность линалоола)

Таким образом, эффективность эфирных масел, содержащих линалоол, против *P. aeruginosa* ограничивается способностью этого компонента подавлять рост бактерии и не зависит от уровня его содержания в маслах.

Антибактериальная активность комбинаций антибиотиков: цефтазидима, цефепима, меропенема, ципрофлоксацина, амикацина, азтреонама с ЭМ в отношении *P. aeruginosa* в большинстве случаев отличалась от активности самих антибиотиков. Полученные данные по совокупному воздействию данных субстанций на изолят представлены в приложении Г и таблице 42. Достоверное повышение активности антибактериальных препаратов в результате взаимодействия с ЭМ отмечалось в двух комбинациях цефтазидима: с ЭМ мяты сорта Оксамитовая на 31,5 % и ЭМ розового дерева – 29,4 % ($p < 0,037$). В остальных сочетаниях антибиотиков с эфирными маслами: меропенем с ЭМ мяты Оксамитовой, эвкалипта, розового дерева; амикацина с ЭМ розы крымской, эвкалипта, розового дерева наблюдаемое усиление действия антибактериальных препаратов не более чем на 20,0 % было недостоверно $p < 0,5$ и $p < 0,9$, соответственно.

Мятные масла сортов Украинская перечная на 41,7 % и Бергамотная на 50,0 % ослабляли действие меропенема ($p < 0,024$), 46,9 % – цефтазидима ($p < 0,025$), 52,0 % – амикацина ($p < 0,002$).

Таблица 42. Антибактериальная активность эфирных масел в сочетании с антибиотиками в отношении *Pseudomonas aeruginosa*

Зоны задержки роста антибиотиков и их сочетаний с эфирными маслами, мм ($\bar{x} \pm \sigma$)							
Цефтазидим (CAZ)	Мята Оксамитовая + CAZ	Розовое дерево + CAZ	Мята Украинская Перечная + CAZ	Мята Бергамотная + CAZ	Цефепим (FER)	Мята Украинская Перечная + TGC	Лаванда + АК
11,3 $\pm$ 3,8	16,5 $\pm$ 6,5	16,0 $\pm$ 1,0	6,0 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,0	14,5 $\pm$ 0,59	6,0 $\pm$ 0,0	
Меропенем (MEM)	Мята Украинская Перечная + MEM	Мята Бергамотная + MEM	Амикацин (АК)	Амикацин (АК)	Мята Украинская Перечная + АК	Мята Бергамотная + АК	
12,0 $\pm$ 4,0	7,0 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,0	16,7 $\pm$ 4,5	6,0 $\pm$ 0,0	8,0 $\pm$ 0,0	8,0 $\pm$ 0,0	6,3 $\pm$ 0,3

Цефепим терял свою активность на 58,6 % под влиянием ЭМ мяты Украинской перечной ($p < 0,001$), а амикацин – в результате взаимодействия с ЭМ лаванды на 62,3 % ($p < 0,000$). Незначительно снижалась активность антибиотиков в комбинациях цефтазидима с ЭМ розы крымской, эвкалипта, лаванды ($p < 0,2$), цефепима с ЭМ мяты сортов Оксамитовая и Бергамотная ($p < 0,8$), меропенема с ЭМ розы крымской и лаванды ($p < 0,33$), амикацина с ЭМ мяты Оксамитовой ($p < 0,9$), азтреонама с ЭМ розы крымской и эвкалипта ($p < 0,2$). Диаметр ингибирования изолята ципрофлоксацином уменьшался под влиянием сочетаний антибиотика со всеми изученными маслами ($p < 0,9$). В этих случаях, изменения активности не превысили 21,0 % (рис. 72, 73).



Рисунок 72. Активность антибиотика азтреонама (АТМ) и комбинации эфирного масла розы крымской (РК) с азтреонамом (РК + АТМ) в отношении *P. aeruginosa*.

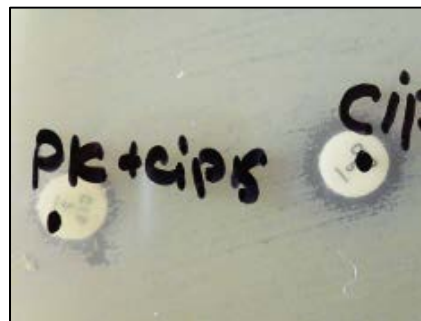


Рисунок 73. Активность антибиотика ципрофлоксацина (СІР) и комбинации эфирного масла розы крымской (РК) с ципрофлоксацином (РК + СІР) в отношении *P. aeruginosa*.

Синергетические взаимодействия показали комбинации эфирных масел мяты Оксамитовой и розового дерева, основным компонентом которых является линалоол, с β -лактамным антибиотиком цефтазидимом, повысив восприимчивость к нему *P. aeruginosa*. В то же время, ЭМ мяты Бергамотной и ЭМ лаванды, содержащие меньше линалоола, чем ЭМ мяты Оксамитовой и ЭМ розового дерева, снижали чувствительность полирезистентного *P. aeruginosa* к отдельным антибактериальным препаратам из группы β -лактамов, аминогликозидов. Таким образом, концентрация активных антимикробных компонентов в эфирных маслах, возможно, может влиять не только на их эффективность в отношении бактерии, но и на характер взаимодействия ЭМ с антибиотиками, синергетический или антагонистический.

III. III. 4. Чувствительность *Klebsiella pneumoniae*

Скрининг антибактериальной активности некоторых эфирных масел в отношении внутрибольничного изолята *K. pneumoniae* показал, что средние значения зон его ингибирования различными маслами находятся в диапазоне 6,4 – 7,8 мм, и не выявил статистически значимых различий между ними ($p < 1,00$) (табл. 43, рис. 74).

Таблица 43. Антибактериальная активность эфирных масел в отношении *K. pneumoniae* (диско-диффузионный метод)

Название растений - продуцентов эфирного масла	Зона задержки роста, мм		Коэффициент вариации, %
	lim	$(\bar{x} \pm \sigma)$	
Мята сорта Прилукская карвонная	6,0...11,0	6,8 $\pm$ 1,2	17,6
Мята сорта Заграва	6,0...15,0	7,8 $\pm$ 2,2	28,2
Мята сорта Бергамотная	6,0...11,0	7,2 $\pm$ 1,2	16,7
Мята Оксамитовая	6,0...10,0	7,0 $\pm$ 1,0	14,3
Мята Украинская перечная	6,0...13,0	7,8 $\pm$ 2,8	35,9
Роза крымская	6,0...9,0	7,5 $\pm$ 0,5	6,7
Роза болгарская	7,0...10,0	7,5 $\pm$ 2,7	36
Эвкалипт (обр. 1)	6,0...8,0	7,1 $\pm$ 0,8	11,5
Эвкалипт (обр. 2)	6,0...8,0	6,9 $\pm$ 0,5	8,3
Лаванда	6,0...9,0	6,9 $\pm$ 0,9	13,0
Розовое дерево	6,0...9,0	7,4 $\pm$ 0,7	9,9
Пихта	6,0...8,0	6,4 $\pm$ 0,6	8,9

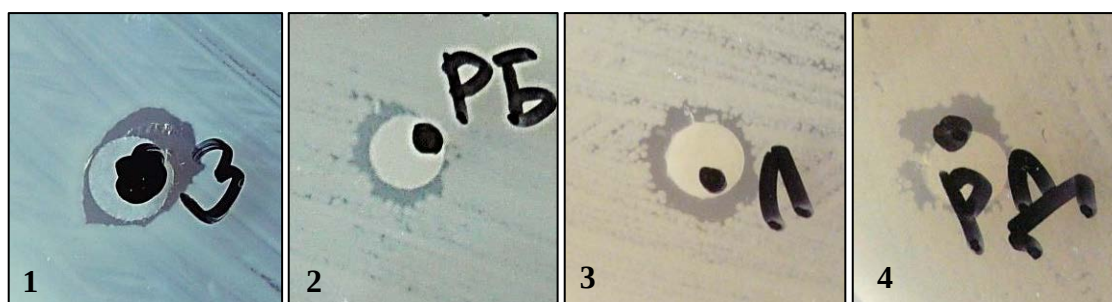


Рисунок 74. Чувствительность *K. pneumoniae* к эфирным маслам: 1 – мяты сорта Заграва (З), 2 – розы болгарской, 3 – лаванды, 4 – розового дерева.

В результате изучения кинетики роста *K. pneumoniae* под влиянием эфирных масел, самая высокая чувствительность в концентрации 3,9 мкл/мл среди масел мяты отмечалась у сорта Заграва. Остальные мятные масла ненамного отличались от неё по активности и не более чем в 1,6 раза были слабее в отношении *K. pneumoniae*, что статистически недостоверно ($p < 0,567$). МПК всех мятных масел составила менее 7,8 мкл/мл (табл. 44, рис. 75).

Таблица 44. Антибактериальная активность мятных эфирных масел в отношении *K. pneumoniae* (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Мятное эфирное масло различных сортов				
	Прилуцкая карвонная	Заграва	Бергамотная	Оксамитовая	Украинская перечная
	гибель бактериальных клеток, % ($\bar{x} \pm \sigma$)				
7,8 (1:128)	35,7 $\pm$ 1,7	42,7 $\pm$ 2,0	43,0 $\pm$ 0,0	39,0 $\pm$ 1,4	54,0 $\pm$ 0,0
3,9 (1:256)	16,7 $\pm$ 3,0	27,0 $\pm$ 0,0	19,0 $\pm$ 2,2	21,0 $\pm$ 4,2	19,3 $\pm$ 0,5
1,95 (1:512)	1,0 $\pm$ 0,0	16,3 $\pm$ 0,9	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
0,97 (1:1024)	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Масла розы болгарской, розового дерева, пихты оказывали на изолят слабое влияние, сопоставимое с действием мятных масел, и практически не отличающееся между собой ($p < 0,957$; разведение 1:128), их МПК составили меньше 7,8 мкл/мл. Наибольшую чувствительность *K. pneumoniae* проявила к ЭМ розы крымской, МПК которого 1,95 мл/мл. МПК эфирных масел лаванды и эвкалипта определялись в концентрациях в 4 раза выше – 7,8 мкл/мл, а их антибактериальное действие на 75,5 % и 83,0 % уступало активности ЭМ розы крымской в разведении 1:512 ($p < 0,000$) (табл. 45, рис. 76).

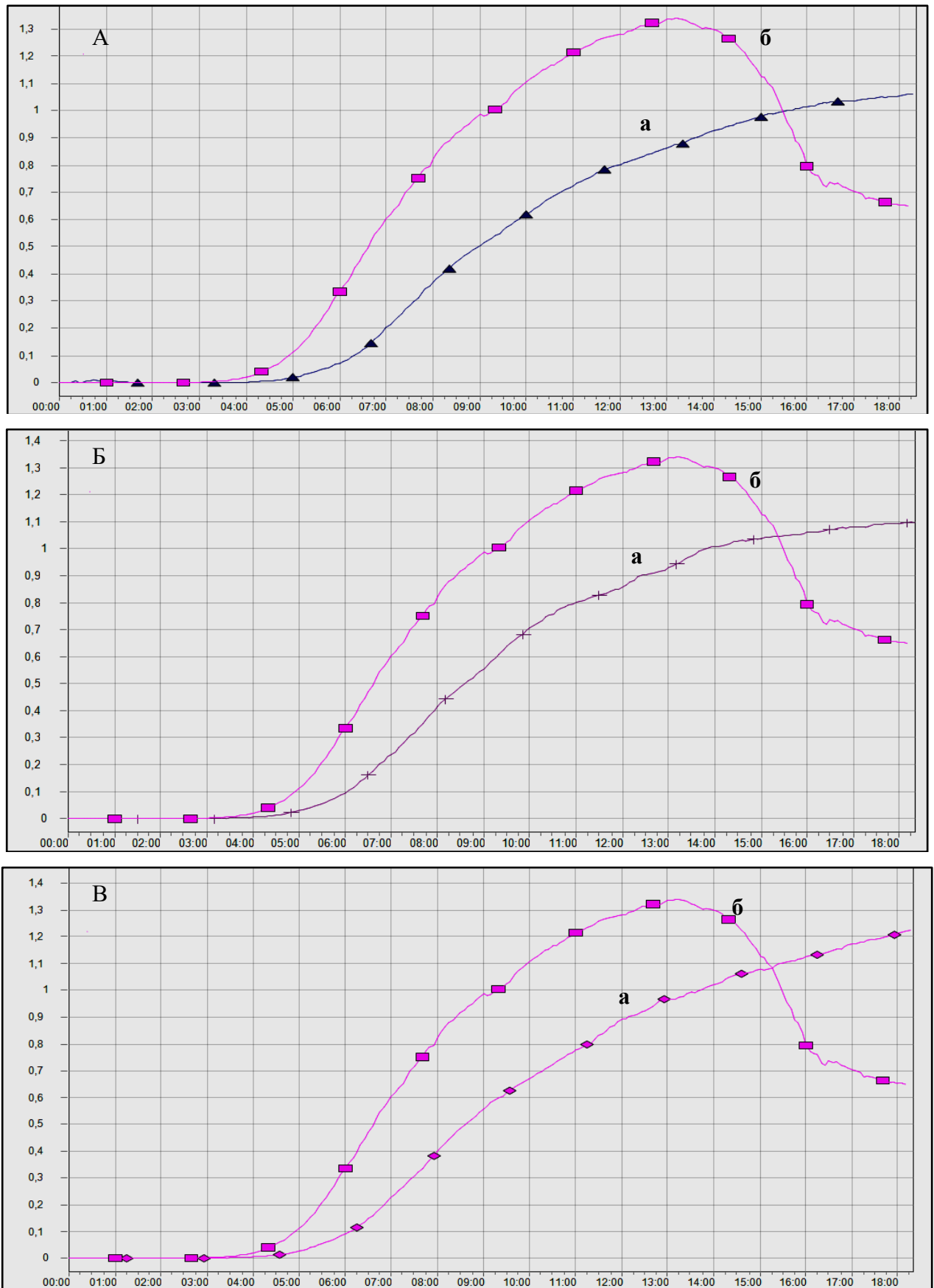


Рисунок 75. Кривые роста *K. pneumoniae* в среде с эфирными маслами: мяты сорта Заграва – А, мяты сорта Оксамитовая – Б, мяты сорта Украинская перечная – В в разведении 1:256 – а; в среде без эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

Таблица 45. Антибактериальная активность эфирных масел в отношении *K. pneumoniae* (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Эфирное масло					
	роза крымская	роза болгарская	розовое дерево	лаванда	эвкалипт (обр. 1)	пихта
	Гибель бактериальных клеток, % ($\bar{x} \pm \sigma$)					
7,8 (1:128)	100,0±0,0	34,3±0,5	35,0±0,8	100,0±0,0	100,0±0,0	36,7±2,5
3,9 (1:256)	100,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	56,0±1,4	42,0±2,9	0,0±0,0
1,95 (1:512)	100,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	24,3±2,6	17,0±3,3	0,0±0,0
0,97 (1:1024)	46,0±4,2	0,0±0,0	0,0±0,0	16,0±0,0	6,7±0,5	0,0±0,0
0,48 (1:2048)	23,7±3,8	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Время удлинения лаг-фазы роста *K. pneumoniae* под влиянием бактериостатических концентраций эфирных масел коррелировало с уровнем ингибирования ими микроорганизма ($R = 0,92$; $p = 0,000$, максимальные значения удлинения лаг-фазы). Связь между данными признаками указывает на тесную зависимость между ними, в результате чего, различные бактериостатические концентрации любого эфирного масла увеличивают время, затраченное на адаптацию к новым условиям *K. pneumoniae*, замедляя вступление бактерии в стадию экспоненциального роста (табл. 46, табл. 47).

Таблица 46. Время удлинения лаг-фазы роста *K. pneumoniae* под влиянием мятных эфирных масел (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Мятное эфирное масло различных сортов				
	Прилуцкая карвонная	Заграва	Бергамотная	Оксамитовая	Украинская перечная
	удлинение лаг-фазы, в минутах ($\bar{x} \pm \sigma$)				
3,9 (1:256)	39,3±0,9	183,3±2,4	86,7±4,7	65,0±4,0	33,3±4,7
1,95 (1:512)	18,3±2,4	115,0±21,2	5,0±0,0	5,0±0,0	15,0±0,0
0,97 (1:1024)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Компоненты ЭМ, также как и масла, показали различные антимикробные эффекты в отношении *K. pneumoniae* и характеризовались более выраженным антибактериальным действием, чем ЭМ (табл. 48). Бактерицидное действие β -фенилэтанола, нерола, цитраля соответствовало МПК 3,9 мкл/мл, в которых большинство изученных эфирных масел оказывали бактериостатическое действие, либо теряли свою активность.

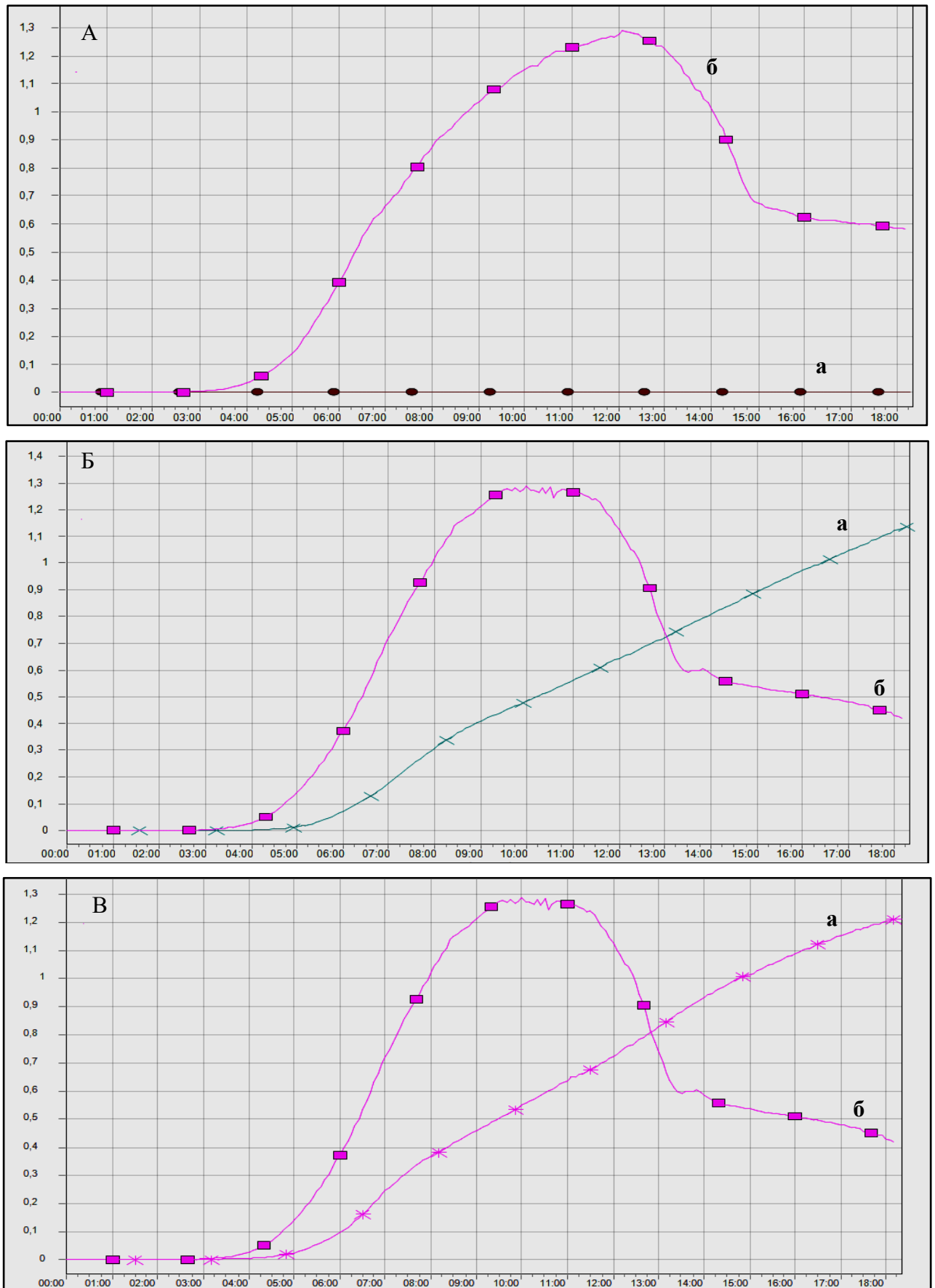


Рисунок 76. Кривые роста *K. pneumoniae* в среде с эфирными маслами: розы крымской – А, лаванды – Б, эвкалипта – В в разведении 1:512 – а; в среде без эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

Таблица 47. Время удлинения лаг-фазы роста *K. pneumoniae* под влиянием эфирных масел различного происхождения (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Эфирное масло					
	роза крымская	роза болгарская	розовое дерево	лаванда	эвкалипт	пихта
	удлинение лаг-фазы, в минутах ($\bar{x} \pm \sigma$)					
3,9 (1:256)	-	0,0±0,0	0,0±0,0	185,0±4,0	146,7±2,4	0,0±0,0
1,95 (1:512)	-	0,0±0,0	0,0±0,0	70,0±14,1	65,0±8,2	0,0±0,0
0,97 (1:1024)	113,3±33,0	0,0±0,0	0,0±0,0	26,7±2,4	41,7±2,3	0,0±0,0
0,48 (1:2048)	5,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	21,7±2,3	0,0±0,0

Таблица 48. Антибактериальная активность компонентов эфирных масел в отношении *K. pneumoniae* (метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Концентрация по объёму, мкл/мл (степень разведения)	Компоненты эфирных масел				
	ментол	β-фенилэтанол	нерол	линалоол	цитраль
	Гибель бактериальных клеток, % ($\bar{x} \pm \sigma$)				
7,8 (1:128)	37,7±1,7	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
3,9 (1:256)	20,3±0,9	100,0±0,0	100,0±0,0	28,7±1,2	100,0
1,95 (1:512)	3,3±0,9	89,7±2,3	36,0±0,8	15,0±0,0	44,0±0,8
0,97 (1:1024)	0,0±0,0	49,7±12,3	19,3±5,7	6,0±0,8	8,7±1,2
0,48 (1:2048)	0,0±0,0	16,3±4,5	5,3±1,3	0,0±0,0	0,0±0,0

Основной компонент ЭМ розы крымской β-фенилэтанол значительно превышал активность нерола и цитраля на 40,0 % и 49,0 %, соответственно, т.е. почти в 2 раза ($p < 0,000$; разведение 1:512). Линалоол и ментол показали самые слабые антимикробные эффекты, которые не менее чем в 2,4 раза уступали прочим компонентам ($p < 0,000$; разведение 1:512), при этом линалоол в 3 раза превзошел ментол в активности ($p < 0,006$; разведение 1:512) (рис. 77).

Степень подавления роста *K. pneumoniae* эфирными маслами не зависела от количественного содержания в них основных антимикробных компонентов ($R = 0,12$; $p = 0,72$). Корреляция между содержанием линалоола в эфирных маслах различного происхождения и ингибированием ими роста *K. pneumoniae* также отсутствовала ($R = 0,8$; $p = 0,2$) (рис. 78). При этом антибактериальная активность линалоола не превысила 28,0 %, что повлияло на эффективность эфирных масел в отношении *K. pneumoniae*, содержащих этот компонент.

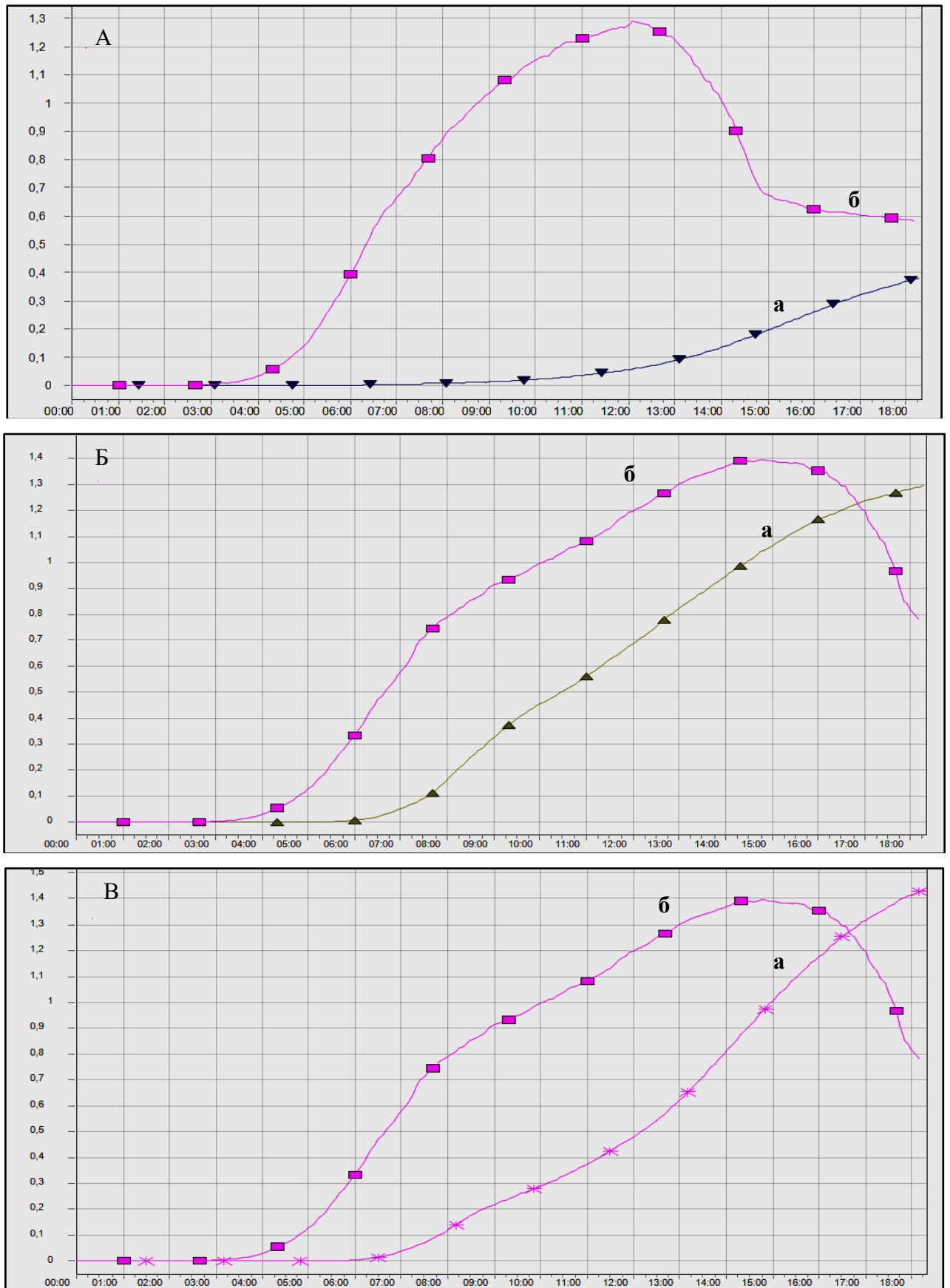


Рисунок 77. Кривые роста *K. pneumoniae* в среде с компонентами эфирных масел: β-фенилэтанолом – А, неролом – Б, с цитралем – В в разведении 1:512 – а; в среде без компонента эфирного масла – б; ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время измерения в часах.

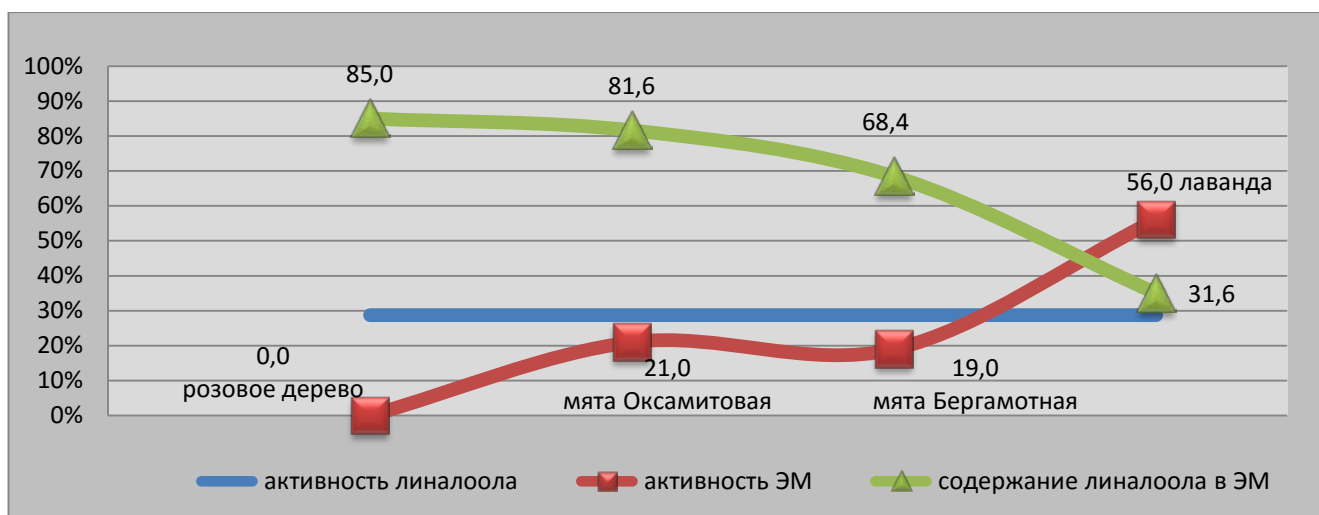


Рисунок 78. Активность эфирных масел в отношении *K. pneumoniae* в разведении 1:256 в зависимости от содержания в них линалоола (контроль – активность линалоола)

Эфирные масла в сочетании с антибиотиками, в большинстве случаев, снижали антимикробное действие против *K. pneumoniae*. Тигециклин уменьшил активность в отношении бактерии под влиянием некоторых эфирных масел: мяты сорта Украинская перечная на 30,7 %, мяты сорта Бергамотная – 38,1 %, розы крымской – 44,0 %, лаванды – 61,4 % ($p < 0,000$). Масла мяты Оксамитовой, розового дерева, эвкалипта, напротив, слабо повлияли на восприимчивость *K. pneumoniae* к тигециклину ($p < 0,46$). Такое же незначительное расхождение в значениях зон ингибирования изолята антибиотиком и комбинацией его с эфирными маслами, не более чем на 21,0 %, наблюдалось у цефепима ($p < 0,87$), амикацина ($p < 0,6$) и эртапенема ($p < 0,9$) (рис. 79, рис. 80).



Рисунок 79. Активность антибиотика амикацина (АК) и его комбинаций с эфирными маслами лаванды (Л + АК), эвкалипта (Э + АК) в отношении *K. pneumoniae*

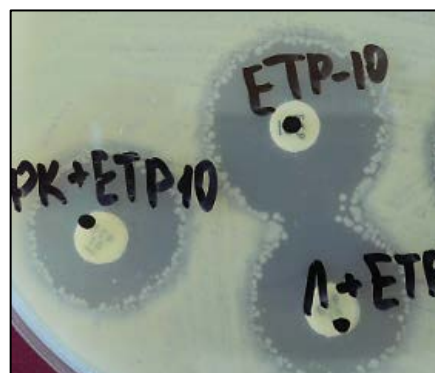


Рисунок 80. Активность антибиотика эртапенема (ЕТР) и его комбинаций с эфирными маслами розы крымской (РК + ЕТР), лаванды (Л + ЕТР) в отношении *K. pneumoniae*

Диаметр ингибирования изолята ципрофлоксацином увеличивался под влиянием эфирных масел, но статистически незначимо ($p < 0,8$). В этих случаях, изменения активности не превысили 23,8 %. В целом, полученные данные по совокупной активности антибиотиков и эфирных масел в отношении *K. pneumoniae* представлены в приложении «Г» и таблице 48.

Таблица 48. Антибактериальная активность эфирных масел в сочетании с тигециклином в отношении *K. pneumoniae*

Зоны задержки роста антибиотиков и их сочетаний с эфирными маслами, мм ($\bar{x} \pm \sigma$)				
Тигециклин (TGC)	Мята Украинская Перечная + TGC	Мята Бергамотная + TGC	Роза крымская + TGC	Лаванда + TGC
20,2±1,3	14,0±1,0	12,5±0,5	11,3±3,5	7,8±0,2

В проведённом исследовании показано, что *S. maltophilia*, *A. baumannii* наиболее чувствительны к действию эфирных масел и их индивидуальных компонентов. Масло розы крымской с основным антимикробным веществом β -фенилэтанолом показало самую высокую бактерицидную и бактериостатическую активность в зависимости от концентрации в отношении всех тест-культур. Противомикробное действие компонентов масел в ряде случаев превышало активность масел, содержащих эти вещества. При этом степень подавления роста тест-объектов некоторыми эфирными маслами не зависела от количества этих компонентов в маслах. При различных бактериостатических концентрациях масел отмечалось удлинение лаг-фазы роста бактерий, которое статистически значимо соотносилось со степенью подавления бактериального роста. Взаимодействие масел с антибиотиками выявило некоторые синергетические эффекты. Таким образом, показана потенциальная возможность применения изученных субстанций в борьбе с антибиотикорезистентными *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*.

Заключение

Мониторинг условно-патогенных грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* по отделениям стационара, возрасту, полу пациентов, сезонам года, способности образовывать ассоциации с другими бактериями показал особенности их распространения во внутрибольничной среде. Они заняли ведущие позиции в хирургических отделениях и преобладали среди прочих бактерий в реанимационных отделениях, что в итоге отразилось на бактериальном профиле всего стационара.

Общими чертами для этих бактерий являлись способность к неспецифической колонизации биотопов пациентов и выделение их из очагов воспаления в виде монокультур или ассоциаций между собой. Наибольшая подверженность распределению по сезонам выявлена у *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, по признаку половой принадлежности – *A. baumannii*, *S. maltophilia*, возрастной принадлежности – *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Колебания количества грамотрицательных бактерий по месяцам и, в отдельных случаях, по периодам исследования отражали неравномерный характер их выявления с отдельными вспышками, что могло быть связано с колонизацией пациентов внутрибольничными штаммами бактерий. В подтверждение этому как среди убиквитарных видов *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, так и среди *A. baumannii* и *S. maltophilia*, происхождение которых связано с окружающей средой, были выявлены изоляты со схожими фенотипическими характеристиками, в том числе, антибиотикочувствительностью. Изучение антибиотикограмм *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* показало наличие у каждого из этих видов бактерий субпопуляций, устойчивых к отдельным антибактериальным препаратам, и полиантибиотикорезистентных изолятов, которые могли сформироваться в госпитальных условиях, и несли при этом одинаковые детерминанты резистентности. Благодаря высокой скорости распространения этих генов устойчивости среди данных видов грамотрицательных бактерий и особенностям их строения, резистентность к

антибиотикам у них развивается быстро, а количество доступных для применения препаратов уменьшается. В нашем исследовании в рамках конкретного стационара не было найдено ни одного антибактериального препарата, по отношению к которому не обнаружили бы устойчивых изолятов среди изученных видов бактерий. Одна из возможностей решения проблемы преодоления антибиотикорезистентности – проведение исследования антимикробной активности эфирных масел и их компонентов в отношении *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* как перспективного направления применения этих биогенных веществ в практической медицине.

Результаты этого исследования показали, что наибольшую чувствительность к изучаемым эфирным маслам проявили *S. maltophilia* и *A. baumannii*, а наибольшую резистентность – *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. Сравнительная оценка биологической активности масел позволила выявить образцы с широким спектром противомикробной активности и избирательно воздействующие на определённые виды устойчивых к антибиотикам грамотрицательных бактерий. На все тест-культуры с различной, но более высокой степенью активности действовали эфирные масла розы крымской и эвкалипта. Бактерицидные МПК розы крымской составили 1,95 мкл/мл у всех тестируемых бактерий, МПК эвкалипта различались: в отношении *A. baumannii* – 0,97 мкл/мл, *S. maltophilia* и *P. aeruginosa* – 3,9 мкл/мл, *K. pneumoniae* – 7,8 мкл/мл.

У остальных масел наблюдалась дифференциация антимикробного действия. Эфирное масло ментольного сорта мяты Заграва обладало высокой бактериостатической активностью в отношении *A. baumannii* и *S. maltophilia* в концентрации 1,95 мкл/мл, где гибель бактериальных клеток составляла более 50,0 %. Масло сорта мяты Украинская перечная с меньшим содержанием ментола проявило активность около 50,0 % только в отношении *A. baumannii*. Мятное масло линалоольного сорта Оксамитовая в большей степени воздействовало на *A. baumannii* и *S. maltophilia*, чем масло мяты сорта Бергамотная, в котором содержание линалоола было меньше. Более выраженные антимикробные свойства среди мятных масел показало карвонное ЭМ сорта Прилукская карвонная против

S. maltophilia, для которого МПК составила 1,95 мкл/мл, а при концентрации 0,97 мкл/мл наблюдалась 97,0 % гибель бактериальных клеток. По сравнению с 2 предыдущими микроорганизмами мятные эфирные масла оказывали слабое бактериостатическое действие, не превышающее 27,0 %, на *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* в концентрации 3,9 мкл/мл. Эфирное масло лаванды бактерицидно воздействовало на *A. baumannii* в концентрации 1,95 мкл/мл, на *S. maltophilia* – 3,9 мкл/мл, на *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* – 7,8 мкл/мл. Наиболее слабым антибактериальным действием в отношении *S. maltophilia* и *A. baumannii* характеризовались масла розового дерева, розы болгарской и пихты, под влиянием которых наступала гибель менее 50,0 % бактериальных клеток в концентрации 1,95 мкл/мл. Масла розы болгарской и пихты в концентрации 3,9 мкл/мл вовсе не подавляли рост ни *P. aeruginosa*, ни *K. pneumoniae*, а ЭМ розового дерева в этом же разведении – *K. pneumoniae*.

Антимикробная активность эфирных масел в отношении грамотрицательных бактерий характеризовалась определёнными закономерностями. Бактериостатическое действие масел, измеренное с помощью кинетических моделей роста, сопровождалось удлинением времени лаг-фазы роста бактерий в отношении всех тест-объектов и положительно коррелировало с уровнем подавления роста бактериальной культуры. Данное свойство может быть использовано при применении масел в составе многокомпонентных лекарственных комплексов. Корреляция между диаметрами ингибирования *S. maltophilia* и *A. baumannii* эфирными маслами и их МПК (мг/мл), между диаметрами и удлинением лаг-фазы роста бактерий, между временем приращения лаг-фазы и значениями МПК (мг/мл) эфирных масел не наблюдалась (табл. 49 – 53).

Индивидуальные компоненты эфирных масел отличались по спектру антимикробного действия и величине активности по отношению к различным микроорганизмам (табл. 53).

Таблица 49. Антимикробная активность эфирных масел в отношении *S. maltophilia*

Источники эфирного масла	Бактерицидное действие			Д-Д + МПК	Бактериостатическое действие			t lag-фазы + % гибели	t lag-фазы + Д-Д	t lag-фазы + МПК
	концентрац., мкл/мл (разведение)	Д-Д, мм	МПК, мг/мл	R	концентрац., мкл/мл (разведение)	t lag-фазы, мин	% гибели	R	R	R
Мята сорта Прилуцкая карвонная	1,95 (1:512)	7,7	1,77	0,14 (p = 0,67)	0,48 (1:2048)	125,0	56,6	0,76 (p = 0,006)	- 0,20 (p = 0,54)	- 0,08 (p = 0,80)
Мята сорта Заграва	3,9 (1:256)	8,4	3,54		1,95 (1:512)	176,6	52,3			
Мята сорта Бергамотная	3,9 (1:256)	7,8	3,54		1,95 (1:512)	80,0	20,3			
Мята Оксамитовая	3,9 (1:256)	8,5	3,54		1,95 (1:512)	98,3	41,6			
Мята Украинская перечная	3,9 (1:256)	6,7	3,54		1,95 (1:512)	140,0	28,0			
Роза крымская	1,95 (1:512)	9,0	1,88		0,97 (1:1024)	195,6	83,25			
Роза болгарская	3,9 (1:256)	8,7	3,34		1,95 (1:512)	86,7	26,0			
Пихта	7,8 (1:128)	9,3	7,07		1,95 (1:512)	38,3	0,0			
Эвкалипт (обр. 1)	3,9 (1:256)	9,0	3,57		1,95 (1:512)	613,3	67,6			
Лаванда	3,9 (1:256)	8,0	3,45		1,95 (1:512)	171,25	38,6			
Розовое дерево	3,9 (1:256)	9,4	3,44		1,95 (1:512)	71,7	39,3			

Примечание: Д-Д – диаметр ингибирования, измеренный диско-диффузионным методом; МПК – минимальная подавляющая концентрация эфирных масел; t lag-фазы – время удлинения лаг-фазы; R – коэффициент корреляции Спирмена; Д-Д + МПК – корреляция между диаметром ингибирования бактериальной культуры и МПК; t lag-фазы + % гибели – корреляция между t lag-фазы и гибелью бактериальных клеток, t lag-фазы – время удлинения логарифмической фазы роста бактерий, t lag-фазы + Д-Д – корреляция между t lag-фазы и диаметром ингибирования бактериальной культуры, t lag-фазы + МПК – корреляция между t lag-фазы и МПК.

Таблица 50. Антимикробная активность эфирных масел в отношении *A. baumannii*

Источники эфирного масла	Бактерицидное действие			Д-Д + МПК	Бактериостатическое действие			t lag-фазы + % гибели	t lag-фазы + Д-Д	t lag-фазы + МПК
	концентрац., мкл/мл (разведение)	Д-Д, мм	МПК, мг/мл	R	концентрац., мкл/мл (разведение)	t lag-фазы, мин	% гибели	R	R	R
Мята сорта Прилукская карвонная	3,9 (1:256)	7,5	3,54	0,19 (p = 0,57)	1,95 (1:512)	126,7	71,5	0,73 (p = 0,01)	0,10 (p = 0,75)	- 0,46 (p = 0,15)
Мята сорта Заграва	3,9 (1:256)	8,6	3,54		1,95 (1:512)	81,7	76,0			
Мята сорта Бергамотная	3,9 (1:256)	7,3	3,54		1,95 (1:512)	40,0	39,3			
Мята Оксамитовая	3,9 (1:256)	7,9	3,54		1,95 (1:512)	42,5	53,0			
Мята Украинская перечная	3,9 (1:256)	7,7	3,54		1,95 (1:512)	63,3	48,0			
Роза крымская	1,95 (1:512)	7,1	1,88		0,97 (1:1024)	71,7	50,7			
Роза болгарская	3,9 (1:256)	7,5	3,34		1,95 (1:512)	0,0	32,8			
Пихта	3,9 (1:256)	7,1	3,53		1,95 (1:512)	57,5	38,7			
Эвкалипт (обр. 1)	0,97 (1:1024)	7,5	0,89		0,48 (1:2048)	457,5	87,7			
Лаванда	1,95 (1:512)	8,6	1,72		0,97 (1:1024)	211,7	54,7			
Розовое дерево	3,9 (1:256)	6,9	3,44		1,95 (1:512)	132,5	45,7			

Примечание: Д-Д – диаметр ингибирования, измеренный диско-диффузионным методом; МПК – минимальная подавляющая концентрация эфирных масел; t lag-фазы – время удлинения лаг-фазы; R – коэффициент корреляции Спирмена; Д-Д + МПК – корреляция между диаметром ингибирования бактериальной культуры и МПК; t lag-фазы + % гибели – корреляция между t lag-фазы и гибелью бактериальных клеток, t lag-фазы – время удлинения логарифмической фазы роста бактерий, t lag-фазы + Д-Д – корреляция между t lag-фазы и диаметром ингибирования бактериальной культуры, t lag-фазы + МПК – корреляция между t lag-фазы и МПК.

Таблица 51. Антимикробная активность эфирных масел в отношении *P. aeruginosa*

Источники эфирного масла	Бактерицидное действие			Бактериостатическое действие			t lag-фазы + % гибели
	концентрац., мкл/мл (разведение)	Д-Д, мм	МПК, мг/мл	концентрац., мкл/мл (разведение)	t lag- фазы, мин	% гибели	R
Мята сорта Прилукская карвонная	> 7,8 (1:128)	7,1	> 7,07	3,9 (1:256)	48,3	11,7	0,83 (p = 0,001)
Мята сорта Заграва	> 7,8 (1:128)	6,8	> 7,07	3,9 (1:256)	63,3	19,3	
Мята сорта Бергамотная	> 7,8 (1:128)	6,7	> 7,07	3,9 (1:256)	61,7	14,7	
Мята Оксамитовая	> 7,8 (1:128)	6,3	> 7,07	3,9 (1:256)	46,7	10,0	
Мята Украинская перечная	> 7,8 (1:128)	6,6	> 7,07	3,9 (1:256)	73,3	12,3	
Роза крымская	1,95 (1:512)	7,8	1,88	0,97 (1:1024)	233,3	82,8	
Роза болгарская	> 7,8 (1:128)	7,6	> 6,68	3,9 (1:256)	33,3	0,0	
Пихта	> 7,8 (1:128)	6,9	> 7,07	3,9 (1:256)	61,7	0,0	
Эвкалипт (обр. 1)	3,9 (1:256)	7,2	3,57	1,95 (1:512)	333,3	41,0	
Лаванда	7,8 (1:128)	7,5	6,89	3,9 (1:256)	233,3	57,3	
Розовое дерево	> 7,8 (1:128)	7,5	> 6,88	3,9 (1:256)	60,0	10,0	

Примечание: Д-Д – диаметр ингибирования, измеренный диско-диффузионным методом; МПК – минимальная подавляющая концентрация эфирных масел, R – коэффициент корреляции Спирмена, t lag-фазы – время удлинения лаг-фазы; t lag-фазы + % гибели – корреляция между t lag-фазы и гибелью бактериальных клеток.

Таблица 52. Антимикробная активность эфирных масел в отношении *K. pneumoniae*

Источники эфирного масла	Бактерицидное действие			Бактериостатическое действие			t lag-фазы + % гибели
	концентрация, мкл/мл (разведение)	Д-Д, мм	МПК, мг/мл	концентрация, мкл/мл (разведение)	t lag-фазы, мин	% гибели	R
Мята сорта Прилукская карвонная	> 7,8 (1:128)	6,8	> 7,07	3,9 (1:256)	39,3	16,7	0,92 (p = 0,000)
Мята сорта Заграва	> 7,8 (1:128)	7,8	> 7,07	3,9 (1:256)	183,3	27,0	
Мята сорта Бергамотная	> 7,8 (1:128)	7,2	> 7,07	3,9 (1:256)	86,7	19,0	
Мята Оксамитовая	> 7,8 (1:128)	7,0	> 7,07	3,9 (1:256)	65,0	21,0	
Мята Украинская перечная	> 7,8 (1:128)	7,8	> 7,07	3,9 (1:256)	33,3	19,3	
Роза крымская	1,95 (1:512)	7,5	1,88	0,97 (1:1024)	113,3	46,0	
Роза болгарская	> 7,8 (1:128)	7,5	> 6,68	3,9 (1:256)	0,0	0,0	
Пихта	> 7,8 (1:128)	6,4	> 7,07	3,9 (1:256)	0,0	0,0	
Эвкалипт (обр. 1)	7,8 (1:128)	7,1	7,15	3,9 (1:256)	146,7	42,0	
Лаванда	7,8 (1:128)	6,9	6,89	3,9 (1:256)	185,0	56,0	
Розовое дерево	> 7,8 (1:128)	7,4	> 6,88	3,9 (1:256)	0,0	0,0	

Примечание: Д-Д – диаметр ингибирования, измеренный диско-диффузионным методом, МПК – минимальная подавляющая концентрация эфирных масел, R – коэффициент корреляции Спирмена, t lag-фазы – время удлинения лаг-фазы, t lag-фазы + % гибели – корреляция между t lag-фазы и гибелью бактериальных клеток.

Таблица 53. Антимикробная активность некоторых компонентов эфирных масел в отношении *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*

компоненты эфирных масел	бактерицидное действие		бактериостатическое действие		бактерицидное действие		бактериостатическое действие	
	МПК мкл/мл	МПК, мг/мл	мкл/мл	% гибели	МПК мкл/мл	МПК, мг/мл	мкл/мл	% гибели
	<i>S. maltophilia</i>				<i>A. baumannii</i>			
ФЭС	1,95	1,99	0,97	77,7	1,95	1,99	0,97	59,7
нерол	0,97	0,86	0,49	51,0	1,95	0,78	0,97	53,0
линалоол	1,95	1,68	0,97	75,0	1,95	1,68	0,97	52,0
цитраль	0,24	0,22	0,24	100,0	3,9	3,48	1,95	59,5
ментол	7,8	6,95	3,9	13,3	3,9	3,48	1,95	56,0
	<i>P. aeruginosa</i>				<i>K. pneumoniae</i>			
ФЭС	3,9	3,97	1,95	97,7	3,9	3,97	1,95	89,7
нерол	7,8	6,88	3,9	48,3	3,9	3,44	1,95	6,0
линалоол	7,8	6,72	3,9	22,0	7,8	6,72	3,9	28,7
цитраль	7,8	6,96	3,9	32,7	3,9	3,48	1,95	44,0
ментол	7,8	6,95	7,8	25,0	7,8	6,95	7,8	37,7

Примечание: МПК – минимальная подавляющая концентрация компонентов эфирных масел.

Ментол в большей степени воздействовал на *A. baumannii* и *S. maltophilia*, показав бактерицидность в концентрации 3,9 мкл/мл и 7,8 мкл/мл, соответственно, и оказывал слабое бактериостатическое действие на *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* в концентрации 7,8 мкл/мл. Соединение β -фенилэтанол в концентрации 1,95 мкл/мл полностью подавляло рост *S. maltophilia* и *A. baumannii*, а на *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* действовал бактериостатически, при этом вызывая гибель не менее 90,0 % бактериальных клеток. Линалоол оказался наиболее эффективным в концентрации 1,95 мкл/мл и активным свыше 50,0 % в концентрации 0,97 мкл/мл против *S. maltophilia* и *A. baumannii*, но в 4 раза большая концентрация (7,8 мкл/мл) потребовалась для его бактерицидного действия на *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. Нерол превзошёл в 2 раза действие линалоола на *S. maltophilia*, в равной степени с последним влиял на *A. baumannii*, слабо влиял на *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. Наиболее активным компонентом, но в то же время, специфически направленным на *S. maltophilia*, оказался цитраль, его МПК находилась за пределами изученных концентраций и составила не более 0,24 мкл/мл. МПК цитраля в отношении *A. baumannii* и *K. pneumoniae* –

3,9 мкл/мл, *P. aeruginosa* – 7,8 мкл/мл. В сравнении с эфирными маслами индивидуальные компоненты ментол, линалоол оказывали на бактерии более выраженное действие, чем масла, содержащие их в качестве основных составляющих, β -фенилэтанол показал соразмерную с маслами активность в отношении *S. maltophilia* и *A. baumannii* и в 2 раза меньшую – против *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. В последнем случае дополнительный ингибирующий эффект эфирного масла розы крымской обусловлен сочетанием соединений с антимикробной активностью.

Изученные эфирные масла при совместном действии с антибактериальными препаратами на тест-культуры *in vitro*, показали наличие сложных эффектов взаимодействия. В основном они повышали активность β -лактамов антибиотиков и аминогликозидов и уменьшали воздействие тигециклина. Масла мяты сортов Заграва и Оксамитовая показали наибольшее количество синергетических взаимодействий с антибиотиками, а масло лаванды – антагонистических. Комбинированные антимикробные субстанции с синергетическими эффектами могут обеспечить большую восприимчивость некоторых антибиотиков бактериями, особенно, при их низкой чувствительности к этим препаратам.

Приведённые данные исследования свидетельствуют о том, что изученные эфирные масла, их индивидуальные компоненты и комбинации масел с антибиотиками обладают антимикробным действием в отношении внутрибольничных патогенов *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* с множественной лекарственной устойчивостью. Все эти масла с различной степенью избирательности могут быть рекомендованы для применения в качестве дезинфицирующих веществ, а в нетоксических концентрациях – как антисептики для местного применения.

ВЫВОДЫ

1. Определены доминирующие в стационаре грамотрицательные бактерии: 21,7 % *Pseudomonas aeruginosa*, 20,2 % *Klebsiella pneumoniae*, 20,0 % *Acinetobacter baumannii*, 9,3 % *Stenotrophomonas maltophilia*, характеризующиеся общими свойствами, существенными для госпитальной среды обитания: способностью к неспецифической колонизации биотопов пациентов, при которой 40,0 % изолятов этих бактерий были выделены из нижних дыхательных путей и 41,0 % – раневой поверхности; формированием в 79,1 % случаев монокультур в очагах колонизации ($p < 0,05$).
2. Впервые на основании сходных фенотипических характеристик и молекулярно-генетического анализа выявлены и дифференцированы между собой антибиотикорезистентные субпопуляции бактерий: 19,8 % изолятов *Acinetobacter baumannii* включали 3 морфологических типа, несущих ген β -лактамазы типа ОХА-40, различающихся способностью вызывать потемнение столбика МПА до коричневого оттенка и чувствительностью к нетилмицину, тобрамицину, тигециклину; 19,7 % изолятов *Pseudomonas aeruginosa* не синтезировали пиоцианин и несли гены металло- β -лактамазы типа VIM.
3. На фоне потенциальной неэффективности 23 антибиотиков в отношении изученных бактерий впервые установлено антибактериальное действие эфирных масел и их компонентов и показано, что *Stenotrophomonas maltophilia* и *Acinetobacter baumannii* проявили чувствительность к эфирным маслам и индивидуальным соединениям в большей степени, чем *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*; минимальные подавляющие концентрации составили 1,95 мкл/мл для эфирного масла розы крымской в отношении всех тест-объектов; 0,97 мкл/мл для эвкалипта – *Acinetobacter baumannii*; 0,24 мкл/мл для цитраля – *Stenotrophomonas maltophilia*.
4. Оценка бактериостатического действия эфирных масел с помощью построения кинетических моделей роста выявила достоверные положительные корреляции между удлинением логарифмической фазы ростового цикла под воздействием

различных концентраций эфирных масел от 0,49 мкл/мл до 3,9 мкл/мл и степенью подавления роста бактериальных клеток, $R=0,73$ при $p < 0,05$.

5. Установлены перспективные сочетания β -лактамов и аминогликозидов с эфирными маслами в отношении *Acinetobacter baumannii*, которые характеризовались наибольшей частотой синергетических бактерицидных взаимодействий (64,3 %) и повышением активности антибиотиков *in vitro* в следующих комбинациях: мятное масло сорта Заграва с нетилмицином на 60,7 %, меропенемом – 54,7 %, амикацином – 43,4 %, сорта Бергамотная с нетилмицином – 46,7 %, меропенемом – 42,8 %, сорта Оксамитовая с меропенемом – 50,8 %, нетилмицином – 49,6 %, амикацином – 45,5% ($p < 0,000$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ И РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предлагаемый алгоритм бактериологической диагностики, включающий определение степени неоднородности бактериальных популяций в стационаре на основании неспецифических видовых биохимических тестов и распределения значений МПК антибиотиков в отношении выделенных изолятов; выявление морфологических типов бактерий по совокупности фенотипических признаков и антибиотикорезистентности; контроль популяций в сезонной и годовой динамике рекомендован для оптимизации индикации нозокомальных штаммов бактерий.
2. Модифицированная нами методика определения активности эфирных масел и летучих соединений в отношении бактерий, основанная на сравнительном изучении кинетических моделей их роста в контрольных средах и в средах с испытуемыми субстанциями, может быть рекомендована как наиболее информативная вместо традиционных методик диффузии в агаровую среду и серийных разведений в жидкой среде.
3. Эфирные масла розы крымской, эвкалипта, лаванды, мяты сортов Прилукская карвонная, Загравы, Оксамитовая, Бергамотная и их компоненты β -фенилэтанол, цитраль, линалоол, нерол с высокой антимикробной активностью в концентрациях 0,24 – 1,95 мкл/мл, а также синергетические комбинации масел

мяты сортов Заграва и Оксамитовая с аминогликозидами и β -лактамами могут служить перспективным дополнением к антибактериальным средствам, целенаправленно воздействуя на антибиотикорезистентные грамотрицательные бактерии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВБИ	Внутрибольничные инфекции
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГОВ	Грамотрицательные бактерии
ГПБ	Грамположительные бактерии
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛПС	Липополисахарид
ЛПУ	Лечебно-профилактическое учреждение
Лог-фаза	Логарифмическая фаза роста
МАРАФОН	М ониторинг Р аспространенности и А нтибиотикорезистентности возбудителей инфекций в многопро Ф ильных стационарах различных реги О нов России
МЛУ	Множественная лекарственная устойчивость
МПК	Минимальная подавляющая концентрация
НГОВ	Неферментирующие грамотрицательные бактерии
ОББ	Определитель бактерий Берджи
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РНК	Рибонуклеиновая кислота
рРНК	Рибосомальная рибонуклеиновая кислота
УПГБ	Условно-патогенные грамотрицательные бактерии
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭМ	Эфирное масло
ААТФ	Комиссия по изучению вопроса доступности антимикробных препаратов (Antimicrobial Availability Task Force)
AMP	Антимикробные пептиды (Antimicrobial peptides)
AcrAB	Эффлюксная система AcrAB-комплекс из периплазматического белка AcrA, канала наружной мембраны и белка-насоса AcrB.
Ade	Эффлюксные системы для лекарственных препаратов <i>Acinetobacter</i> sp. (<i>Acinetobacter</i> drug efflux)

ADC	Цефалоспориназы AmpC рода <i>Acinetobacter</i> (<i>Acinetobacter</i> derived cephalosporinases)
CHDL	Карбапенемазы класса D (carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases)
EPI	Антибактериальные молекулы, блокирующие механизм эффлюкса EPI (efflux pump inhibitor)
ESBL	Расширенного спектра β -лактамазы (Extended-spectrum β -lactamases)
ESKAPE	<i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> sp.
IDSA	Американское общество инфекционных болезней (Infectious Diseases Society of America)
MALDI-TOF MS	Матрично активированная лазерная десорбция/ионизация – времяпролётная масс-спектрометрия (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)
MBL	Металло- β -лактамаза (Metallo- β -lactamase)
MLST	Мультилокусное секвенирование-типирование (Multi Locus Sequence Typing)
OXA	Группа ферментов β - лактамаз расширенного спектра класса D (oxacillin-hydrolyzing β -lactamase)
PFGE	Гель-электрофорез в пульсирующем поле (Pulsed-field gel electrophoresis)
RND	Тип системы активного выведения веществ из клеток грамотрицательных бактерий (Resistance-nodulation-division)
TMP-SMX	Триметоприм-сульфаметоксазол (Trimethoprim/sulfamethoxazole)
HDPS	Белки врожденной иммунной защиты хозяина (Host defense peptides)

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биохимические методы анализа эфиромасличных растений и эфирных масел: сборник научных трудов. – Симферополь, 1972. – 108 с.
2. Быкова, А. С. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / А. С. Быкова, А. А. Воробьёва, В. В. Зверева. – М.: ООО «Мед. информ. агенство, 2008. – 272 с.
3. Жученко Е.В., Семенова Е.Ф., Маркелова Н.Н. Влияние эфирных масел на микроорганизмы различной таксономической принадлежности в сравнении с современными антибиотиками. Сообщение III: Действие масел лаванды, розового дерева, эвкалипта, пихты на некоторые грамотрицательные бактерии // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Серия «Естественные науки», 2015. – № 1 (9). – С. 31-42.
4. Калина, Г.П. Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях). Методические рекомендации / Г. П. Калина. – М.: Московский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана, 1984. – 11 с.
5. Кулагина, Л. Ю. Использование ПЦР в режиме реального времени для детекции генов резистентности проблемных грамотрицательных бактерий / Л. Ю. Кулагина, И. Р. Валиулина, М. Р. Мазитов // Практическая медицина. – 2015. – № 4(2). – С. 76–78.
6. Лабинская, А. С. Руководство по медицинской микробиологии. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика / А. С. Лабинская. – Книга III. Том I. – М.: БИНОМ, 2013. – 752 с.
7. Маркелова, Н. Н. Влияние эфирных масел на микроорганизмы различной таксономической принадлежности в сравнении с современными антибиотиками. Сообщение I: Действие розового эфирного масла и антибиотических субстанций на некоторые грамотрицательные бактерии / Н. Н. Маркелова, Е. Ф. Семенова, А.

И. Шпичка // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Серия «Естественные науки», 2014. – № 3 (7). – С. 39-48.

8. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04. – М.: Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации, 2004. – 156 с.

9. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания. МУ 4.2.2039-05. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. – 398 с.

10. Определение грамотрицательных потенциально патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций. Методические рекомендации. МЗ РСФСР. – Москва, 1986. – 36 с.

11. Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук. – М.: «Академия», 2005. – 608 с.

12. Поздеев, О.К. Энтеробактерии: руководство для врачей / О. К. Поздеев, В. Ф. Фёдоров В. Ф. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 720 с.

13. Приказ № 535: «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». МЗ СССР. – Москва, 1985. – 126 с.

14. Семенова Е.Ф., Маркелова Н.Н., Жученко Е.В. Влияние эфирных масел на микроорганизмы различной таксономической принадлежности в сравнении с современными антибиотиками. Сообщение II: Действие мятного эфирного масла различного компонентного состава на некоторые грамотрицательные бактерии // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Серия «Естественные науки», 2014. – № 4 (8). – С. 5-18.

15. Скала, Л. З. Автоматизированное рабочее место микробиолога и химиотерапевта «Микроб-Автомат». Программное обеспечение. Версия 1.13,

- 2002-2009. Руководство пользователя / Л. З. Скала, И. Н. Лукин. – М.: МедПроект-3, 2012. – 55 с.
16. Сколотнева, Е. С. Методы генотипирования бактерий: фрагментный анализ / Е. С. Сколотнева, Р. А. Волкова, Е. В. Эльберт, // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. – 2014. – Т. 2. – №. 50. – С. 13-21.
17. Скала, Л. З. Система микробиологического мониторинга «Микроб-2». Программное обеспечение. Версия 1.25, 2006-2009. Руководство пользователя / Л. З. Скала, И. Н. Лукин. – М.: МедПроект-3, 2011. – 60 с.
18. Трухачёва, Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н. В. Трухачёва. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 384 с.
19. Яковлев, В. Б. Статистика. Расчёты в Microsoft Excel / В. Б. Яковлев. – М.: «КолосС», 2005. – 350 с.
20. Adams, M. D. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system / M. D. Adams, G. C. Nickel, S. Bajaksouzian // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2009. – V. 53. – № 9. – P. 3628-3634.
21. Adamek, M. Genotyping of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and their pathogenic potential / M. Adamek, J. Overhage, S. Bathe // PLoS One. – 2011. – V. 6. – Iss. 11. – Art. e27615. – P. 1-11.
22. Adjidé, C. C. A sensitive, specific and predictive isolation medium developed for *Stenotrophomonas maltophilia* study in healthcare settings / C. C. Adjidé, A. De Meyer, M. Weyer // Pathologie-biologie. – 2010. – V. 58. – № 1. – P. 11-17.
23. Adler, A. A swordless knight: epidemiology and molecular characteristics of the blaKPC-negative sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae* clone / A. Adler, S. Paikin, Y. Sterlin // Journal of clinical microbiology. – 2012. – V. 50. – № 10. – P. 3180-3185.
24. Alibert-Franco, S. Efflux pumps of gram-negative bacteria, a new target for new molecules / S. Alibert-Franco, A. Mahamoud, J. M. Bolla // Current topics in medicinal chemistry. – 2010. – V. 10. – № 18. – P. 1848-1857.

25. Alonso, A. Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology / A. Alonso, G. Morales, R. Escalante // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2004. – V. 53. – № 3. – P. 432-434.
26. Alonso, A. *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance / A. Alonso, P. Sanchez, J. L. Martínez // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2000. – V. 44. – № 7. – P. 1778-1782.
27. Al Sehlawi, Z. S. Isolation and Identification of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates using Novel Methods / Z. S. Al Sehlawi, A. M. Almohana, A. A. Al Thahab // Journal of Babylon University / Pure and Applied Sciences – 2014. – V. 22. – № 3. – P. 113-123.
28. Alves, M. S. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. / M. S. Alves, R. C. S. Dias, A. C. D. Castro // Journal of clinical microbiology. – 2006. – V. 44. – № 10. – P. 3640-3646.
29. Anderson, S. W. Characterization of small-colony-variant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the sputum specimens of five patients with cystic fibrosis / S. W. Anderson, J. R. Stapp, J. L. Burns // Journal of clinical microbiology. – 2007. – V. 45. – № 2. – P. 529-535.
30. Antoniadou, A. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster / A. Antoniadou, F. Kontopidou, G. Poulakou // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2007. – V. 59. – № 4. – P. 786-790.
31. Aranda, J. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence / J. Aranda, C. Bardina, A. Beceiro // Journal of bacteriology. – 2011. – V. 193. – № 15. – P. 3740-3747.
32. Avison, M. B. A TEM-2 β -lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia* / M. B. Avison, C. J. Heldreich, C. S. Higgins // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2000. – V. 46. – № 6. – P. 879-884.

33. Avison, M. B. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 β -lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia* / M. B. Avison, C. S. Higgins, C. J. von Heldreich // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2001. – V. 45. – № 2. – P. 413-419.
34. Bakkalia, F. Biological effects of essential oils – a review / F. Bakkalia, S. Averbecka, D. Averbecka // Food and chemical toxicology. – 2008. – V. 46. – Iss 2. – P. 446-475.
35. Baquero, F. Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance / F. Baquero, T. M. Coque, F. Cruz // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – V. 55. – № 8. – P. 3649-3660.
36. Bradford, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat Clinical microbiology reviews. – 2001. – V. 14. – № 4. – P. 933-951.
37. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: poreformers or metabolic inhibitors in bacteria? // Nature Reviews Microbiology. – 2005. – V. 3. – № 3. – P. 238-250.
38. Brooke, J. S. New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen // Expert review of anti-infective therapy. – 2014. – V. 12. – № 1. – P. 1-4.
39. Brooke, J. S. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen // Clinical microbiology reviews. – 2012. – V. 25. – № 1. – P. 2-41.
40. Bonnin, R. A. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii* / R. A. Bonnin, P. Nordmann, A. Potron // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – V. 55. – № 1. – P. 349-354.
41. Bonnin, R. A. Wide Dissemination of GES-Type Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* Isolates in Kuwait / R. A. Bonnin, V. O. Rotimi, M. A. Hubail // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2013. – V. 57. – № 1. – P. 183-188.
42. Bonomo, R. A., Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa* // Clinical Infectious Diseases. – 2006. – V. 43. – Suppl. 2. – P. 4956.

43. Bosshard, P. P. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory / P. P. Bosshard, R. Zbinden, S. Abels // Journal of clinical microbiology. – 2006. – V. 44. – № 4. – P. 1359-1366.
44. Boucher, H. W. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America / H.W. Boucher, G. H. Talbot, J.S. Bradley // Clinical infectious diseases. – 2009. – V. 48. – № 1. – P. 1-12.
45. Boye, K., Hansen D. S. Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other *Enterobacteriaceae* // International journal of medical microbiology. – 2003. – V. 292. – Iss. 7. – P. 495-503.
46. Carattoli, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2009. – V. 53. – № 6. – P. 2227-2238.
47. Carson, C. F. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties / C. F. Carson, K. A. Hammer, T. V. Riley // Clinical microbiology reviews. – 2006. – V. 19. – № 1. – P. 50-62.
48. Chevalier, J. Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains / J. Chevalier, J. Bredin, A. Mahamoud // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2004. – V. 48. – № 3. – P. 1043-1046.
49. Choi, H. W. A Role for a menthone reductase in resistance against microbial pathogens in plants / H. W. Choi, B. G. Lee, N. H. Kim // Plant Physiology. – 2008. – V. 148. – № 1. – P. 383-401.
50. Cirz, R. T. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance / R. T. Cirz, J. K. Chin, D. R. Andes // PLoS One. Biology. – 2005. – V. 3. – Iss. 6. Art. e176. – P. 1024-1033
51. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. – 2013. – P. 1-165.
52. Cloud, J. L. Comparison of traditional phenotypic identification methods with partial 5' 16S rRNA gene sequencing for species-level identification of nonfermenting

- Gram-negative bacilli / J. L. Cloud, D. Harmsen, P. C. Iwen // Journal of clinical microbiology. – 2010. – V. 48. – № 4. – P. 1442-1444.
53. Cortez-Cordova, J., Kumar A. Activity of the efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide against the AdeFGH pump of *Acinetobacter baumannii* // International journal of antimicrobial agents. – 2011. – V. 37. – № 5. – P. 420-424.
54. Corvec, S. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains / S. Corvec, N. Caroff, E. Espaze // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2003. – V. 52. – № 4. – P. 629-635.
55. Coyne, S. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. / S. Coyne, P. Courvalin, B. Périchon // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – V. 55. – № 3 – P. 947-953.
56. Constantiniu, S. Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp. Strains isolated from hospital units / S. Constantiniu, A. Romaniuc, L. S. Iancu // J Prevent Med. – 2004. – V. 12. – № 3. – P. 35-42.
57. Crossman, L. C. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants // Genome biol. – 2008. – V. 9. – Iss. 4. – Art. R74. – P. 1-10.
58. Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology // FEMS microbiology reviews. – 2012. – V. 36. – № 2. – P. 380-407.
59. DeNap, J. C. B., Hergenrother P. J. Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria // Organic & biomolecular chemistry. – 2005. – V. 3. – № 6. – P. 959-966.
60. Denton, M. Improved isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from the sputa of patients with cystic fibrosis using a selective medium / M. Denton, M. J. Hall, N. J. Todd // Clinical microbiology and infection. – 2000. – V. 6. – Iss. 7. – P. 395-396.
61. Denton, M., Kerr K. G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia* // Clinical microbiology reviews. – 1998. – V. 11. – № 1. – P. 57-80.

62. Dorman, H. J. D., Deans S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils // *Journal of applied microbiology*. – 2000. – V. 88. – № 2. – P. 308-316.
63. Doumith, M. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK / M. Doumith, J. M. Ellington, D. M. Livermore // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2009. – V. 63. – № 4. – P. 659-667.
64. Duarte, A. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii* / A. Duarte, S. Ferreira, F. Silva // *Phytomedicine*. – 2012. – V. 19. – Iss. 3. – P. 236-238.
65. D'Agata, E. Rapidly rising prevalence of nosocomial multidrug-resistant, Gram-negative bacilli: a 9-year surveillance study // *Infection Control*. – 2004. – V. 25. – № 10. – P. 842-846.
66. Eijkelkamp, B. A. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions / B. A. Eijkelkamp, K. A. Hassan, I. T. Paulsen // *BMC genomics*. – 2011. – V. 12. – № 1. – P. 1-126.
67. Entenza, J. M., Moreillon P. Tigecycline in combination with other antimicrobials: a review of in vitro, animal and case report studies // *International journal of antimicrobial agents*. – 2009. – V. 34. – Iss. 1. – P. 8-19.
68. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing et al. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, valid from 2014-01-01. – 2014. – P. 1-79.
69. Fabio, A. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections / A. Fabio, C. Cermelli, G. Fabio // *Phytotherapy Research*. – 2007. – V. 21. – № 4. – P. 374-377.
70. Ferrer-Navarro, M. Abundance of the quorum-sensing factor Ax21 in four strains of *Stenotrophomonas maltophilia* correlates with mortality rate in a new zebrafish model of infection / M. Ferrer-Navarro, R. Planell, D. Yero // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – Iss. 6. – P. 10-20.

71. Gaddy, J. A. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606^T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice / J. A. Gaddy, B. A. Arivett, M. J. Mc Connell // *Infection and immunity*. – 2012. – V. 80. – № 3. – P. 1015-1024.
72. García-León, G. A function of SmeDEF, the major quinolone resistance determinant of *Stenotrophomonas maltophilia*, is the colonization of plant roots / G. García-León, A. Hernández, S. Hernando-Amado // *Applied and environmental microbiology*. – 2014. – V. 80. – № 15. – P. 4559-4565.
73. Gherardi, G. An overview of various typing methods for clinical epidemiology of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* / G. Gherardi, R. Creti, A. Pompilio // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2015. – V. 81. – № 3. – P. 219-226.
74. Giacometti, A. In vitro activities of membrane-active peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Stenotrophomonas maltophilia* / A. Giacometti, O. Cirioni, M. S. Del Prete // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2000. – V. 44. – № 6. – P. 1716-1719.
75. Giamarellou, H. Multidrug-resistant gram-negative bacteria: how to treat and for how long // *International journal of antimicrobial agents*. – 2010. – V. 36. – Suppl. 2. – P. 50-54.
76. Girlich, D. OXA-253, a Variant of the Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii* / D. Girlich, Q. S. Damaceno, A. S. Oliveira // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2014. – V. 58. – № 5. – P. 2976-2978.
77. Harper, D. R., Enright, M. C. Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections // *Journal of applied microbiology*. – 2011. – V. 111. – Iss. 1. – P. 1-7.
78. Hazen, T. H. Characterization of *Klebsiella* sp. strain 10982, a colonizer of humans that contains novel antibiotic resistance alleles and exhibits genetic similarities to plant and clinical *Klebsiella* isolates / T. H. Hazen, L. Ch. Zhao, J. W. Sahl // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2014. – V. 58. – № 4. – P. 1879-1888.

79. Hennequin, C. Characterization of a DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* strain involved in an outbreak and role of the AmpR regulator in virulence / C. Hennequin, F. Robin, N. Cabrolier // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2012. – V. 56. – № 1. – P. 288-294.
80. Hentschke, M. ramR mutations in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to tigecycline / M. Hentschke, M. Wolters, I. Sobottka // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2010. – V. 54. – № 6. – P. 2720-2723.
81. Higgins, P. G. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii* / P. G. Higgins, L. Poirel, M. Lehmann // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2009. – V. 53. – № 12. – P. 5035-5038.
82. Hood, M. I. Genetic determinants of intrinsic colistin tolerance in *Acinetobacter baumannii* / M. I. Hood, K. W. Becker, C. M. Roux // Infection and immunity. – 2013. – V. 81. – № 2. – P. 542-551.
83. Howard, A. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen / A. Howard, M. O'Donoghue, A. Feeney // Virulence. – 2012. – V. 3. – Iss. 3. – P. 243-250.
84. Huedo, P. Two different rpf clusters distributed among a population of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains display differential diffusible signal factor production and virulence regulation / P. Huedo, D. Yero, S. Martínez-Servat // Journal of bacteriology. – 2014. – V. 196. – № 13. – P. 2431-2442.
85. Hung, C. H. Experimental phage therapy in treating *Klebsiella pneumoniae* - mediated liver abscesses and bacteremia in mice / C. H. Hung, C. F. Kuo, C. H. Wang // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – V. 55. – № 4. – P. 1358-1365.
86. Igbinosa, E. O., Oviasogie F. E. Multiple antibiotics resistant among environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* // Journal of Applied Sciences and Environmental Management. – 2014. – V. 18. – № 2. – P. 255-261.
87. Inouye S., Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact / S. Inouye, T. Takizawa, H. Yamaguchi // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2001. – V. 47. – № 5. – P. 565-573.
88. Jacoby, G. A. AmpC β -lactamases // Clinical microbiology reviews. – 2009. – V. 22. – № 1. – P. 161-182.

89. Jacoby, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones // *Clinical Infectious Diseases*. – 2005. – V. 41. – Suppl. 2. – P. 120-126.
90. Jacoby, G. A., Munoz-Price L. S. The new β -lactamases // *New England Journal of Medicine*. – 2005. – V. 352. – № 4. – P. 380-391.
91. Juan, C. Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains / C. Juan, M. D. Maciá, O. Gutiérrez // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2005. – V. 49. – № 11. – P. 4733-4738.
92. Jucker, B. A. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon / B. A. Jucker, H. Harms, A. J. Zehnder // *Journal of bacteriology*. – 1996. – V. 178. – № 18. – P. 5472-5479.
93. Kalembe, D., Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils // *Current medicinal chemistry*. – 2003. – V. 10. – № 10. – P. 813-829.
94. Kaneko, Y. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity / Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi // *The Journal of clinical investigation*. – 2007. – V. 117. – Iss. 4. – P. 877-888.
95. Karaba, S. M. *Stenotrophomonas maltophilia* encodes a type II protein secretion system that promotes detrimental effects on lung epithelial cells / S. M. Karaba, R. C. White, N. P. Cianciotto // *Infection and immunity*. – 2013. – V. 81. – № 9. – P. 3210-3219.
96. Khan, M.S.A. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil / M.S.A. Khan, M. Zahin, S. Hasan // *Letters in applied microbiology*. – 2009. – V. 49. – Iss. 3. – P. 354-360.
97. Kirisits, M. J. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / M. J. Kirisits, L. Prost, M. Starkey // *Applied and environmental microbiology*. – 2005. – V. 71. – № 8. – P. 4809-4821.
98. Lambert R. J. W. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol / R. J. W. Lambert, P. N.

- Skandamis, P. J. Coote// Journal of applied microbiology. – 2001. – V. 91. – № 3. – P. 453-462.
99. Landman, D. Polymyxins revisited / D. Landman, C. Georgescu, D. A. Martin// Clinical microbiology reviews. – 2008. – V. 21. – № 3. – P. 449-465.
100. Lamoureaux, T. L. Antibiotic resistance and substrate profiles of the class A carbapenemase KPC-6 / T. L. Lamoureaux, H. Frase, N. T. Antunes // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2012. – V. 56. – № 11. – P. 6006-6008.
101. Lavigne, J. P. Virulence of *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring bla KPC-2 carbapenemase gene in a *Caenorhabditis elegans* model / J. P. Lavigne, G. Cuzon, C. Combescure // PloS one. – 2013. – V. 8. – Iss. 7. Art. e67847. – P. 1-7.
102. Lee, H. C. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia / H.C. Lee, Y.C. Chuang, W.L. Yu // Journal of internal medicine. – 2006. – V. 259. – Iss. 6. – P. 606-614.
103. Lery, L. M. S. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor / L. M. S. Lery, L. Frangeul, A. Tomas // BMC biology. – 2014. – V. 12. – Art.41. – P. 1-15
104. Liaw, S. J. Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation / S.J. Liaw, Y.L. Lee, P.R. Hsueh // International journal of antimicrobial agents. – 2010. – V. 35. – Iss. 2. – P. 126-130.
105. Livermore, D. M. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens // The Korean journal of internal medicine. – 2012. – V. 27. – № 2. – P. 128-142.
106. Li, X-Z. Role of the acetyltransferase AAC (6')-Iz modifying enzyme in aminoglycoside resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* / X-Z. Li, L. Zhang, G. A. McKay // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – V. 51. – № 4. – P. 803-811.

107. Li, Y. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW–OprM, in *Pseudomonas aeruginosa* / Y. Li, T. Mima, Y. Komori // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – V. 52. – № 4. – P. 572-575.
108. Lorenzi, V. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species / V. Lorenzi, A. Muselli, A. F. Bernardini // Antimicrob. agents and chemotherapy. – 2009. – V. 53. – № 5. – P. 2209-2211.
109. Mahamoud, A. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy / A. Mahamoud, J. Chevalier, S. Alibert-Franco // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2007. – V. 59. – Iss. 6. – P. 1223-1229.
110. Maya, J. Time–kill studies of tea tree oils on clinical isolates / J. Maya, C. H. Chana, A. Kinga // Antimicrobial chemotherapy. – 2000. – V. 45. – № 5. – P. 639-643.
111. Masuda, N. Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* / N. Masuda, E. Sakagawa, S. Ohya // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2000. – V. 44. – № 9. – P. 2242-2246.
112. Masuda, N. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* / N. Masuda, E. Sakagawa, S. Ohya // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2000. – V. 44. – № 12. – P. 3322-3327.
113. Martínez, J. How are gene sequences analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella* / J. Martínez, L. Martínez, M. Rosenblueth // International Microbiology. – 2010. – V. 7. – № 4. – P. 261-268.
114. McConnell, M. J. Positive predictive value of Leeds *Acinetobacter* medium for environmental surveillance of *Acinetobacter baumannii* / M. J. McConnell, P. Pérez-Romero, J. A. Lepe // Journal of clinical microbiology. – 2011. – V. 49. – № 12. – P. 4416-4416.
115. McKay, G. A. Role of phosphoglucomutase of *Stenotrophomonas maltophilia* in lipopolysaccharide biosynthesis, virulence and antibiotic resistance / G. A. McKay, D. E. Woods, K. L. MacDonald // Infection and immunity. – 2003. – V. 71. – № 6. – P. 3068-3075.
116. Mellmann, A. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species

identification of nonfermenting bacteria / A. Mellmann, J. Cloud, T. Maier // Journal of clinical microbiology. – 2008. – V. 46. – № 6. – P. 1946-1954.

117. Miriagou, V. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues / V. Miriagou, G. Cornaglia, M. Edelstein // Clinical microbiology and infection. – 2010. – V. 16. – Iss. 2. – P. 112-122.

118. Miyasaki, Y. In vitro activity of antibiotic combinations against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* and the effects of their antibiotic resistance determinants / Y. Miyasaki, M. A. Morgan, R. C. Chan // FEMS microbiology letters. – 2012. – V. 328. – № 1. – P. 26-31.

119. Moland, E. S. Occurrence of newer β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 US hospitals / E. S. Moland, J. A. Black, J. Ourada // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2002. – V. 46. – № 12. – P. 3837-3842.

120. Moore, J. E. Development of a Gram-negative selective agar (GNSA) for the detection of Gram-negative microflora in sputa in patients with cystic fibrosis / J. E. Moore, J. Xu, B.C. Millar // Journal of applied microbiology. – 2003. – V. 95. – Iss. 1. – P. 160-166.

121. Mulet, X. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones / X. Mulet, G. Cabot, A. A. Ocampo-Sosa // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2013. – V. 57. – № 11. – P. 5527-5535.

122. Mulvey, M. R., Simor, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? // Canadian Medical Association Journal. – 2009. – V. 180. – № 4. – P. 408-415.

123. Murray, P. R. What is new in clinical microbiology – microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology // The Journal of Molecular Diagnostics. – 2012. – V. 14. – № 5. – P. 419-423.

124. Nikaido, H., Pagès J. M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria // FEMS microbiology reviews. – 2012. – V. 36. – Iss. 2. – P. 340-363.

125. Nikaido, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria // *Seminars in cell & developmental biology*. – 2001. – V. 12. – № 3. – P. 215-223.
126. Nicas, T. I., Hancock R. E. V. Alteration of susceptibility to EDTA, polymyxin B and gentamicin in *Pseudomonas aeruginosa* by divalent cation regulation of outer membrane protein H1 // *Journal of general microbiology*. – 1983. – V. 129. – № 2. – P. 509-517.
127. Nielsen, L. E. IS5 element integration, a novel mechanism for rapid in vivo emergence of tigecycline nonsusceptibility in *Klebsiella pneumoniae* / L. E. Nielsen, E. C. Snedrud, F. Onmus-Leone // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2014. – V. 58. – № 10. – P. 6151-6156.
128. Norton, M. D. Antibiotic resistance acquired through a DNA damage-inducible response in *Acinetobacter baumannii* / M. D. Norton, A. J. Spilkia, V. G. Godoy // *Journal of bacteriology*. – 2013. – V. 195. – № 6. – P. 1335-1345.
129. Oberhardt, M. A. Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / M. A. Oberhardt, J. Puchalka, K. E. Fryer // *Journal of bacteriology*. – 2008. – V. 190. – № 8. – P. 2790-2803.
130. Ochs, M. M. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids / M. M. Ochs, M. P. McCusker, M. Bains // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1999. – V. 43. – № 5. – P. 1085-1090.
131. Oteo, J. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain / J. Oteo, J. M. Hernández, M. Espasa // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2013. – V. 68. – № 2. – P. 317-321.
132. Okazaki, A., Avison M. B. Aph (3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2007. – V. 51. – № 1. – P. 359-360.
133. Oliveira *Stenotrophomonas maltophilia* adherence to epithelial cells and to abiotic surfaces / D. Oliveira-Garcia, M. Dall'Agnol, M. Rosales // *Cellular microbiology*. – 2003. – V. 5. – Iss. 9. – P. 625-636.

134. O'Hara, C. M. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative bacilli // *Clinical microbiology reviews*. – 2005. – V. 18. – № 1. – P. 147-162.
135. Padilla, E. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence / E. Padilla, E. Llobet, A. Doménech-Sánchez // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2010. – V. 54. – № 1. – P. 177-183.
136. Pai, H. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* / H. Pai, C. Kang, J-H. Byeon // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2004. – V. 48. – № 10. – P. 3720-3728.
137. Peleg, A. Y. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria / A. Y. Peleg, D. C. Hooper, A. de Breij // *New England Journal of Medicine*. – 2010. – V. 362. – Iss. 19. – P. 1804-1813.
138. Peleg, A. Y. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen / A. Y. Peleg, H. Seifert, D. L. Paterson // *Clinical microbiology reviews*. – 2008. – V. 21. – № 3. – P. 538-582.
139. Perez, F. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* / F. Perez, A. M. Hujer, K. M. Hujer // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2007. – V. 51. – № 10. – P. 3471-3484.
140. Pitout, J. D. D. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community / J. D. D. Pitout, P. Nordmann, K. B. Laupland // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2005. – V. 56. – № 1. – P. 52-59.
141. Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors // *Clinical microbiology reviews*. – 1998. – V. 11. – № 4. – P. 589-603.
142. Poirel, L. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods / L. Poirel, R. A. Bonnin, P. Nordmann // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2012. – V. 12. – № 5. – P. 883-893.

143. Poirel, L. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae* / L. Poirel, C. Héritier, V. Tolün // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2004. – V. 48. – № 1. – P. 15-22.
144. Prashanth, K., Badrinath S. Simplified phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* spp. and their antimicrobial susceptibility status // *Journal of medical microbiology*. – 2000. – V. 49. – № 9. – P. 773-778.
145. Pucci, M. J., Bush K. Investigational antimicrobial agents of 2013 // *Clinical microbiology reviews*. – 2013. – V. 26. – № 4. – P. 792-821.
146. Quale, J. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates / J. Quale, S. Bratu, J. Gupta // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2006. – V. 50. – № 5. – P. 1633-1641.
147. Rai, M. K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug resistant bacteria // *Journal of applied microbiology*. – 2012. – V. 112. – Iss. 5. – P. 841-852.
148. Reichling, J. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral and cytotoxic properties-an overview / J. Reichling, P. Schnitzler, U. Suschke // *Research in Complementary Medicine*. – 2009. – V. 16. – № 2. – P. 79-90.
149. Rice, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE // *Journal of infectious diseases*. – 2008. – V. 197. – № 8. – P. 1079-1081.
150. Roca, I. First identification and characterization of an AdeABC-like efflux pump in *Acinetobacter* genomospecies 13TU / I. Roca, P. Espinal, S. Martí // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2011. – V. 55. – № 3. – P. 1285-1286.
151. Rodríguez-Martínez, J. M. Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii* / J. M. Rodríguez-Martínez, P. Nordmann, E. Ronco // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2010. – V. 54. – № 8. – P. 3484-3488.
152. Ruiz, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2003. – V. 51. – № 5. – P. 1109-1117.

153. Rumbo, C. Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* / C. Rumbo, M. López, C. Ruiz de Alegría // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2013. – V. 57. – № 11. – P. 5247-5257.
154. Russo, T. A. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* / T. A. Russo, R. Olson, U. Mac Donald // Infection and immunity. – 2014. – V. 82. – № 6. – P. 2356-2367.
155. Russo, T. A. The K1 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* is a potential therapeutic target via passive immunization / T. A. Russo, J. M. Beanan, R. Olson // Infection and immunity. – 2013. – V. 81. – № 3. – P. 915-922.
157. Sacha, P. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics / P. Sacha, P. Wieczorek, T. Hauschild // Folia Histochemica et cytobiologica. – 2008. – V. 46. – № 2. – P. 137-136.
158. Sahl, J. W. Evolution of a pathogen: a comparative genomics analysis identifies a genetic pathway to pathogenesis in *Acinetobacter* / J. W. Sahl, J. D. Gillece, J. M. Schupp // PLoS One. – 2013. – V. 8. – Iss. 1. – Art. e54287. – P. 1-10.
159. Schairer, D. O. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents / D. O. Schairer, J. S. Chouake, J. D. Nosanchuk // Virulence – 2012. – V. 3. – Iss. 3. – P. 271-279.
160. Schito, G. C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* // Clinical microbiology and infection. – 2006. – V. 12. – № S1. – P. 3-8.
161. Schroll, C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation / C. Schroll, K. B. Barken, K. A. Krogfelt // BMC microbiology. – 2010. – V. 10. – Art.179. – P. 1-10.
162. Shankar, R. A novel antibacterial gene transfer treatment for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-induced burn sepsis / R. Shankar, L.K. He, A. Szilagyi // Journal of burn care & research. – 2007. – V. 28. – Iss. 1. – P. 6-12.

163. Sikkema J., De Bont J. A., Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons // *Microbiological reviews*. – 1995. – V. 59. – № 2. – P. 201222.
164. Silva, F. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry / F. Silva, S. Ferreira, J. A. Queiroz // *J. Med Microbiol*. – 2011. – V. 60. – № 10. – P. 1479-1486.
165. Snitkin, E. S. Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing / E. S. Snitkin, A. M. Zelazny, P. J. Thomas // *Science translational medicine*. – 2012. – V. 4. – Iss. 148. – P. 148-158.
166. Souli, M. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe / M. Souli, I. Galani, H. Giamarellou // *Euro surveill*. – 2008. – V. 13. – Iss. 47. – P. 584-594.
167. Spilker, T. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients / T. Spilker, T. Coenye, P. Vandamme // *Journal of clinical microbiology*. – 2004. – V. 42. – № 5. – P. 2074-2079.
168. Stover, C. K. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen / C. K. Stover, X. Q. Pham, A. L. Erwin // *Nature*. – 2000. – V. 406. – P. 959-964.
169. Strateva, T. *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance / T. Strateva, D. Yordanov // *Journal of medical microbiology*. – 2009. – V. 58. – № 9. – P. 1133-1148.
170. Sun, Y. The emergence of clinical resistance to tigecycline / Y. Sun, Y. Cai, X. Liu // *International journal of antimicrobial agents*. – 2013. – V. 41. – Iss. 2. – P. 110-116.
171. Svensson-Stadler, L. A., Mihaylova S. A., Moore E. R. B. *Stenotrophomonas* interspecies differentiation and identification by gyrB sequence analysis // *FEMS microbiology letters*. – 2012. – V. 327. – № 1. – P. 15-24.
172. Tada, T. Identification of a Novel 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase, AAC (6')-Iak, from a Multidrug-Resistant Clinical Isolate of *Stenotrophomonas maltophilia* / T. Tada, T. Miyoshi-Akiyama, R. K. Dahal // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2014. – V. 58. – № 10. – P. 6324-6327.

173. Talbot, G. H. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America / G. H. Talbot, J. Bradley, J. E. Edwards // *Clinical infectious diseases*. – 2006. – V. 42. – Iss. 5. – P. 657-668.
174. Thapa, D., Sensitivity of pathogenic and commensal bacteria from the human colon to essential oils / D. Thapa, R. Losa, B. Zweifel // *Microbiology*. – 2012. – V. 158. – № 11. – P. 2870-2877.
175. Thomson J. M., Bonomo R. A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril! // *Current opinion in microbiology*. – 2005. – V. 8. – № 5. – P. 518-524.
176. Thomas-Virnig, C. L. Inhibition of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by nonviral expression of hCAP-18 in a bioengineered human skin tissue / C. L. Thomas-Virnig, J. M. Centanni, C. E. Johnston // *Molecular Therapy*. – 2009. – V. 17. – № 3. – P. 562-569.
177. Toleman, M. A. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes / M. A. Toleman, P. M. Bennett, D. M.C. Bennett // *Emerging infectious diseases*. – 2007. – V. 13. – № 4. – P. 559.
178. Torella, J. P. Optimal Drug Synergy in Antimicrobial Treatments / J. P. Torella, R. Chait R., R. Kishony // *PLoS One. Comput Biology*. – 2010. – V. 6. – Iss. 6. Art. e1000796. – P. 1-10.
179. Touchon, M. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences / M. Touchon, J. Cury, E-J. Yoon // *Genome biology and evolution*. – 2014. – V. 6. – № 10. – P. 2866-2882.
180. Travassos, L. H. Phenotypic properties, drug susceptibility and genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains from seven hospitals in Rio de Janeiro, Brazil / L. H. Travassos, M. N. Pinheiro, F. S. Coelho // *Journal of applied microbiology*. – 2004. – V. 96. – № 5. – P. 1143-1150.

181. Trombetta, D. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes / D. Trombetta, F. Castelli, M. G. Sarpietro // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2005. – V. 49. – № 6. – P. 2474-2478.
182. Turrientes, M. C. Polymorphic mutation frequencies of clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* populations / M. C. Turrientes, M. R. Baquero, M. B. Sánchez // *Applied and environmental microbiology*. – 2010. – V. 76. – № 6. – P. 1746-1758.
183. Tzouvelekis, L. S. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions / L. S. Tzouvelekis, A. Markogiannakis, M. Psychogiou // *Clinical microbiology reviews*. – 2012. – V. 25. – № 4. – P. 682-707.
184. Tzouvelekis, L. S. KPC-producing, multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 as a typical opportunistic pathogen / L. S. Tzouvelekis, V. Miriagou, S. D. Kotsakis // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – V. 57. – № 10. – P. 5144-5146.
185. Vaara, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane // *Microbiological reviews*. – 1992. – V. 56. – № 3. – P. 395-411.
186. Valdezate, S. Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains / S. Valdezate, A. Vindel, E. Loza // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2001. – V. 45. – № 5. – P. 1581-1584.
187. Vakulenko S. B., Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future // *Clinical microbiology reviews*. – 2003. – V. 16. – № 3. – P. 430-450.
188. Veen, S. Q., Claas, E. C. J., Kuijper, E. J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories // *Journal of clinical microbiology*. – 2010. – V. 48. – № 3. – P. 900-907.
189. Visalli, M. A. AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis* / M. A. Visalli, E. Murphy, S. J. Projan // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2003. – V. 47. – № 2. – P. 665-669.

190. Vitek 2 – Compact. Software. Version V2S R-07.01. 19.02.14 // User guide. – BioMerieux. – 2014. – P. 1-452.
191. Wachino, J., Arakawa, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update / J. Wachino, Y. Arakawa // Drug Resistance Updates. – 2012. – V. 15. – № 3. – P. 133-148.
192. Walters, M. C. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin / M. C. Walters, F. Roe, A. Bugnicourt // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2003. – V. 47. – № 1. – P. 317–323.
193. Walsh, T. R. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? / T. R. Walsh, M. A. Toleman, L. Poirel // Clinical microbiology reviews. – 2005. – V. 18. – № 2. – P. 306–325.
194. Walsh, T. R., MacGowan, A. P., Bennett, P. M. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1997. – V. 41. – № 7. – P. 1460–1464.
195. Walsh T. R., Toleman M. A. The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2012. – V. 67. – № 1. – P. 1-3.
196. Walther-Rasmussen, J., Høiby, N. Class A carbapenemases // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2007. – V. 60. – № 3. – P. 470-482.
197. Wang, J. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques / J. Wang, Z. Ruan, Ye Feng // PLoS One. – 2014. – V. 9. – Iss. 8. – Art. e104882. – P. 23-34.
198. Wang, J. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* / J. Wang, B. Hu, M. Xu // International journal of molecular medicine. – 2006. – V. 17. – № 2. – P. 309-317.
199. Weinstein, R. A., Gaynes, R., Edwards, J. R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli // Clinical Infectious Diseases. – 2005. – V. 41. – №. 6. – P. 848-854.

200. Weldhagen, G. F., Poirel, L., Nordmann, P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2003. – V. 47. – № 8. – P. 2385-2392.
201. Widmer, F. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples / F. Widmer, R. J. Seidler, P. M. Gillevet // Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – V. 64. – № 7. – P. 2545-2553.
202. Williams, J. J., Hergenrother, P. J. Artificial activation of toxin–antitoxin systems as an antibacterial strategy // Trends in microbiology. – 2012. – V. 20. – № 6. – P. 291-298.
203. Windhorst, S. The Major Extracellular Protease of the Nosocomial Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* Characterization of the protein and molecular cloning of the gene / S. Windhorst, E. Frank, D. N. Georgieva // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – V. 277. – № 13. – P. 11042-11049.
204. Wilharm, G. DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces / G. Wilharm, J. Piesker, M. Laue // Journal of bacteriology. – 2013. – V. 195. – № 18. – P. 4146-4153.
205. Woodford, N., Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance / N. Woodford, J. F. Turton, D. M. Livermore // FEMS microbiology reviews. – 2011. – V. 35. – № 5. – P. 736-755.
206. World Health Organization (WHO) Drug resistance // Available at URL: http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/ – 2011. – 25/11/2015.
207. Yahav D. Efficacy and safety of tigecycline: a systematic review and meta-analysis / D. Yahav, A. Lador, M. Paul // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2011. – V. 66. – № 9. – P. 1963-1971.
208. Yang, H. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii* / H. Yang, L. Liang, S. Lin // BMC microbiology. – 2010. – V. 10. – № 1. – P. 131.
209. Yigit, H. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* / H. Yigit, A. M. Queenan, G. J.

Anderson // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2001. – V. 45. – № 4. – P. 1151-1161.

210. Yong, D. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India / D. Yong, M. A. Toleman, C. G. Giske // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2009. – V. 53. – № 12. – P. 5046-5054.

211. Zhang, L., Li X-Z., Poole K. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2001. – V. 45. – № 12. – P. 3497-3503.

212. Zhu, H. Eliciting antibiotics active against the ESKAPE pathogens in a collection of actinomycetes isolated from mountain soils / H. Zhu, J. Swierstra, C. Wu // Microbiology. – 2014. – V. 160. – № 8. – P. 1714-1725.

213. Penwell, W. F., Arivett, B. A., Actis, L. A. The *Acinetobacter baumannii* entA gene located outside the acinetobactin cluster is critical for siderophore production, iron acquisition and virulence // PloS one. – 2012. – V. 7. – Iss. 5. – Art. e36493. – P. 1-12.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Качественный и количественный состав эфирных масел

Таблица 1. Компонентный состав исследуемых образцов эфирного масла мяты

Сорт	Массовая доля основных компонентов, %							
	в ментолсинтезирующих сортах				в нементольных сортах			
	ментон	изоментон	свободный ментол	общий ментол	линалоол	линалил-ацетат	карвон	лимонен
Заграва	7,0	5,3	64,9	72,9	-	-	-	2,2
Украинская перечная	22,0	7,0	25,2	31,7	-	-	-	3,3
Прилукская карвонная	-	-	-	-	-	-	51,5	23,5
Оksamитовая	-	-	-	-	81,6	5,1	-	0,5
Бергамотная	-	-	-	-	68,4	15,6	-	0,1

Таблица 2. Основной компонентный состав исследуемых образцов эфирных масел различного происхождения

Название эфирного масла	Массовая доля основных компонентов, %						
	борнилацетат	гераниол	нерол	цитронеллол	линалоол	циннол	β -фенил-этанол
Лаванда	-	-	-	-	35,0	26,9	-
Розовое дерево	-	-	-	-	85,0	7,0	-
Роза крымская	-	12,1	2,7	-	-	-	81,5
Роза болгарская	-	18,5	8,7	27,0	-	-	3,5
Эвкалипт (обр. 1)	-	-	-	-	-	70,0	-
Эвкалипт (обр. 2)	-	-	-	-	-	50,0	-
Пихта	45,0	-	-	-	-	-	-

Примечание: состав сопутствующих компонентов эфирных масел: лаванды – гераниол, цитраль, борнеол, альфа-пинен; розового дерева – альфа-пинен, нерол, гераниол, лимонен цитраль; эвкалипта – альфа-пинен; пихты – камфен, альфа-пинен.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Биохимическая идентификация грамотрицательных бактерий

Таблица 1. Биохимическая идентификация *K. pneumoniae* *

№ п/п	Тесты	НР				ТР				ВР	
		Р	%	Р	%	Р	%	Р	%	Р	%
1	Ala-Phe-Pro-ариламидаза					-	100,0				
2	D-адонитол	-	2,2			+	97,8				
3	L-пирролидонариламидаза					+	100,0				
4	L-арабит					-	100,0				
5	D-целлобиоза					+	100,0				
6	Бета-галактозидаза					+	100,0				
7	Продукция H ₂ S	+	2,2			-	97,8				
8	Бета-N-ацетилглюкозаминидаза	+	5,0			-	95,5				
9	Глутамилариламидаза рNA	+	3,9			-	96,1				
10	D-глюкоза					+	100,0				
11	Гамма-глутамилтрансфераза					+	95,0			-	5,0
12	Сбраживание глюкозы					+	100,0				
13	Бета-глюкозидаза					+	100,0				
14	D-мальтоза					+	100,0				
15	D-маннит					+	100,0				
16	D-манноза					+	100,0				
17	Бета-ксилозидаза	-	3,9			+	96,1				
18	Бета-аланинариламидаза					-	100,0				
19	L-пролинариламидаза					-	72,8			+	27,2
20	Липаза					-	100,0				
21	Палатиноза					+	100,0				
22	Тирозинариламидаза					+	87,8			-	12,2
23	Уреаза	-	33,3	(-)	5,0	+	61,7				
24	D-сорбит					+	100,0				
25	Сахароза					+	100,0				
26	D-тагатоza					-	57,8			+	42,2
27	D-трегалоза					+	100,0				
28	Цитрат натрия					+	100,0				
29	Малонат					+	100,0				
30	5-кето-D-глюконат	+	1,1			-	98,9				
31	L-лактат, подщелачивание					+	100,0				
32	Альфа-глюкозидаза					-	100,0				
33	Сукцинат, подщелачивание					+	92,8			-	7,2
34	Бета-N-ацетилгалактозаминидаза					-	100,0				
35	Альфа-галактозидаза					+	100,0				
36	Фосфатаза					+	100,0				
37	Глицинариламидаза					+	75,6			-	24,4
38	Орнитиндекарбоксилаза	+	3,9			-	96,1				
39	Лизиндекарбоксилаза	-	1,1			+	98,1				
40	L-гистидин, ассимиляция					-	90,0			+	10,0
41	Кумарат					-	91,7			+	8,3
42	Бета-Г-глюкуронидаза	+	3,9			-	95,0	(-)	1,1		
43	O/129 устойчивость					+	100,0				
44	Glu-Gly-Arg-ариламидаза					-	100,0				
45	L-малат ассимиляция					-	87,2			+	12,8
46	Эллман	+	5,0			-	92,8	(-)	2,2		
47	L-лактат, ассимиляция					-	93,9			+	6,1

* – условные обозначения см. в конце следующей таблицы.

Таблица 2. Биохимическая идентификация *E.coli*

№ п/п	Тест	НР				ТР		ВР	
		Р	%	Р	%	Р	%	Р	%
1	Аla-Phe-Pro-ариламидаза					-	100,0		
2	D-адонитол					-	100,0		
3	L-пирролидонариламидаза					-	100,0		
4	L-арабит					-	100,0		
5	D-целлобиоза					-	100,0		
6	Бета-галактозидаза					+	97,3	-	2,7
7	Продукция H ₂ S					-	100,0		
8	Бета-N-ацетилглюкозаминидаза					-	100,0		
9	Глютаминариламидаза рNA					-	100,0		
10	D-глюкоза					+	100,0		
11	Гамма-глутамилтрансфераза					-	85,8	+	14,2
12	Сбраживание глюкозы					+	100,0		
13	Бета-глюкозидаза					-	100,0		
14	D-мальтоза					+	100,0		
15	D-маннит					+	100,0		
16	D-манноза					+	100,0		
17	Бета-ксилозидаза					-	100,0		
18	Бета-аланинариламидаза					-	100,0		
19	L-пролинариламидаза					-	62,8	+	37,2
20	Липаза					-	100,0		
21	Палатиноза					-	100,0		
22	Тирозинариламидаза					+	83,0	-	17,0
23	Уреаза	+	23,0			-	77,0		
24	D-сорбит					+	100,0		
25	Сахароза					+	71,7	-	28,3
26	D-тагатоза	+	5,3			-	94,7		
27	D-трегалоза					+	100,0		
28	Цитрат натрия					-	100,0		
29	Малонат					-	100,0		
30	5-кето-D-глюконат					-	77,0	+	23,0
31	L-лактат, подщелачивание					+	62,8	-	37,2
32	Альфа-глюкозидаза					-	100,0		
33	Сукцинат, подщелачивание					+	83,0	-	17,0
34	Бета-N-ацетилгалактозаминидаза					-	100,0		
35	Альфа-галактозидаза					+	97,3	-	2,7
36	Фосфатаза	-	48,6	(-)	14,2	+	37,2		
37	Глицинариламидаза					+	51,4	-	48,6
38	Орнитиндекарбоксилаза					+	88,5	-	11,5
39	Лизиндекарбоксилаза	-	25,7			+	74,3		
40	L-гистидин, ассимиляция					-	100,0		
41	Кумарат					+	100,0		
42	Бета-Г-глюкуронидаза	-	2,7	(-)	17,0	+	80,3		
43	O/129 устойчивость					+	88,5	-	11,5
44	Glu-Gly-Arg-ариламидаза					-	100,0		
45	L-малат ассимиляция					-	97,3	+	2,7
46	Элман					+	94,7	-	5,3
47	L-лактат, ассимиляция					-	97,3	+	2,7

Примечание: цветом выделены тесты, совпадающие с тестами Определителя бактерий Берджи, 1997 г.; "+" – положительная реакция "-" – отрицательная реакция, "(-)" – слабоотрицательная реакция, "(+)" – слабоположительная реакция; типичные реакции (ТР), нетипичные реакции (НР), вариабельные реакции (ВР); тип реакции (Р), % - доля изолятов, проявляющих реакцию.

Таблица 3. Биохимическая идентификация *E. cloacae*

№ п/п	Тесты	НР				ТР				ВР	
		Р	%	Р	%	Р	%	Р	%	Р	%
1	Ala-Phe-Pro-ариламидаза					-	100,0				
2	D-адонитол					-	50,0			+	50,0
3	L-пирролидонариламидаза					-	100,0				
4	L-арабит					-	100,0				
5	D-целлобиоза					+	100,0				
6	Бета-галактозидаза					+	100,0				
7	Продукция H ₂ S					-	100,0				
8	Бета-N-ацетилглюкозаминидаза	-	4,8			+	95,2				
9	Глютаминариламидаза рNA					-	100,0				
10	D-глюкоза					+	100,0				
11	Гамма-глутамилтрансфераза					+	78,6			-	21,4
12	Сбраживание глюкозы					+	95,2			-	4,8
13	Бета-глюкозидаза					-	88,1			+	11,9
14	D-мальтоза					+	95,2			-	4,8
15	D-маннит					+	100,0				
16	D-манноза					+	100,0				
17	Бета-ксилозидаза	-	16,7			+	83,3				
18	Бета-аланинариламидаза					-	100,0				
19	L-пролинариламидаза					+	50,0			-	50,0
20	Липаза					-	100,0				
21	Палатиноза	-	4,8			+	95,2				
22	Тирозинариламидаза					+	95,2			-	4,8
23	Уреаза	+	11,9			-	88,1				
24	D-сорбит	-	11,9			+	88,1				
25	Сахароза					+	100,0				
26	D-тагатоza					-	100,0				
27	D-трегалоза					+	100,0				
28	Цитрат натрия					+	100,0				
29	Малонат					+	88,1			-	11,9
30	5-кето-D-глюконат					-	100,0				
31	L-лактат, подщелачивание					+	100,0				
32	Альфа-глюкозидаза					-	100,0				
33	Сукцинат, подщелачивание					+	100,0				
34	Бета-N-					+	100,0				
35	Альфа-галактозидаза	-	16,7			+	83,3				
36	Фосфатаза					-	83,3			+	16,7
37	Глицинариламидаза					+	83,3			-	16,7
38	Орнитиндекарбоксилаза					+	100,0				
39	Лизиндекарбоксилаза					-	100,0				
40	L-гистидин, ассимиляция					-	95,2			(+)	4,8
41	Кумарат	+	4,8			-	95,2				
42	Бета-Глюкуронидаза					-	95,2	(-)	4,8		
43	O/129 устойчивость					+	100,0				
44	Glu-Gly-Arg-ариламидаза					-	100,0				
45	L-малат ассимиляция					-	95,2			+	4,8
46	Эллман					-	95,2	(-)	4,8		
47	L-лактат, ассимиляция					-	95,2			+	4,8

Примечание: цветом выделены тесты, совпадающие с тестами Определителя бактерий Берджи, 1997 г.; "+" – положительная реакция "-" – отрицательная реакция, "(-)" – слабоотрицательная реакция, "(+)" – слабоположительная реакция; типичные реакции (ТР), нетипичные реакции (НР), вариабельные реакции (ВР); тип реакции (Р), % - доля изолятов, проявляющих реакцию.

Таблица 4. Биохимическая идентификация *P. aeruginosa*

№ п/п	Тесты	НР				ТР				ВР	
		Р	%	Р	%	Р	%	Р	%	Р	%
1	Ala-Phe-Pro-ариламидаза	+	5,7			-	94,3				
2	D-адонитол					-	100,0				
3	L-пирролидонариламидаза					-	97,4	(-)	2,6		
4	L-арабит					-	100,0				
5	D-целлобиоза					-	100,0				
6	Бета-галактозидаза	+	2,6			-	97,4				
7	Продукция H ₂ S					-	100,0				
8	Бета-N-ацетилглюкозаминидаза					-	100,0				
9	Глютаминариламидаза рNA					+	55,5			-	44,5
10	D-глюкоза					+	100,0				
11	Гамма-глутамилтрансфераза					+	100,0				
12	Сбраживание глюкозы					-	100,0				
13	Бета-глюкозидаза					-	97,4	(-)	2,6		
14	D-мальтоза					-	100,0				
15	D-маннит					+	33,2			-	66,8
16	D-манноза	-	28,0	(-)	2,6	+	69,4				
17	Бета-ксилозидаза					-	100,0				
18	Бета-аланинариламидаза					+	100,0				
19	L-пролинариламидаза					+	100,0				
20	Липаза					+	58,5			-	41,5
21	Палатиноза					-	100,0				
22	Тирозинариламидаза					+	61,1			-	38,9
23	Уреаза	+	22,3	(+)	2,6	-	75,1				
24	D-сорбит					-	100,0				
25	Сахароза					-	100,0				
26	D-тагатоза					-	100,0				
27	D-трегалоза	+	16,6			-	83,4				
28	Цитрат натрия					+	100,0				
29	Малонат					+	97,4			-	2,6
30	5-кето-D-глюконат					-	100,0				
31	L-лактат, подщелачивание					+	94,3			-	5,7
32	Альфа-глюкозидаза					-	100,0				
33	Сукцинат, подщелачивание					+	100,0				
34	Бета-N-					-	100,0				
35	Альфа-галактозидаза					-	97,4	(-)	2,6		
36	Фосфатаза					-	97,4	(-)	2,6		
37	Глицинариламидаза					-	97,4			+	2,6
38	Орнитиндекарбоксилаза					-	100,0				
39	Лизиндекарбоксилаза					-	100,0				
40	L-гистидин, ассимиляция					-	86,0			+	14,0
41	Кумарат					+	89,1			-	10,9
42	Бета-Глюкуронидаза					-	100,0				
43	O/129 устойчивость					+	72,5			-	27,5
44	Glu-Gly-Arg-ариламидаза	+	8,3			-	86,0	(-)	5,7		
45	L-малат ассимиляция					+	91,7			-	8,3
46	Эллман					-	100,0				
47	L-лактат, ассимиляция					+	77,7			-	22,3

Примечание: цветом выделены тесты, совпадающие с тестами Определителя бактерий Берджи, 1997 г.; "+" – положительная реакция "-" – отрицательная реакция, "(-)" – слабоотрицательная реакция, "(+)" – слабоположительная реакция; типичные реакции (ТР), нетипичные реакции (НР), вариабельные реакции (ВР); тип реакции (Р), % - доля изолятов, проявляющих реакцию.

Таблица 5. Биохимическая идентификация *A. baumannii*

№ п/п	Тесты	НР				ТР				ВР	
		Р	%	Р	%	Р	%	Р	%	Р	%
1	Ala-Phe-Pro-ариламидаза					-	98,9			(-)	1,1
2	D-адонитол					-	100,0				
3	L-пирролидонариламидаза					-	98,9			+	1,1
4	L-арабит					-	100,0				
5	D-целлобиоза	-	9,0	(-)	1,1	+	89,9				
6	Бета-галактозидаза					-	100,0				
7	Продукция H ₂ S					-	98,9			+	1,1
8	Бета-N-ацетилглюкозаминидаза					-	100,0				
9	Глютамилариламидаза pNA					+	55,4			-	44,6
10	D-глюкоза					+	100,0				
11	Гамма-глутамилтрансфераза	+	16,9			-	83,1				
12	Сбраживание глюкозы					-	100,0				
13	Бета-глюкозидаза					-	100,0				
14	D-мальтоза					-	100,0				
15	D-маннит					-	100,0				
16	D-манноза					+	100,0				
17	Бета-ксилозидаза					-	100,0				
18	Бета-аланинариламидаза					-	100,0				
19	L-пролинариламидаза					-	87,0			+	13,0
20	Липаза					-	100,0				
21	Палатиноза					-	100,0				
22	Тирозинариламидаза					+	100,0				
23	Уреаза					+	56,0	(+)	2,8	-	41,2
24	D-сорбит					-	100,0				
25	Сахароза					-	100,0				
26	D-тагатоza					-	98,9			+	1,1
27	D-трегалоза					-	98,9			+	1,1
28	Цитрат натрия					+	100,0				
29	Малонат					+	98,9			-	1,1
30	5-кето-D-глюконат					+	100,0				
31	L-лактат, подщелачивание					+	100,0				
32	Альфа-глюкозидаза					-	97,2			(-)	2,8
33	Сукцинат, подщелачивание					+	100,0				
34	Бета-N-					-	100,0				
35	Альфа-галактозидаза					-	100,0				
36	Фосфатаза					-	100,0				
37	Глицинариламидаза					-	100,0				
38	Орнитиндекарбоксилаза					-	100,0				
39	Лизиндекарбоксилаза					-	100,0				
40	L-гистидин, ассимиляция					-	61,6			+	38,4
41	Кумарат					+	93,8			-	6,2
42	Бета-Г-глюкуронидаза					-	100,0				
43	O/129 устойчивость	-	23,2	(-)	3,9	+	72,9				
44	Glu-Gly-Arg-ариламидаза					-	96,1			(+)	3,9
45	L-малат ассимиляция					+	67,8			-	32,2
46	Элман	+	41,2			-	53,7	(-)	5,1		
47	L-лактат, ассимиляция					+	67,8			-	32,2

Примечание: цветом выделены тесты, совпадающие с тестами Определителя бактерий Берджи, 1997 г.; "+" – положительная реакция "-" – отрицательная реакция, "(-)" – слабоотрицательная реакция, "(+)" – слабоположительная реакция; типичные реакции (ТР), нетипичные реакции (НР), вариабельные реакции (ВР); тип реакции (Р), % - доля изолятов, проявляющих реакцию.

Таблица 6. Биохимическая идентификация *S. maltophilia*

№ п/п	Тесты	НР				ТР				ВР	
		Р	%	Р	%	Р	%	Р	%	Р	%
1	Ала-Phe-Pro-ариламидаза					+	100,0				
2	D-адонитол					+	100,0				
3	L-пирролидонариламидаза					-	100,0				
4	L-арабит					-	100,0				
5	D-целлобиоза					-	100,0				
6	Бета-галактозидаза					-	100,0				
7	Продукция H ₂ S					-	100,0				
8	Бета-N-					+	53,0			-	47,0
9	Глютамилариламидаза рNA					-	100,0				
10	D-глюкоза					-	100,0				
11	Гамма-глютамилтрансфераза					+	100,0				
12	Сбраживание глюкозы					-	100,0				
13	Бета-глюкозидаза	-	20,5			+	77,1	(+)	2,4		
14	D-мальтоза					-	97,6			+	2,4
15	D-маннит					-	100,0				
16	D-манноза	+	2,4			-	97,6				
17	Бета-ксилозидаза					-	97,6	(-)	2,4		
18	Бета-аланинариламидаза					-	100,0				
19	L-пролинариламидаза					+	100,0				
20	Липаза					+	91,6			-	8,4
21	Палатиноза					-	100,0				
22	Тирозинариламидаза					-	100,0				
23	Уреаза	+	14,5			-	85,5				
24	D-сорбит					-	100,0				
25	Сахароза					-	100,0				
26	D-тагатоza					-	100,0				
27	D-трегалоза					-	100,0				
28	Цитрат натрия					+	97,6			-	2,4
29	Малонат					-	82,0			+	18,0
30	5-кето-D-глюконат					-	100,0				
31	L-лактат, подщелачивание					+	97,6			-	2,4
32	Альфа-глюкозидаза					+	71,0			-	29,0
33	Сукцинат, подщелачивание					+	97,6			-	2,4
34	Бета-N-					-	100,0				
35	Альфа-галактозидаза					-	100,0				
36	Фосфатаза					+	100,0				
37	Глицинариламидаза					-	100,0				
38	Орнитиндекарбоксилаза					-	100,0				
39	Лизиндекарбоксилаза	+	2,4			-	97,6				
40	L-гистидин, ассимиляция					-	100,0				
41	Кумарат					-	100,0				
42	Бета-Г глюкуронидаза					-	100,0				
43	O/129 устойчивость					-	100,0				
44	Glu-Gly-Arg-ариламидаза	-	47,0	(-)	2,4	+	50,6				
45	L-малат ассимиляция					-	100,0				
46	Эллман					-	100,0				
47	L-лактат, ассимиляция					-	100,0				

Примечание: цветом выделены тесты, совпадающие с тестами Определителя бактерий Берджи, 1997 г.; "+" – положительная реакция "-" – отрицательная реакция, "(-)" – слабоотрицательная реакция, "(+)" – слабоположительная реакция; типичные реакции (ТР), нетипичные реакции (НР), варьируемые реакции (ВР); тип реакции (Р), % - доля изолятов, проявляющих реакцию.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Биохимическая идентификация грамположительных бактерий

Таблица 1. Биохимическая идентификация *S. haemolyticus* *

№ п/п	Тесты	НР		ТР				ВР	
		Р	%	Р	%	Р	%	Р	%
1	D-амигдалин			-	100,0				
2	Фосфатидилинозитфосфолипаза			-	100,0				
3	5 D-ксилоза			-	100,0				
4	Аргининдигидролаза			+	100,0				
5	Бета-галактозидаза	+	64,7	-	35,3				
6	Альфа-глюкозидаза			-	74,6	(-)	7,8	+	17,6
7	13 Ala-Phe-Pro-ариламидаза			-	100,0				
8	Циклодекстрин			-	100,0				
9	L-Аспартатариламидаза			-	100,0				
10	Бета-галактопиранозидаза			-	100,0				
11	Альфа-маннозидаза			-	100,0				
12	Фосфатаза			-	100,0				
13	Лейцинариламидаза			-	100,0				
14	L-Пролинариламидаза			-	100,0				
15	Бета-глюкуронидаза			-	100,0				
16	Альфа-галактозидаза			-	100,0				
17	L-пирролидонилариламидаза			+	100,0				
18	Бета-глюкуронидаза			-	100,0				
19	Аланинариламидаза			-	100,0				
20	Тирозинариламидаза			-	100,0				
21	D-сорбит			-	100,0				
22	Уреаза	+	3,9	-	96,1				
23	Устойчивость к полимиксину В			-	100,0				
24	D-галактоза			+	86,3			-	13,7
25	D-рибоза			+	86,3			-	13,7
26	L-лактат, подщелачивание			+	90,2			-	9,8
27	Лактоза			+	100,0				
28	N-ацетил-D-глюкозамин	-	29,4	+	70,6				
29	D-мальтоза			+	100,0				
30	Устойчивость к бацитрацину			+	86,3			-	13,7
31	Устойчивость к новобиоцину	+	13,7	-	86,3				
32	Рост при 6,5% NaCl			+	92,2			-	7,8
33	D-маннит			-	74,5			+	25,5
34	D-манноза			-	100,0				
35	Метил-β-D-глюкопиранозид			-	100,0				
36	Пуллулан			-	100,0				
37	D-рафиноза			-	100,0				
38	Устойчивость к O/129 (вибриостатический агент)			+	90,2			-	9,8
39	Салицин			-	100,0				
40	Сахароза			+	100,0				
41	D-трегалоза	-	17,6	+	82,4				
42	Аргининдигиролаза	+	15,7	-	84,3				
43	Устойчивость к оптохину			+	96,1			-	3,9

* – условные обозначения см. в конце таблицы 2.

Таблица 2. Биохимическая идентификация *S.aureus*

№ п/п	Тесты	НР				ТР		ВР	
		Р	%	Р	%	Р	%	Р	%
1	D-амигдалин					-	100,0		
2	Фосфатидилинозитфосфолипаза					-	100,0		
3	5 D-ксилоза					-	100,0		
4	Аргининдигидролаза					+	100,0		
5	Бета-галактозидаза					+	59,8	-	40,2
6	Альфа-глюкозидаза	-	9,8			+	90,2		
7	13 Ala-Phe-Pro-ариламидаза					-	100,0		
8	Циклодекстрин					-	100,0		
9	L-Аспартатариламидаза					-	100,0		
10	Бета-галактопиранозидаза					-	100,0		
11	Альфа-маннозидаза					-	100,0		
12	Фосфатаза					+	100,0		
13	Лейцинариламидаза	+	2,2			-	87,8		
14	L-Пролинариламидаза					-	100,0		
15	Бета-глюкуронидаза					-	100,0		
16	Альфа-галактозидаза					-	100,0		
17	L-пирролидонилариламидаза					+	100,0		
18	Бета-глюкуронидаза					-	100,0		
19	Аланинариламидаза					-	100,0		
20	Тирозинариламидаза					-	100,0		
21	D-сорбит					-	100,0		
22	Уреаза	+	34,8			-	65,2		
23	Устойчивость к полимиксину В					-	75,0	+	25,0
24	D-галактоза					+	69,6	-	30,4
25	D-рибоза					-	69,6	+	30,4
26	L-лактат, подщелачивание					+	100,0		
27	Лактоза					+	69,6	-	30,4
28	N-ацетил-D-глюкозамин					+	75,0	-	25,0
29	D-мальтоза					+	100,0		
30	Устойчивость к бацитрацину					+	100,0		
31	Устойчивость к новобиоцину	+	15,2	(+)	9,8	-	75%		
32	Рост при 6,5% NaCl					+	100,0		
33	D-маннит					+	100,0		
34	D-манноза					+	100,0		
35	Метил-β-D-глюкопиранозид					+	100,0		
36	Пуллулан					-	100,0		
37	D-рафиноза					-	100,0		
38	Устойчивость к O/129 (вибриостатический агент)					+	100,0		
39	Салицин					-	100,0		
40	Сахароза					+	100,0		
41	D-трегалоза					+	94,6	-	5,4
42	Аргининдигиролаза					+	55,4	-	44,6
43	Устойчивость к оптохину					+	100,0		

Примечание: цветом выделены тесты, совпадающие с тестами Определителя бактерий Берджи, 1997 г.; “+” – положительная реакция “-” – отрицательная реакция, “(-)” – слабоотрицательная реакция, “(+)” – слабоположительная реакция; типичные реакции (ТР), нетипичные реакции (НР), вариабельные реакции (ВР); тип реакции (Р), % - доля изолятов, проявляющих реакцию.

Таблица 3. Биохимическая идентификация *S. epidermidis*

№ п/п	Тесты	НР		ТР				ВР	
		Р	%	Р	%	Р	%	Р	%
1	D-амигдалин			-	100,0				
2	Фосфатидилинозитфосфолипаза			-	100,0				
3	5 D-ксилоза			-	100,0				
4	Аргининдигидролаза			+	100,0				
5	Бета-галактозидаза			+	63,7			-	36,3
6	Альфа-глюкозидаза	+	46,7	-	43,0	(-)	10,3		
7	13 Ala-Phe-Pro-ариламидаза			-	100,0				
8	Циклодекстрин			-	100,0				
9	L-Аспартатариламидаза			-	100,0				
10	Бета-галактопиранозидаза			-	100,0				
11	Альфа-маннозидаза			-	100,0				
12	Фосфатаза			+	53,3	(+)	13,3	-	33,3
13	Лейцинариламидаза			-	100,0				
14	L-Пролинариламидаза			-	100,0				
15	Бета-глюкуронидаза			-	100,0				
16	Альфа-галактозидаза			-	100,0				
17	L-пирролидонилариламидаза			-	100,0				
18	Бета-глюкуронидаза			-	100,0				
19	Аланинариламидаза	+	3,0	-	97,0				
20	Тирозинариламидаза			-	100,0				
21	D-сорбит			-	100,0				
22	Уреаза	-	10,3	+	89,7				
23	Устойчивость к полимиксину В			+	57,0			-	43,0
24	D-галактоза			+	80,0			-	20,0
25	D-рибоза	+	3,0	-	97,0				
26	L-лактат, подщелачивание			+	89,7			-	10,3
27	Лактоза			+	89,7			-	10,3
28	N-ацетил-D-глюкозамин			-	100,0				
29	D-мальтоза	-	3,0	+	97,0				
30	Устойчивость к бацитрацину	-	13,3	+	86,7				
31	Устойчивость к новобиоцину	+	17,0	-	83,0				
32	Рост при 6,5% NaCl			+	100,0				
33	D-маннит			-	100,0				
34	D-манноза			-	77,0			+	23,0
35	Метил-β-D-глюкопиранозид			-	100,0				
36	Пуллулан			-	100,0				
37	D-рафиноза			-	100,0				
38	Устойчивость к O/129 (вибриостатический агент)	-	17,0	+	83,0				
39	Салицин			-	100,0				
40	Сахароза			+	100,0				
41	D-трегалоза			-	100,0				
42	Аргининдигиролаза			-	57,0			+	43,0
43	Устойчивость к оптохину			+	100,0				

Примечание: цветом выделены тесты, совпадающие с тестами Определителя бактерий Берджи, 1997 г.; “+” – положительная реакция “-” – отрицательная реакция, “(-)” – слабоотрицательная реакция, “(+)” – слабоположительная реакция; типичные реакции (ТР), нетипичные реакции (НР), переменные реакции (ВР); тип реакции (Р), % - доля изолятов, проявляющих реакцию.

Таблица 3. Биохимическая идентификация *S. pneumoniae*

№ п/п	Тесты	НР		ТР				ВР	
		Р	%	Р	%	Р	%	Р	%
1	D-амигдалин	+	6,6	-	93,4				
2	Фосфатидилинозитфосфолипаза			-	100,0				
3	5 D-ксилоза			-	100,0				
4	Аргининдигидролаза			-	100,0				
5	Бета-галактозидаза	-	29,5	+	85,2				
6	Альфа-глюкозидаза			+	96,7			(-)	3,3
7	13 Ala-Phe-Pro-ариламидаза			+	100,0				
8	Циклодекстрин			-	100,0				
9	L-Аспартатариламидаза			-	100,0				
10	Бета-галактопиранозидаза	-	26,2	+	73,8				
11	Альфа-маннозидаза			-	100,0				
12	Фосфатаза			-	100,0				
13	Лейцинариламидаза			+	100,0				
14	L-Пролинариламидаза			-	100,0				
15	Бета-глюкуронидаза			-	100,0				
16	Альфа-галактозидаза	-	39,3	+	60,7				
17	L-пирролидонилариламидаза			+	100,0				
18	Бета-глюкуронидаза			-	100,0				
19	Аланинариламидаза			+	100,0				
20	Тирозинариламидаза			+	100,0				
21	D-сорбит			-	100,0				
22	Уреаза			-	100,0				
23	Устойчивость к полимиксину В			+	100,0				
24	D-галактоза	-	16,4	+	83,6				
25	D-рибоза			-	100,0				
26	L-лактат, подщелачивание			-	100,0				
27	Лактоза			+	96,7	(+)	3,3		
28	N-ацетил-D-глюкозамин	-	39,3	+	60,7				
29	D-мальтоза	-	16,4	+	83,6				
30	Устойчивость к бацитрацину			-	100,0				
31	Устойчивость к новобиоцину			-	100,0				
32	Рост при 6,5% NaCl			-	100,0				
33	D-маннит			-	100,0				
34	D-манноза			+	83,6			(-)	16,4
35	Метил-β-D-глюкопиранозид			-	100,0				
36	Пуллулан	+	6,6	-	93,4				
37	D-рафиноза			-	80,3			+	19,7
38	Устойчивость к O/129 (вибриостатический агент)			-	100,0				
39	Салицин			-	100,0				
40	Сахароза			+	100,0				
41	D-трегалоза			-	90,2			+	9,8
42	Аргининдигиролаза			-	100,0				
43	Устойчивость к оптохину	+	3,3	-	96,7				

Примечание: цветом выделены тесты, совпадающие с тестами Определителя бактерий Берджи, 1997 г.; “+” – положительная реакция “-” – отрицательная реакция, “(-)” – слабоотрицательная реакция, “(+)” – слабоположительная реакция; типичные реакции (ТР), нетипичные реакции (НР), вариабельные реакции (ВР); тип реакции (Р), % - доля изолятов, проявляющих реакцию

Таблица 4. Биохимическая идентификация *E. faecalis*

№ п/п	Тесты	НР		ТР		ВР	
		Р	%	Р	%	Р	%
1	D-амигдалин			+	100,0		
2	Фосфатидилинозитфосфолипаза			-	100,0		
3	5 D-ксилоза			-	100,0		
4	Аргининдигидролаза			+	100,0		
5	Бета-галактозидаза			-	100,0		
6	Альфа-глюкозидаза			+	90,0	-	10,0
7	13 Ala-Phe-Pro-ариламидаза			-	100,0		
8	Циклодекстрин			+	100,0		
9	L-Аспартатариламидаза			+	100,0		
10	Бета-галактопиранозидаза			-	100,0		
11	Альфа-маннозидаза			-	100,0		
12	Фосфатаза			-	100,0		
13	Лейцинариламидаза	+	30,0	-	70,0		
14	L-Пролинариламидаза			-	100,0		
15	Бета-глюкуронидаза	+	10,0	-	90,0		
16	Альфа-галактозидаза			-	100,0		
17	L-пирролидонилариламидаза			+	100,0		
18	Бета-глюкуронидаза	+	10,0	-	90,0		
19	Аланинариламидаза	-	50,0	+	50,0		
20	Тирозинариламидаза			+	78,6	-	21,4
21	D-сорбит			+	90,0	-	10,0
22	Уреаза	+	30,0	-	70,0		
23	Устойчивость к полимиксину В			+	70,0	-	30,0
24	D-галактоза			+	90,0	-	10,0
25	D-рибоза			+	100,0		
26	L-лактат, подщелачивание	+	10,0	-	90,0		
27	Лактоза			+	80,0	-	20,0
28	N-ацетил-D-глюкозамин			+	100,0		
29	D-мальтоза			+	100,0		
30	Устойчивость к бацитрацину			+	100,0		
31	Устойчивость к новобиоцину			+	80,0	-	20,0
32	Рост при 6,5% NaCl			+	100,0		
33	D-маннит			+	100,0		
34	D-манноза			+	100,0		
35	Метил-β-D-глюкопиранозид			+	90,0	-	10,0
36	Пулулан			-	100,0		
37	D-рафиноза			-	100,0		
38	Устойчивость к O/129 (вибриостатический агент)			-	90,0	+	10,0
39	Салицин			+	100,0		
40	Сахароза			+	100,0		
41	D-трегалоза			+	100,0		
42	Аргининдигиролаза			+	100,0		
43	Устойчивость к оптохину			+	100,0		

Примечание: “+” – положительная реакция “-” – отрицательная реакция, “(-)” – слабоотрицательная реакция, “(+)” – слабоположительная реакция; типичные реакции (ТР), нетипичные реакции (НР), переменные реакции (ВР); тип реакции (Р), % - доля изолятов, проявляющих реакцию.

Таблица 5. Биохимическая идентификация *E. faecium*

№ п/п	Тесты	НР		ТР		ВР	
		Р	%	Р	%	Р	%
1	D-амигдалин	+	2,0	-	98,0		
2	Фосфатидилинозитфосфолипаза				100,0		
3	5 D-ксилоза				100,0		
4	Аргининдигидролаза				100,0		
5	Бета-галактозидаза				100,0		
6	Альфа-глюкозидаза	+	3,0	-	97,0		
7	13 Ala-Phe-Pro-ариламидаза				100,0		
8	Циклодекстрин				100,0		
9	L-Аспартатариламидаза				100,0		
10	Бета-галактопиранозидаза				100,0		
11	Альфа-маннозидаза				100,0		
12	Фосфатаза				100,0		
13	Лейцинариламидаза				100,0		
14	L-Пролинариламидаза				100,0		
15	Бета-глюкуронидаза				100,0		
16	Альфа-галактозидаза				100,0		
17	L-пирролидонилариламидаза				100,0		
18	Бета-глюкуронидаза				100,0		
19	Аланинариламидаза				100,0		
20	Тирозинариламидаза				100,0		
21	D-сорбит	+	26,0	-	74,0		
22	Уреаза				100,0		
23	Устойчивость к полимиксину В				100,0		
24	D-галактоза				100,0		
25	D-рибоза				100,0		
26	L-лактат, подщелачивание	-	2,0	+	98,0		
27	Лактоза				100,0		
28	N-ацетил-D-глюкозамин				100,0		
29	D-мальтоза				100,0		
30	Устойчивость к бацитрацину				100,0		
31	Устойчивость к новобиоцину				100,0		
32	Рост при 6,5% NaCl				100,0		
33	D-маннит				100,0		
34	D-манноза				100,0		
35	Метил-β-D-глюкопиранозид				100,0		
36	Пуллулан				100,0		
37	D-рафиноза				100,0		
38	Устойчивость к O/129 (вибриостатический агент)				100,0		
39	Салицин				100,0		
40	Сахароза				100,0		
41	D-трегалоза				100,0		
42	Аргининдигиролаза				100,0		
43	Устойчивость к оптохину				100,0		

Примечание: “+” – положительная реакция “-” – отрицательная реакция, “(-)” – слабоотрицательная реакция, “(+)” – слабоположительная реакция; типичные реакции (ТР), нетипичные реакции (НР), переменные реакции (ВР); тип реакции (Р), % - доля изолятов, проявляющих реакцию.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Антибактериальная активность сочетаний эфирных масел с антибиотиками

Таблица 1. Антибактериальная активность эфирных масел в сочетании с антибиотиками в отношении *S. maltophilia*

Название антибиотика или сочетания антибиотика и эфирного масла	Зона задержки роста антибиотика (АБ) или комбинации АБ и ЭМ, мм		Коэффициент вариации, %
	lim	$(\bar{x} \pm \sigma)$	
Триметоприм/сульфаметоксазол	15,0...26,0	21,8 $\pm$ 3,0	14,0
Мята сорта Бергамотная + SXT	7,0...18,0	12,0 $\pm$ 4,6	38,6
Мята Оксамитовая + SXT	15,0...19,0	17,0 $\pm$ 1,4	8,3
Мята Украинская перечная + SXT	18,0...23,0	19,7 $\pm$ 2,0	10,4
Роза крымская + SXT	16,0...24,0	21,0 $\pm$ 3,1	14,8
Эвкалипт + SXT	15,0...17,0	16,0 $\pm$ 1,0	6,3
Лаванда + SXT	9,0...10,0	9,3 $\pm$ 0,5	5,1
Тигециклин (TGC)	22,0...27,0	24,7 $\pm$ 2,1	8,5
Мята сорта Бергамотная + TGC	15,0...26,0	21,7 $\pm$ 5,4	24,9
Мята Оксамитовая + TGC	17,0...27,0	22,0 $\pm$ 3,8	17,3
Мята Украинская перечная + TGC	19,0...25,0	22,7 $\pm$ 2,3	10,0
Роза крымская + TGC	16,0...26,0	21,0 $\pm$ 5,0	23,8
Эвкалипт (обр. 1) + TGC	18,0...19,0	18,3 $\pm$ 0,5	2,7
Лаванда + TGC	17,0	17,0 $\pm$ 0,0	0,0
Розовое дерево + TGC	20,0	20,0 $\pm$ 0,0	0,0
Левифлоксацин (LEV)	17,0...25,0	20,0 $\pm$ 2,4	12
Мята сорта Бергамотная + LEV	15,0...17,0	15,7 $\pm$ 0,9	6,0
Мята Оксамитовая + LEV	13,0...19,0	16,2 $\pm$ 2,4	14,7
Мята Украинская перечная + LEV	15,0...17,0	16,0 $\pm$ 1,0	6,2
Роза крымская + LEV	20,0...26,0	23,0 $\pm$ 4,2	18,3
Эвкалипт (обр. 1) + LEV	8,0...20,0	15,0 $\pm$ 5,1	33,9
Лаванда + LEV	17,0...27,0	20,7 $\pm$ 4,5	21,5
Розовое дерево + LEV	21,0	21,0 $\pm$ 0,0	0,0
Тикарциллин/ клавуланат (TIM)	10,0...12,0	11,0 $\pm$ 0,6	5,7
Мята сорта Бергамотная + TIM	9,0...11,0	10,0 $\pm$ 0,7	7,0
Мята Оксамитовая + TIM	11,0...14,0	12,25 $\pm$ 1,1	8,9
Мята Украинская перечная + TIM	10,0...13,0	11,5 $\pm$ 1,1	9,7
Роза крымская + TIM	11,0...14,0	12,4 $\pm$ 1,0	8,1
Эвкалипт (обр. 1) + TIM	10,0...11,0	10,3 $\pm$ 0,5	4,6
Лаванда + TIM	10,0	10,0 $\pm$ 0,0	0,0
Розовое дерево + TIM	18,0...19,0	18,5 $\pm$ 0,5	2,7
Хлорамфеникол (C)	7,0...9,0	7,9 $\pm$ 0,8	10,7
Мята сорта Бергамотная + C	9,0	9,0 $\pm$ 0,0	0,0
Мята Оксамитовая + TIM	10,0...11,0	10,7 $\pm$ 0,8	7,3
Мята Украинская перечная + C	9,0...13,0	11,0 $\pm$ 2,0	18,2
Роза крымская + C	12,0...13,0	12,5 $\pm$ 0,5	4,0
Эвкалипт (обр. 1) + C	8,0...13,0	10,0 $\pm$ 2,2	21,6
Лаванда + C	10,0	10,0 $\pm$ 0,0	0,0

Таблица 2. Антибактериальная активность эфирных масел в сочетании с антибиотиками в отношении *A. baumannii*

Название антибиотика или сочетания антибиотика и эфирного масла	Зона задержки роста антибиотика (АБ) или комбинации АБ и ЭМ, мм		Коэффициент вариации, %
	lim	$(\bar{x} \pm \sigma)$	
Цефтазидим (CAZ)	6,0	6,0$\pm$0,0	0,0
Мята сорта Заграва + CAZ	8,0...9,0	8,3 $\pm$ 0,5	5,7
Мята сорта Бергамотная + CAZ	6,0...7,0	6,5 $\pm$ 0,4	6,3
Мята сорта Оксамитовая + CAZ	6,0...9,0	7,6 $\pm$ 1,1	14,4
Роза крымская + CAZ	6,0...7,0	6,2 $\pm$ 0,4	6,4
Эвкалипт (обр. 1) + CAZ	7,5	7,5 $\pm$ 0,0	0,0
Лаванда + CAZ	6,0	6,0 $\pm$ 0,0	0,0
Розовое дерево + CAZ	6,0...7,0	6,5 $\pm$ 0,5	7,7
Цефепим (FEP)	6,0...11,0	7,5$\pm$2,1	28,5
Мята сорта Заграва + FEP	9,0...10,0	9,3 $\pm$ 0,5	5,0
Мята сорта Бергамотная + FEP	6,0...11,0	8,8 $\pm$ 1,9	21,9
Мята сорта Оксамитовая + FEP	6,0...8,0	7,6 $\pm$ 0,9	12,9
Цефоперазон/сульбактам (SCF)	12,0...21,0	15,1$\pm$2,7	17,9
Мята сорта Заграва + SCF	9,0...15,0	12,0 $\pm$ 2,2	18,6
Мята сорта Бергамотная + SCF	12,0...17,0	15,0 $\pm$ 2,2	14,4
Мята сорта Оксамитовая + SCF	8,0...15,0	12,3 $\pm$ 2,6	21,1
Азтреонам (ATM)	6,0	6,0$\pm$0,0	0,0
Мята сорта Заграва + ATM	7,0...13,0	9,0 $\pm$ 2,3	26,0
Мята сорта Бергамотная + ATM	6,0...8,0	7,0 $\pm$ 0,7	10,1
Мята Оксамитовая + ATM	6,0...10,0	8,8 $\pm$ 1,5	16,7
Ципрофлоксацин (CIP)	6,0	6,0$\pm$0,0	0,0
Мята сорта Заграва + CIP	8,0...14,0	9,8 $\pm$ 2,5	25,5
Мята сорта Бергамотная + CIP	6,0...7,0	6,6 $\pm$ 0,5	7,0
Мята сорта Оксамитовая + CIP	6,0...9,0	7,0 $\pm$ 1,0	14,3
Роза крымская + CIP	6,0...8,0	7,2 $\pm$ 0,7	9,7
Эвкалипт (обр. 1) + CIP	6,5...7,0	6,8 $\pm$ 0,3	4,4
Лаванда + CIP	7,0	7,0 $\pm$ 0,0	0,0
Розовое дерево + CIP	6,0	6,0 $\pm$ 0,0	0,0

Таблица 2. Антибактериальная активность эфирных масел в сочетании с антибиотиками в отношении *A. baumannii* (продолжение)

Название антибиотика или сочетания антибиотика и эфирного масла	Зона задержки роста антибиотика (АБ) или комбинации АБ и ЭМ, мм		Коэффициент вариации, %
	lim	$(\bar{x} \pm \sigma)$	
Тигециклин (TGC)	12,0...17,0	13,9$\pm$1,6	11,7
Мята сорта Заграва + TGC	9,0...11,0	10,2 $\pm$ 0,5	4,9
Мята сорта Бергамотная + TGC	7,0...14,0	9,6 $\pm$ 3,0	32,0
Мята сорта Оксамитовая + TGC	9,0...14,0	11,5 $\pm$ 2,0	17,9
Роза крымская + TGC	7,0...8,0	8,8 $\pm$ 1,4	15,9
Эвкалипт (обр. 1) + TGC	8,5	8,5 $\pm$ 0,0	0,0
Лаванда + TGC	8,5...9,0	8,8 $\pm$ 0,3	3,4
Импинем (IPM)	6,0	6,0$\pm$0,0	0,0
Мята сорта Заграва + IPM	7,0...10,0	8,3 $\pm$ 1,2	15,0
Мята сорта Бергамотная + IPM	6,0...7,0	6,6 $\pm$ 0,5	7,1
Мята сорта Оксамитовая + IPM	6,0...13,0	8,8 $\pm$ 2,0	23,9
Роза крымская + IPM	7,0	7,0 $\pm$ 0	0
Эвкалипт (обр. 1) + IPM	7,5...8,0	7,8 $\pm$ 0,3	3,8
Лаванда + IPM	7,0	7,0 $\pm$ 0,0	0,0
Розовое дерево + IPM	6,0	6,0 $\pm$ 0,0	0,0
Меропенем (MEM)	6,0	6,0$\pm$0,0	0,0
Мята сорта Заграва + MEM	10,0...18	13,25 $\pm$ 2,9	22,2
Мята сорта Бергамотная + MEM	6,0...15,0	10,5 $\pm$ 4,0	38,4
Мята сорта Оксамитовая + MEM	6,0...16,0	12,2 $\pm$ 3,5	29,0
Нетилмицин (NET)	6,0	6,0$\pm$0,0	0,0
Мята сорта Заграва + NET	9,0...17,0	15,25 $\pm$ 4,0	26,4
Мята сорта Бергамотная + NET	6,0...17,0	11,25 $\pm$ 4,8	42,8
Мята сорта Оксамитовая + NET	6,0...19,0	11,9 $\pm$ 4,7	39,1
Роза крымская + NET	7,0...8,0	7,7 $\pm$ 0,4	5,2
Эвкалипт (обр. 1) + NET	7,0...8,0	7,5 $\pm$ 0,5	6,7
Лаванда + NET	6,0	6,0 $\pm$ 0,0	0,0
Розовое дерево + NET	8,0...9,0	8,5 $\pm$ 0,5	5,9
Амикацин	6,0	6,0$\pm$0,0	0,0
Мята сорта Заграва + АК	8,0...14,0	10,6 $\pm$ 2,5	23,4
Мята сорта Бергамотная + АК	6,0...7,0	6,6 $\pm$ 0,5	7,0
Мята сорта Оксамитовая + АК	6,0...16,0	11,0 $\pm$ 3,8	34,6

Таблица 3. Антибактериальная активность эфирных масел в сочетании с антибиотиками в отношении *Pseudomonas aeruginosa*

Название антибиотика или сочетания антибиотика и эфирного масла	Зона задержки роста антибиотика (АБ) или комбинации АБ и ЭМ, мм		Коэффициент вариации, %
	lim	$(\bar{x} \pm \sigma)$	
Цефтазидим (CAZ)	6,0...15,0	11,3$\pm$3,8	33,6
Мята Украинская перечная + CAZ	6,0	6,0	0,0
Мята сорта Бергамотная + CAZ	6,0	6,0	0,0
Мята сорта Оксамитовая + CAZ	6,0...14,0	16,5 $\pm$ 6,5	39,7
Роза крымская + CAZ	6,5...15,0	10,5 $\pm$ 3,6	34,3
Эвкалипт (обр. 1) + CAZ	8,0...9,5	8,8 $\pm$ 0,6	6,8
Лаванда + CAZ	8,0...9,5	8,8 $\pm$ 0,6	6,8
Розовое дерево + CAZ	15,0...17,0	16,0 $\pm$ 1,0	6,3
Цефепим (FEP)	14,0...15,0	14,5$\pm$0,5	3,4
Мята Украинская перечная + FEP	6,0	6,0 $\pm$ 0,0	0,0
Мята сорта Бергамотная + FEP	14,0	14,0 $\pm$ 0,0	0,0
Мята сорта Оксамитовая + FEP	14,0	14,0 $\pm$ 0,0	0,0
Меропенем (MEM)	6,0...17,0	12,0$\pm$4,0	33,3
Мята Украинская перечная + MEM	7,0	7,0 $\pm$ 0,0	0,0
Мята сорта Бергамотная + MEM	6,0	6,0 $\pm$ 0,0	0,0
Мята сорта Оксамитовая + MEM	6,0...17,0	14,4 $\pm$ 4,7	32,6
Роза крымская + MEM	7,0...14,0	9,1 $\pm$ 2,8	30,8
Эвкалипт (обр. 1) + MEM	12,5...15,0	13,5 $\pm$ 1,5	11,1
Лаванда + MEM	9,0...11,5	10,3 $\pm$ 1,5	14,6
Розовое дерево + MEM	14,0...16,0	15,0 $\pm$ 1,0	6,7
Ципрофлоксацин (CIP)	6,0...11,0	8,8$\pm$2,4	27,3
Мята Украинская перечная + CIP	6,0	6,0 $\pm$ 0,0	0,0
Мята сорта Бергамотная + CIP	7,0	7,0 $\pm$ 0,0	0,0
Мята сорта Оксамитовая + CIP	6,0...7,0	7,7 $\pm$ 1,1	14,3
Роза крымская + CIP	7,0...11,0	8,7 $\pm$ 1,5	17,2
Эвкалипт (обр. 1) + CIP	8,0...9,0	8,5 $\pm$ 0,5	5,9
Лаванда + CIP	6,0	6,0 $\pm$ 0,0	0,0
Розовое дерево + CIP	7,0...8,0	7,5 $\pm$ 0,5	6,7
Амикацин (AK)	11,0...21,0	16,7$\pm$4,5	26,9
Мята Украинская перечная + АК	8,0	8,0 $\pm$ 0,0	0,0
Мята сорта Бергамотная + АК	8,0	8,0 $\pm$ 0,0	0,0
Мята сорта Оксамитовая + АК	8,0...19,0	16,4 $\pm$ 4,4	26,8
Роза крымская + АК	17,5...18,5	18,0 $\pm$ 0,5	2,8
Эвкалипт (обр. 1) + АК	17,5...18,5	18,0 $\pm$ 0,5	2,8
Лаванда + АК	6,0...6,5	6,3 $\pm$ 0,3	4,8
Розовое дерево + АК	17,0	17,0 $\pm$ 0,0	0,0
Азтреонам (ATM)	21,0...22,0	21,5$\pm$0,5	2,3
Роза крымская + ATM	17,0	17,0 $\pm$ 0	0
Эвкалипт (обр. 1) + ATM	18,0...19,0	18,5 $\pm$ 0,5	2,7

Таблица 4. Антибактериальная активность эфирных масел в сочетании с антибиотиками в отношении *K. pneumoniae*

Название антибиотика или сочетания антибиотика и эфирного масла	Зона задержки роста антибиотика (АБ) или комбинации АБ и ЭМ, мм		Коэффициент вариации, %
	lim	$(\bar{x} \pm \sigma)$	
Ципрофлоксацин (CIP)	6,0...7,0	6,1±0,3	4,9
Мята сорта Оксамитовая + CIP	6,0...11,0	8,0±1,9	23,7
Роза крымская + CIP	6,0...10,5	7,8±0,9	11,5
Эвкалипт (обр. 2) + CIP	6,5...7,5	7,0±0,5	7,1
Лаванда + CIP	6,5	6,5±0,0	0,0
Розовое дерево + CIP	7,0...8,0	7,5±0,5	6,7
Тигециклин (TGC)	18,0...22,5	20,2±1,3	6,4
Мята сорта Украинская перечная +	13,0...15,0	14,0±1,0	7,1
Мята сорта Бергамотная + TGC	12,0...13,0	12,5±0,5	4,0
Мята сорта Оксамитовая + TGC	13,0...17,0	15,0±1,6	10,7
Роза крымская + TGC	8,0...18,0	11,3±3,5	30,9
Эвкалипт (обр. 2) + TGC	19,0...19,5	19,3±0,2	1,2
Лаванда + TGC	7,5...8,0	7,8±0,2	3,0
Розовое дерево + TGC	18,0...19,0	18,5±0,5	2,7
Эртапенем (ETP)	20,0...25,0	22,4±1,7	7,6
Мята сорта Украинская перечная + ETP	22,0...23,0	22,5±0,5	2,2
Мята сорта Бергамотная + ETP	22,0	22,0±0,0	0,0
Мята сорта Оксамитовая + ETP	20,0...22,0	20,8±0,7	3,4
Роза крымская + ETP	8,5...22,0	20,4±0,8	3,9
Эвкалипт (обр. 2) + ETP	19,0	19,0±0,0	0,0
Лаванда + ETP	20,0...21,0	20,5±0,5	2,4
Розовое дерево + ETP	15,0...19,0	17,2±1,5	8,6
Цефепим (FEP)	10,5...12,0	11,5±0,6	5,0
Мята сорта Украинская перечная + FEP	11,0...12,0	11,5±0,5	4,35
Мята сорта Бергамотная + FEP	9,0...11,0	10,0±1,0	10,0
Мята сорта Оксамитовая + FEP	11,0	11,0±0,0	0,0
Роза крымская + FEP	8,5...9,0	8,8±0,2	2,3
Эвкалипт (обр. 2) + FEP	9,0...10,0	9,5±0,5	5,3
Лаванда + FEP	8,0...9,5	8,8±0,6	7,1
Амикацин (AK)	19,0...20,0	19,6±0,1	0,7
Мята сорта Украинская перечная + AK	15,0...17,0	16,0±1,0	6,2
Мята сорта Бергамотная + AK	15,0...16,0	15,5±0,5	3,2
Мята сорта Оксамитовая + AK	16,0...17,0	16,5±0,5	3,0
Роза крымская + AK	16,0...17,0	16,5±0,4	2,4
Эвкалипт (обр. 2) + AK	16,0...17,0	16,5±0,5	3,0
Лаванда + AK	16,0...16,5	16,3±0,3	1,6