

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМ. М.І. ПИРОГОВА  
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

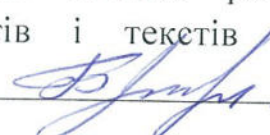
**Буркот Віта Михайлівна**

УДК:579.84:504.064

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
ХАРАКТЕРИСТИКА ВПЛИВУ ЧИННИКІВ ОТОЧУЮЧОГО  
СЕРЕДОВИЩА НА БІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ  
ГРАМНЕГАТИВНИХ НЕФЕРМЕНТУЮЧИХ БАКТЕРІЙ

091 – біологія

Подається на здобуття ступеня доктора філософії з галузі 09 «Біологія»

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текетів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  В. М. Буркот

Науковий керівник – Ковальчук Валентин Петрович, завідувач кафедри мікробіології ВНМУ ім. М. І. Пирогова, доктор медичних наук, професор

Вінниця - 2021

## АНОТАЦІЯ

*Буркот В.М.* Характеристика впливучинників оточуючого середовища на біологічну активність грамнегативних неферментуючих бактерій. -Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія». – Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2021.

До групи грамнегативних неферментуючих бактерій (ГНБ) на сьогодні належать понад 30 біологічних видів, серед яких є небезпечні збудники захворювань людей, питома вага яких у етіологічній структурі опортуністичних інфекцій в останні роки неспинно зростає. Останні десятиріччя ознаменувались збільшенням кількості захворювань, спричинених представниками родів *Pseudomonas* та *Acinetobacter*. Тому Всесвітня організація охорони здоров'я віднесла *P. aeruginosa* та *A.baumannii* до групи «пріоритетних патогенів», які несуть найбільшу загрозу для здоров'я людини. Дослідження біологічних властивостей цих видів мікроорганізмів сприятимуть розробці методів боротьби з ними.

У дисертаційній роботі досліджено біологічні властивості штамів псевдомонад і ацінетобактерій, виділених від пацієнтів з опіковими і мінно-вибуховими ранами. Всього в процесі досліджень було виділено, ідентифіковано і досліджено властивості 81 штаму НФГНБ. У експериментальних дослідженнях використовували 75 штамів мікроорганізмів, а саме: 35 штамів *Acinetobacterbaummanii* та 40 штамів *Pseudomonasaeruginosa*.

Досліджено морфологічні, тинкторіальні, культуральні та біохімічні ознаки виділених культур бактерій, їх чутливість до широкого спектру сучасних антибіотиків. Вивчено вплив складу поживного середовища, рН середовища, температури культивування, підвищеного осмотичного тиску та зниженого атмосферного тиску на біоплівкоутворюючу здатність клінічних ізолятів *A.baumannii* та *P.aeruginosa*.

Проведено визначення первинної структури нуклеотидних послідовностей генетичного матеріалу та ідентифіковано гени резистентності до антибіотиків. Методом пасажування мікроорганізмів у м'ясо-пептонному бульйоні з наростаючими концентраціями антибіотиків визначено швидкість формування стійкості у штучних умовах штамами-носіями різних генетичних детермінант резистентності.

Результати досліджень здатності до плівкоутворення виділеними штамами *P. aeruginosa* та *A. baumannii* продемонстрували суттєві міжвидові та міжштамові відмінності. Псевдомонади виявляли достовірно вищу здатність до плівкоутворення, у порівнянні з ацінетобактеріями. Представники обох видів неферментуючих бактерій найбільш активно утворювали біоплівки при наявності у середовищі білків сироватки крові.

Дослідження інтенсивності плівкоутворення при різних температурах культивування дозволило виявити різницю оптимальних умов для розвитку цього процесу у *P. aeruginosa* та *A. baumannii*. Найвищий рівень інтенсивності плівкоутворення *P. aeruginosa* виявляли при температурі 27°C. У *A. baumannii* плівкоутворення було найбільш інтенсивним при температурі культивування 32°C. Дослідження впливу рН середовища культивування на плівкоутворюючу активність неферментуючих бактерій показало, що ацінетобактерії і псевдомонади різко зменшують здатність утворювати плівки в кислому середовищі. Експериментально доведено зростання плівкоутворювальної активності неферментуючих бактерій в умовах зниженого атмосферного тиску.

Відповідно до стандартів EUCAST до немультirezистентних (nMDR) належало 8,6 % виділених штамів *A. baumannii*. Переважна більшість (71,4 %) досліджених ацінетобактерій належало до групи мультirezистентних (MDR). У *P. aeruginosa* MDR-штамів було менше за рахунок зсуву на користь групи штамів з розширеною резистентністю (XDR), відносна кількість яких становила 42,5 %. Серед ацінетобактерій показник належності до XDR-штамів дорівнював 20%. Крім того, серед псевдомонад 5 % штамів належало до панрезистентних (PDR), тоді як серед *A. baumannii* таких варіантів не виявлено.

Проведене мультилокуснесіквенс-типуювання дозволило виявити серед виділених штамів неферментуючих бактерій варіанти, що належали до міжнародних клонів високого епідемічного ризику. Так, 40 % досліджених штамів *A. baumannii* належали до сіквенс-типу ST78 за схемою Pasteur. Серед досліджених штамів *P. aeruginosa* було виявлено представників двох глобальних клонів високого ризику, а саме: ST235 (4 штами) та ST1047 (3 штами). Всього у досліджених госпітальних штамів ацетобактерій встановлено наявність 14, а у псевдомонад – 22 генетичних детермінант продукції різних бета-лактамаз. Окремі штами псевдомонад виявились носіями генів, відповідальних за синтез метало-бета-лактамаз blaIMP-34 та blaVIM-2. Було встановлено, що стійкість до антибіотиків аміноглікозидного ряду у бактерій обох видів обумовлена наявністю генів аміноглікозид-ацетилтрансфераз (*aac*), аміноглікозид-аденілтрансфераз (*ant*, *aad*) та аміноглікозид-фосфотрансфераз (*aph*). Нами виявлено 18 варіантів таких генетичних детермінант у псевдомонад, і 11 – у ацетобактерій.

Встановлено, що, навіть у штамів *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, які не мають генів синтезу руйнівних для аміноглікозидів ферментів, при культивуванні у середовищах з наростаючими концентраціями антибіотика формування стійкості до амікацину відбувається швидше, ніж формування стійкості до меропенему. Доведено, що у псевдомонад у штучних умовах адаптація до високих концентрацій левофлоксацину відбувається швидше, ніж до концентрацій амікацину.

**Ключові слова:** неферментуючі грамнегативні бактерії, інфекційні ускладнення, біоплівки, антибіотики, антибіотикорезистентність.

## SUMMARY

**Burkot V.M.** Characteristics of the environmental factors influence on gram-negative non-fermenting bacteria' biological activity - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 09 "Biology" in the specialty 091 "Biology". - Vinnytsya National Pirogov Memorial Medical University. Ministry of Health, Ukraine, Vinnytsya, 2021.

Today, group of gram-negative non-fermenting bacteria includes more than 30 biological species (GNB), some of them are dangerous pathogens causing human diseases and their share in the etiological structure of opportunistic infections has been steadily growing in recent years. An increase of diseases number caused by members belonging to *Pseudomonas* and *Acinetobacter* genera have seen recent decades. Therefore, the World Health Organization has classified *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* as "priority pathogens" that pose the greatest threat to human health.

Studies of biological properties of these microorganisms' species will contribute to the development of methods to control them.

In this dissertation the biological properties of pseudomonads and acinetobacteria strains isolated from patients with burn and mine wounds investigated. In total, the properties of 81 gram-negative bacteria strains were isolated, identified and studied during the research. 75 strains of microorganisms were used in experimental studies, namely: 35 strains of *A. baumannii* and 40 strains of *P. aeruginosa*.

Morphological, tinctorial, cultural and biochemical features of isolated bacteria, their sensitivity to a wide range of modern antibiotics have been studied. The influence of nutrient media composition, medium pH, cultivation temperature, increased osmotic pressure and reduced atmospheric pressure on the biofilm forming ability of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* clinical isolates was studied. The primary structure of nucleotide sequences of genetic material was determined and antibiotic resistance genes were identified. The rate of formation of resistance under artificial conditions by strains-carriers of different genetic resistance determinants was determined by the method of passage of microorganisms in meat-peptone broth with increasing concentrations of antibiotics.

The results of studies selected strains of *P. aeruginosa* and *A. baumannii* showed significant interspecies and interstrains differences of their ability to film formation. Pseudomonads demonstrated a significantly higher ability to form a film, compared with acinetobacteria. Representatives of both types of non-fermenting bacteria most actively formed biofilms in the presence of serum proteins in the environment.

The investigation of the *P. aeruginosa* and *A. baumannii* film formation intensity at different cultivation temperatures revealed a difference in the optimal conditions for the

development of this process. The highest level of *P. aeruginosa* film formation intensity was detected at a temperature of 27 °C. In *A. baumannii*, film formation was the most intense at a cultivation temperature of 32 °C. The study of the culture medium pH effect on the non-fermenting bacteria film-forming activity showed that acinetobacteria and pseudomonads reduce the ability to form films in an acidic environment. The growth of non-fermenting bacteria film-forming activity under conditions of reduced atmospheric pressure has been experimentally proved.

According to EUCAST standards, 8.6% of isolated strains of *A. baumannii* belonged to non-multidrug-resistant (nMDR). The vast majority (71.4%) of the studied acinetobacteria belonged to the group of multidrug-resistant (MDR). The number of *P. aeruginosa* MDR strains were less than group of strains with extended resistance (XDR), their relative number was 42.5%. Among acinetobacteria, the rate of belonging to XDR strains was 20%. In addition, among pseudomonads 5% of strains belonged to pan-resistant (PDR), while among *A. baumannii* such variants were not detected.

The conducted multilocus sequence typing allowed to identify among the selected strains of non-fermenting bacteria variants belonging to international clones of high epidemic risk. Thus, 40% of the *A. baumannii* studied strains belong to the sequence type ST78 according to the Pasteur scheme. Among the *P. aeruginosa* studied strains were found representatives of two global high-risk clones, namely: ST235 (4 strains) and ST1047 (3 strains). 14 acinetobacteria genetic determinants and 22 pseudomonads ones of the various beta-lactamases production were found in the studied hospital strains. Some strains of pseudomonads were carriers of genes responsible for the synthesis of metal-beta-lactamases *blaIMP-34* and *blaVIM-2*. Resistance to aminoglycoside antibiotics in bacteria of both species is due to the presence of the aminoglycoside-acetyltransferase (*aac*), aminoglycoside-adenyltransferase (*ant*, *aad*) and aminoglycoside-phosphotransferase (*aph*) genes. 18 variants of such genetic determinants in pseudomonads, and 11 ones in acinetobacteria was found.

It was found that the formation of resistance to amikacin, even in strains of *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, which did not have genes for the synthesis of enzymes destructive to aminoglycosides cultured in media with increasing concentrations of

antibiotic is faster than meropenem. It was proved that in artificial conditions pseudomonads adaptation to high concentrations of levofloxacin occurred faster than to amikacin.

**Key words:** non-fermenting gram-negative bacteria, infectious complications, biofilms, antibiotics, antibiotic resistance

## ПЕРЕЛІК ДРУКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ

1. Протимікробна дія антисептичних препаратів, антибіотиків на збудники запальних захворювань / В. Г. Палій, В. В. Сухляк, Д. В. Палій, О. О. Гончар, А. В. Крижановська, Б. М. Береза, В. М. Буркот, П. О. Кравчук, Н. В. Задерей // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. – 2014. – № 22. – С. 44-47. *(Дисертант провела пошук літературних джерел та визначала чутливість мікроорганізмів до антисептиків та антибіотиків)*.

2. Вивчення властивостей мікрофлори опікової поверхні у пацієнтів з опіками / В. І. Нагайчук, О. А. Назарчук, В. Г. Палій, Є. Ф. Макац, В. М. Буркот // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. – Вінниця, 2014. – № 22. – С. 194-199. *(Особистий внесок здобувача – визначення біологічних властивостей мікробіоти та підготовка статті до друку)*.

3. До характеристики сучасних інфекційних ускладнень у хворих з опіками / В. І. Нагайчук, О. А. Назарчук, І. Г. Палій, В. М. Буркот, О. О. Гончар // *Український медичний часопис*. – № 5 (103). – 2014. – С. 123-126. *(Дисертант особисто провела пошук та аналіз літературних джерел за темою роботи, проведено бактеріологічні дослідження)*.

4. Оцінка антибактеріальних та протигрибкових властивостей сучасних антисептиків / Г. К. Палій, О. А. Назарчук, В. В. Бобир, О. О. Гончар, Т. Л. Гридін, Д. В. Палій, І. В. Коваленко, В. М. Буркот // *Мікробіологія і біотехнологія*. – Одеса, 2015. – № 4(32). – С. 67-74. *(Здобувач визначала антибактеріальні та протигрибкові властивості антисептиків)*.

5. Дослідження дії декаметоксину та його лікарських форм на адгезію бактерій / О. О. Гончар, О. А. Назарчук, Д. В. Палій, І. В. Коваленко, О. В. Яцула, В. М. Буркот // *Світ медицини та біології*. – № 4(54). – Полтава, 2015. – С. 109-112. *(Дисертант проводила дослідження адгезивних властивостей мікроорганізмів, аналіз та узагальнення результатів)*.

6. Динаміка утворення біоплівок на поверхні ендотрахеальних інтубаційних трубок *Pseudomonasaeruginosa* та *Acinetobacterbaumannii* / Ю. Ю. Трофіменко, В.



М. Буркот, Є. Ф. Макац // Biomedical and Biosocial Anthropology. – Вінниця, 2016. – № 26. – С. 23-26. *(Особистий внесок здобувача – виділення та ідентифікація збудників, узагальнення результатів).*

7. Аналітичне прогнозування чутливості до фторхінолонів *Pseudomonas aeruginosa*, збудників інфекційних ускладнень / О. А. Назарчук, Д. В. Палій, Н. І. Осадчук, І. В. Коваленко, В. М. Буркот // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 1. - Т. 2 (127). – С. 105-109. *(Дисертант провела літературний пошук, брала участь у дослідженні та написанні статті).*

8. Ефективність антибактеріальної дії антибіотиків, антисептика декаметоксину та псевдомонадного бактеріофагу на клінічні штами *Pseudomonas aeruginosa* / Г. К. Палій, І. М. Вовк, І. М. Коваленко, О. А. Назарчук, В. М. Буркот // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2016. – № 1, Ч. 1, Т. (20). – С. 16-21. *(Дисертант провела пошук літературних джерел та проводила дослідження властивостей декаметоксину та псевдомонадного бактеріофагу).*

9. Біологічні властивості збудників ускладнень у хворих з опіками / В. М. Буркот // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 2, Т. 3 (130). – С. 210-213. *(Автор провела аналіз клінічного дослідження, підготувала матеріали до друку).*

10. Особливості формування резистентності до антибіотиків у грамнегативних неферментуючих бактерій / В. М. Кондратюк, З. М. Прокопчук, В. М. Буркот, І. М. Вовк // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 253-256. *(Особистий внесок здобувача – визначення чутливості збудників до антибіотиків, прогнозування антибіотикочутливості).*

11. Чутливість біоплівкових та планктонних форм неферментуючих бактерій до дії антисептиків / Ю. Ю. Трофіменко, Є. Ф. Макац, О. К. Стукан, В. М. Буркот // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 293-296. *(Особистий внесок здобувача – визначення ефективності антимікробних засобів до неферментуючих бактерій).*

12. Фенотипові і генотипові детермінанти антибіотикорезистентності грамнегативних бактерій – етіологічних чинників інфекційних ускладнень бойових ран / В. П. Ковальчук, В. М. Кондратюк, І. М. Коваленко, В. М. Буркот // Мікробіологічний журнал, 2019. - Т. 81. - № 1. – С. 61-71. *(Особистий внесок здобувача – визначення чутливості збудників до антибіотиків, прогнозування антибіотикочутливості, проведення мікробіологічного та молекулярно-генетичного дослідження детермінант резистентності в бактерій).*

13. Дослідження ефективності використання антисептичних композицій на основі декаметоксину для обробки ендотрахеальних трубок з метою попередження розвитку вентилятор-асоційованої пневмонії у пацієнтів відділення інтенсивної терапії / Ю. Ю. Трофіменко, О. І. Жорняк, Н. С. Фоміна, В. М. Буркот, А. В. Кулик, П. В. Жорняк // Вісник ВНМУ, 2020. - Т. 24. - № 1. – С. 17-19. *(Дисертант проводила дослідження ефективності протимікробних засобів, брала участь в оформленні статті).*

14. Мікробіологічне обґрунтування антимікробного лікування експериментального псевдомонадного кератиту / І. М. Вовк, Н. В. Кривецька, В. М. Буркот, А. О. Дудар, А. В. Кулик // Вісник ВНМУ, 2020. - Т. 24. - № 1. – С. 114-117. *(Дисертант провела пошук літературних джерел та визначала чутливість мікроорганізмів до антисептиків та антибіотиків).*

15. Biofilm forming activity of non-fermenting gram-negative bacteria / Valentyn P. Kovalchuk, Oleksandr A. Nazarchuk, Vita M. Burkot, Nadiia S. Fomina, Zoia M. Prokopchuk, Oleksandr Dobrovanov // Wiadomości Lekarskie, Volume LXXIV, Issue 2, February 2021. – P. 252-256. *(Дисертант проводила експериментальне відтворення біоплівки, аналіз результатів, участь у написанні статті).*

16. Характеристика мікробіоценозу ран у хворих з опіками / В. І. Нагайчук, О. А. Назарчук, В. Г. Палій, Є. Ф. Макац, В. М. Буркот // Довкілля і здоров'я: мат. наук.-практ. конф., 25 квітня 2014 р. – Тернопіль, 2014. – С. 93-95. *(Дисертант визначила біологічні властивості збудників у хворих з опіками, провела аналіз, підготувала тези до друку).*

17. Дослідження ефективності антисептичних засобів щодо збудників

інфекційних ускладнень в хворих з критичними станами / О. А. Назарчук, Д. В. Палій, В. М. Буркот // Матеріали XIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2016». - 7-8 квітня 2016. - Вінниця. – С. 44.*(Особистий внесок здобувача – визначення чутливості збудників до антисептиків, провела аналіз даних).*

18. The research of the qualities in non-enzymatic bacteria, isolated from patients with infectious complications / О. А. Nazarchuk, V. I. Nahaichuk, Yu. J. Saldan, I. V. Kovalenko, V. M. Burkot // II International Scientific Conference Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21<sup>st</sup> century. - April 14 – 15, 2016, Kyiv. - P. 79 – 80. *(Дисертант визначила біологічні властивості збудників у хворих з опіками, провела аналіз, підготувала тези до друку).*

19. Чутливість до антибіотиків грам негативних неферментуючих бактерій, які спричиняють розвиток вентилятор-асоційованої пневмонії / Ю. Ю. Трофіменко, В. М. Буркот // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» 29 січня 2018 р. – Чернівці, 2018. – С. 54-55.*(Особистий внесок здобувача–визначення чутливості збудників до антибіотиків та написання тез).*

20. Плівкоутворення акінетобактерій в присутності антибіотиків / В. П. Ковальчук, В. М. Кондратюк, З. М. Прокопчук, В. М. Буркот // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» 29 січня 2018 р. – Чернівці, 2018. – С. 95-96. *(Дисертант проводила експериментальне відтворення біоплівки, визначення чутливості акінетобактерій до антибіотиків, аналіз та написання тез).*

21. Characteristics of adaptive properties of nonfermenting bacteria / V. P. Kovalchuk, Z. M. Prokopchuk, V. M. Burkot // III International Scientific Conference «Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21<sup>st</sup> century». Abstractsbook. April 19-20, 2018, Kyiv. – P. 60-61.*(Особистий внесок здобувача– дослідження чутливості мікроорганізмів, узагальнення результатів)*

*та оформлення тез).*

22. Швидкість формування антибіотикорезистентності грамнегативними неферментуючими бактеріями / В. М. Буркот, Н. С. Фоміна, О. А. Назарчук, Ю. Ю. Трофіменко // Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека: конференція присвячена пам'яті академіка Л. В. Громашевського та 25-річчю Національної академії медичних наук України, 11-12 жовтня 2018 р., Київ. – С. 40-41. *(Дисертант провела пошук літературних джерел та проведення мікробіологічного та молекулярно-генетичного дослідження детермінант резистентності в бактерій, визначала чутливість мікроорганізмів до антисептиків й антибіотиків, написання тез).*

23. Вплив чинників оточуючого середовища на плівкоутворюючу активність бактерій / В. П. Ковальчук, В. М. Буркот, І. Ю. Сідько, Ю. Ю. Трофіменко // Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю присвячена 90-річчю А. Я. Циганенко «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології» (Харків, 2019). – С. 40-42. *(Дисертант проводила експериментальне відтворення біоплівки за різних хімічних чинників, аналіз та написання тез).*

24. Порівняльне вивчення антимікробної активності сучасних дезінфектантів / В. П. Ковальчук, З. М. Прокопчук, І. М. Вовк, Н. С. Фоміна, І. М. Коваленко, В. М. Буркот // Науково-практична конференція «Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського», 12 лютого 2020 року, Харків. – С. 62-63. *(Особистий внесок здобувача–дослідження ефективності сучасних дезінфектантів, оформлення тез).*

25. Антибіотикорезистентність клінічних штамів грамнегативних неферментуючих бактерій / В. М. Буркот, Н. А. Багнюк, Б. І. Левченко, Я. П. Грицун // Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині», 26 березня 2021 року, Харків, 2021. – С. 57-59. *(Дисертант проводила мікробіологічний моніторинг рівня фенотипової антибіотикорезистентності бактерій, написання тез).*

26. Пат. u201404865 Україна, А61 L 15/12, А 61 L 15/03. Спосіб профілактики та лікування інфекційних ускладнень у хворих з глибокими опіками / Нагайчук В. І., Палій В. Г., Назарчук О. А., Палій Д. В., Гончар О. О., В. М. Буркот; заявник і власник патенту Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова. – № 93662; заявл. 07.05.2014; Опубл. 10.10.2014; Бюл. № 19. – 7 с.*(Особистий внесок здобувача – провела мікробіологічний моніторинг антибіотикорезистентності бактерій).*

27. Буркот В. М. Спосіб профілактики та лікування інфекційних ускладнень у хворих з глибокими опіками / В. І. Нагайчук, О. А. Назарчук, В. Г. Палій, Д. В. Палій, О. О. Гончар, І. В. Коваленко, В. М. Буркот, О. В. Колісник // Реєстр галузевих нововведень. – 2016. – Вип. 2, Т. 1. – Реєстр. № 222/2/15. – С. 184-185.*(Особистий внесок здобувача – провела дослідження проти мікробної активності антисептиків, антибіотиків).*

28. Патент на корисну модель № 119030, Україна, МПК (2017.01) С12N 1/00. Диско-дифузійний спосіб визначення механізму резистентності до  $\beta$ -лактамних антибіотиків у стафілококів / Кондратюк В. М., Ковальчук В. П., Палій Г. К., Кондратюк О. П., Буркот В. М.; заявник та патентовласник Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова. – u 201702080; заявл. 06.03.2017; опубл. 11.09.2017, Бюл. № 17. *(Особистий внесок здобувача – визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків).*

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	18
ВСТУП.....	26
<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ</b>	
<b>АЕРОБНИХ ГРАМНЕГАТИВНИХ НЕФЕРМЕНТУЮЧИХ</b>	
<b>БАКТЕРІЙ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....</b>	
1.1. Поширення НФГНБ у природі та вплив на здоров'я і господарську діяльність людей.....	27
1.2. Характеристика медичних проблем, зумовлених представниками родів <i>Pseudomonas</i> та <i>Acinetobacter</i> .....	33
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	
2.1. Характеристика джерел і методів виділення та ідентифікації штамів бактерій, використаних у дослідженні.....	46
2.2. Характеристика хімічних реактивів та антибіотиків, використаних у дослідженні.....	48
2.3. Методи визначення фенотипової чутливості бактерій до антибіотиків.....	49
2.4. Методи виявлення генів резистентності до антибіотиків у неферментуючих бактерій.....	50
2.5. Методика вивчення швидкості формування стійкості до антибіотиківу НФГНБ.....	51
2.6. Методи дослідження плівкоутворювальної активності псевдомонад та ацінетобактерій.....	52
2.7. Математико-статистичні методи дослідження.....	53

РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ ПСЕВДОМОНАД ТА АЦІНЕТОБАКТЕРІЙ.....	55
РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ХІМІЧНИХ ТА ФІЗИЧНИХ ЧИННИКІВ НА ПЛІВКОУТВОРЮЮЧУ АКТИВНІСТЬ НФНГБ.....	69
4.1. Вплив складу середовища культивування на плівкоутворювальну активність <i>P. aeruginosa</i> та <i>A. baumannii</i> .....	69
4.2. Вплив температури та рН середовища на плівкоутворювальну активність <i>P. aeruginosa</i> та <i>A. baumannii</i> .....	73
4.3. Вплив осмотичного та зниженого атмосферного тиску на плівкоутворювальну активність <i>P. aeruginosa</i> та <i>A. baumannii</i> .....	78
РОЗДІЛ 5. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ АНТИБІОТИКІВ НА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АЦІНЕТОБАКТЕРІЙ І ПСЕВДОМОНАД.....	83
5.1. Швидкість формування стійкості до антибіотиків псевдомонадами і ацінетобактеріями в штучних умовах.....	84
5.2. Характеристика змін біологічних властивостей <i>A. baumannii</i> та <i>P. aeruginosa</i> після штучного формування стійкості до антибіотиків.....	90
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ...	98
ВИСНОВКИ.....	110
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	113
ДОДАТОК А.....	139
ДОДАТОК Б.....	143
ДОДАТОК В.....	145

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

- АГЛ – ацил-гомосерин лактонів
- АМ – амікацин
- АТСС – American taxonomic culture collection
- ББП – бактерійна біоплівка
- БЛРС –  $\beta$ -лактамази розширеного спектру
- ВАП – вентилятор-асоційована пневмонія
- ВНМУ – Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова
- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я
- ВРІТ – відділення реанімації та інтенсивної терапії
- ДДМ – диско-дифузійний метод
- ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
- КУО – колонієутворюючі одиниці
- ЛВ – левофлоксацин
- МБсК (МФсК) – мінімальна бактеріостатична (фунгістатична) концентрація
- МБцК (МФцК) – мінімальна бактерицидна (фунгіцидна) концентрація
- МІК – мінімальна інгібуюча концентрація
- МОЗ – Міністерство охорони здоров'я
- МПА – м'ясопептонний агар
- МП – меропенем
- МПБ – м'ясопептонний бульон
- М – середнє арифметичне значення
- m – похибка середніх величин
- $M_{\min}$  – мінімальне значення
- $M_{\max}$  – максимальне значення
- MDR – мультирезистентна група
- НДР – науково-дослідна робота
- НФГНБ – неферментуючі грамнегативні бактерії



NCBI – National Center for Biotechnology Information

OD– оптична густина

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

SD– стандартні відхилення

ST – сіквенс-тип

ТСБ – триптон-соєвий бульйон

t – критерій Стьюдента

QS– quorum sensing

Q<sub>в</sub>– верхній кuartиль

Q<sub>н</sub>– нижній кuartиль

XDR– група з розширеною резистентністю

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Група аеробних неферментуючих грамнегативних бактерій (НФГНБ) охоплює значний перелік біологічних видів, широко розповсюджених у біосфері. Представники групи заселяють природне водне середовище і перебувають у складних стосунках з іншими учасниками біоценозу. Важливу роль неферментуючі бактерії відіграють у формуванні ризосфери, до того ж частина з них є фітопатогенами. Окремі представники є учасниками мікробіоценозів тіла людини і мають медичне значення [1-5].

Протягом останніх десятиріч представники родів *Pseudomonas* та *Acinetobacter* порядку Pseudomonadales спричинили низку складних медичних проблем у ролі збудників опортуністичних інфекцій. Частота гнійно-запальних захворювань, спричинених цими мікроорганізмами, збільшується в усьому світі. Справжнім лихом ці мікроорганізми стали для хірургічних і комбустіологічних відділень лікувальних установ. НФГНБ беруть участь у розвитку ранової інфекцій, важких деструктивних пневмоній, септичних станів, заселяють опікові поверхні та поверхні виразок, пов'язаних з порушенням трофіки тканин (діабетична стопа, облітеруючий ендартерніт) і унеможлиблюють їхнє загоєння. У відділеннях реанімації та інтенсивної терапії саме ці бактерії найчастіше спричиняють вентилятор-асоційовані пневмонії (ВАП) з 90% летальним кінцем [6-9].

Проблема ускладнюється через безмежні адаптивні можливості НФГНБ і, в зв'язку з цим, через приголомшливу швидкість формування ними стійкості до нових найсучасніших протимікробних лікарських засобів. Мікроорганізми цієї групи виявляють стійкість до цефалоспоринів III–IV покоління (цефтазідім, цефоперазон, цефепім), аміноглікозидів (амікацин), фторхінолонів (ципрофлоксацин, офлоксацин, моксіфлоксацин), карбапенемів (меропенем, імепенем). Серед механізмів стійкості НФГНБ до антибіотиків найбільше клінічне та епідеміологічне значення має набута продукція метало- $\beta$ -лактамаз. Швидкість формування стійкості до нових антибіотиків, як і закономірності розповсюдження

метало- $\beta$ -лактамаз, які продукують штами НФГНБ, у нашій країні залишається недостатньо вивченими [10-14].

Останнім часом досить детально вивчається можливість існування бактерій у формі біоплівки. Формування біоплівок – складний, динамічний комплексний процес, який включає в себе декілька етапів: адгезію бактеріальних клітин до поверхні, активний поділ клітин для створення клітинних кластерів і формування екзополімерного слизового матриксу. Показано, що бактерії у складі біоплівок можуть безпечно для себе переносити концентрації антибіотиків, що згубно діють на вільні організми. Водночас, руйнування біоплівки веде до переходу бактерій у вільні форми, чутливі до звичайних концентрацій антимікробних препаратів. Формування біоплівок для НФГНБ є особливою формою резистентності [15-17].

Враховуючи викладене вище, дослідження біологічних властивостей НФГНБ, що поширюються на території нашої країни, постійний моніторинг їхнього рівня резистентності до антибіотиків, дослідження генетичної спорідненості з міжнародними клонами підвищеного епідеміологічного ризику є актуальним і важливим науково-практичним завданням. Поглиблене вивчення закономірностей формування біоплівок НФГНБ та впливу на цей процес різних хімічних і фізичних чинників дасть змогу вирішити низку питань практичної та теоретичної біології та медицини, а також допоможе у пошуку лікарських препаратів, здатних цілеспрямовано впливати на розвиток біоплівки. Причому, важливим є визначення як джерел активації, так і джерел пригнічення плівкоутворення.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу виконано у відповідності до плану досліджень НДР кафедри мікробіології, імунології та вірусології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова «Вивчення біологічних властивостей мікроорганізмів, віднесених Всесвітньою організацією охорони здоров'я до списку «провідних патогенів», що несуть загрозу здоров'ю людини, та розробка засобів боротьби з ними», № держреєстрації 0117U006903. Дисертантом досліджено біологічні властивості грамнегативних неферментуючих бактерій, що поширюються в лікувальних

зкладах України і внесені ВООЗ до переліку пріоритетних патогенів, які несуть найбільшу загрозу здоров'ю людей.

**Мета** – підвищення ефективності заходів протидії поширення небезпечної бактеріальної мікрофлори шляхом дослідження біологічних властивостей та можливостей впливу на плівкоутворювальну активність найбільш поширених у лікувальних закладах нашої країни видів грамнегативних неферментуючих бактерій, моніторинг рівня антибіотикорезистентності госпітальних штамів *P. Aeruginosa* та *A. baumannii*.

**Завдання дослідження:**

1. Дослідити видовий склад і біологічні властивості грамнегативних неферментуючих бактерій, що циркулюють серед пацієнтів лікувальних закладів хірургічного та комбустіологічного профілів.

2. Провести моніторинг рівня чутливості до антибіотиків виділених штамів, визначити наявність генетичних детермінант механізмів їх стійкості, шляхом мультилокусногосиквенс-типування встановити генетичні зв'язки виділених штамів з глобальними клонами підвищеного епідемічного ризику.

3. Вивчити плівкоутворювальну активність виділених штамів *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, визначити залежність її показників від наявності у середовищі окремих хімічних субстратів та від рН середовища.

4. Дослідити плівкоутворювальну активність псевдомонад і ацінетобактерій за різних температур культивування та за різного осмотичного та атмосферного тисків.

5. Експериментально дослідити швидкість формування стійкості до антибіотиків карбапенемового, аміноглікозидного та фторхінолонового рядів у штамів псевдомонад і ацінетобактерій з різними генетичними детермінантами резистентності в штучних умовах.

**Об'єкт досліджень** - грам негативні неферментуючі бактерії.

**Предмет досліджень:** морфологія, культуральні властивості, ферментативна та плівкоутворювальна активність, антибіотикорезистентність, генетичні детермінанти механізмів стійкості грамнегативних неферментуючих

бактерій до антибіотиків.

*Методи дослідження:* мікробіологічні, молекулярно-генетичні, фотометричні, статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В дисертаційній роботі наведені дані щодо біологічних властивостей грам негативних неферментуючих бактерій, що поширюються серед пацієнтів лікувальних закладів хірургічного та комбустіологічного профілів в сучасних умовах, рівні їхньої антибіотикорезистентності.

Дисертантом доповнені наявні наукові дані щодо гетерогенності популяцій *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, які виділяються від пацієнтів в лікувальних установах України, за морфологічними, культуральними, ферментативними ознаками та здатністю до утворення біоплівки; оновлено дані щодо рівня фенотипової резистентності названих бактерій до антибіотиків.

Дисертантом вперше встановлений повний перелік генетичних детермінант стійкості до  $\beta$ -лактамних, аміноглікозидних, фторхінолонових антибіотиків, носіями яких є штами *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, що поширюються на нашій території.

Вперше шляхом мультилокусного секвенс-типуювання серед виділених штамів неферментуючих бактерій виявлені такі, що належать до міжнародних клонів підвищеного епідемічного ризику.

Дисертантом вперше досліджена швидкість формування стійкості до антибіотиків у штучних умовах у штамів *P. aeruginosa* та *A. baumannii* з різним набором генетичних детермінант механізмів резистентності до них.

Одержані нові дані щодо впливу на плівкоутворювальну активність неферментуючих бактерій окремих хімічних речовин, рН середовища, температури культивування, осмотичного та атмосферного тиску.

**Практична значущість дисертаційного дослідження.** Результати дисертаційного дослідження є науковим внеском у формування цілісної уяви щодо біологічних властивостей небезпечних для людей бактерій, які поширені на території України. Одержані дані щодо гетерогенності виділених штамів за

окремими ідентифікаційними ознаками дають змогу уникнути діагностичних помилок у роботі практичних бактеріологічних лабораторій.

Результати моніторингу рівня антибіотикорезистентності, дослідження генетичних детермінант механізмів стійкості до антибіотиків та швидкості формування стійкості до окремих антибіотиків можуть бути основою для прогнозу клінічної ефективності наявного арсеналу протимікробних лікарських засобів на найближчі роки.

Визначені зміни плівкоутворювальної активності НФГНБ під впливом різних хімічних і фізичних чинників дають змогу покращити керованість цього процесу як у дослідницькій роботі, так і для здійснення заходів боротьби з шкідливими неферментуючими бактеріями в практичних умовах.

Результати проведених досліджень використовуються в лекційному курсі та під час проведення практичних занять викладачами кафедри мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова; кафедри мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України; кафедри мікробіології та вірусології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології Дніпровського державного медичного університету МОЗ України; кафедри мікробіології, вірусології та імунології імені професора Д.П. Гриньова Харківського національного медичного університету МОЗ України.

**Особистий внесок здобувача.** Автор спільно з науковим керівником сформулювала мету і завдання дослідження, самостійно провів патентно-інформаційний пошук, проаналізувала та узагальнила дані літератури, визначила алгоритм виконання експериментальних досліджень.

Дисертантом самостійно проведено виділення чистих культур мікроорганізмів, вивчені їхні морфологічні, тинкторіальні, культуральні та біохімічні характеристики, встановлено видову належність, проведено визначення чутливості виділених штамів до антибіотиків та антисептиків, підготовлено

культури для відправки на молекулярно-генетичні дослідження.

Молекулярно-генетичні дослідження виконані в Інституті досліджень центру Волтера Ріда (США) в рамках «Згоди на подальший розвиток співробітництва та передачу матеріалів під час спільного дослідження» № W81XWH-17-0315 між Вінницьким національним медичним університетом ім. М. І. Пирогова та Інститутом досліджень центру Волтера Ріда. Аналіз одержаних результатів молекулярно-генетичних досліджень автором проведено самостійно.

Увесь комплекс експериментальних досліджень плівкоутворювальної активності неферментуючих бактерій, впливу на її показники хімічних і фізичних чинників автором виконано одноосібно. Самостійно проведено аналіз одержаних результатів, зроблені висновки.

**Апробація результатів дисертації.** Основні наукові положення дисертації було представлено, обговорено і позитивно оцінено на науково-практичній конференції «Довкілля і здоров'я» (Тернопіль, 2014); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу», приуроченої до Дня науки, 75-річчя інституту, 105-річчя Г. С. Мосінга (Львів, 2015); VI Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених, (Вінниця, 2015); International conference for young scientists «Actual problems of microbiology and biotechnology» (Odesa, 2015); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні» (Вінниця, 2016); XIII Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2016» (Вінниця, 2016); II International Scientific Conference Microbiology and Immunology – the development out look in the 21<sup>st</sup> century (Kyiv, 2016); Науково-практичній конференції «Довкілля і здоров'я» (Тернопіль, 2016); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання стратегії, тактики застосування та дослідження антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів», присвяченій 150-річчю з Дня народження Данила Кириловича Заболотного (Вінниця, 2016); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» (Чернівці, 2018); III International Scientific Conference

«Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21<sup>st</sup> century» (Kyiv, 2018); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання стратегії, тактики застосування антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів» (Вінниця, 2018); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека», присвяченій пам'яті академіка Л. В. Громашевського та 25-річчю Національної академії медичних наук України (Київ, 2018); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю присвяченій 90-річчю А. Я. Циганенко «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології» (Харків, 2019); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання стратегії, тактики застосування антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів», присвяченій пам'яті заслуженого діяча науки і техніки України, доктора мед. наук, професора Палія Г.К. (Вінниця, 2020); Науково-практичній конференції «Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського» (Харків, 2020).

**Публікації.** Основні результати і нові наукові положення дисертації повністю викладені у 25 наукових роботах, 2 патенти, 1 реєстр галузевих нововведень.

Серед 25 наукових робіт 12 статей опубліковані у наукових фахових виданнях України, 1 стаття – у науковому фаховому виданні України, що включене до бази даних Web of Science, 1 стаття – у науковому фаховому виданні України, що включене до бази даних Scopus, 1 стаття – у зарубіжному науковому журналі, який зареєстрований у міжнародній наукометричній базі Scopus, 10 тез у матеріалах міжнародних та всеукраїнських науково-практичних конференцій.

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертація викладена на 149 сторінках комп'ютерного тексту, складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів досліджень, 3 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаної літератури, що



включає 208 найменувань (67 джерел латиницею та 141 кирилицею), додатків. Робота ілюстрована 9 таблицями та 13 рисунками.

## РОЗДІЛ 1

### ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ АЕРОБНИХ ГРАМНЕГАТИВНИХ НЕФЕРМЕНТУЮЧИХ БАКТЕРІЙ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Мікроорганізми є доміантною ланкою біосфери, життєдіяльність якої лежить в основі створення умов для існування інших, як примітивних, так і складноорганізованих живих істот, у т.ч. і людини. Давно визнані хибними уявленнями про мікроорганізми, як про виключно шкідливі агенти, і все більш стає зрозумілою роль світу мікробів у підтримці стабільності біосфери. Мікроорганізми забезпечують кругообіг речовин у природі, беруть активну участь у всіх природних процесах синтезу і деструкції органічних і неорганічних речовин [2, 18-19].

У природних умовах переважна більшість мікроорганізмів живе, розмножується та виявляє різного роду біохімічну активність, прикріплюючись до мінеральних частинок ґрунту, донних відкладень водойм, коріння або наземної частини рослин, тканин представників тваринного світу [7, 20].

Мікробні популяції можуть досліджуватися як індикатори фізико-хімічних і біологічних процесів, що відбуваються у оточуючому їх середовищі. Завдяки малим розмірам бактерії мають велику відносну поверхню контакту із середовищем і здатні швидше реагувати на зміни у його складі, ніж більш високоорганізовані організми.

Високі швидкості росту та розмноження бактерій дають можливість дослідникам в короткий термін простежити за дією будь-якого екологічного чинника протягом десятків і навіть сотень поколінь. Мікроорганізми, що мають високу гідролітичну активність щодо органічних речовин природного та антропогенного характеру, відіграють важливу роль у самоочищенні середовища [21].

Питому частку у мікробіоценозах, що оточують людину, складає гетерогенна група неферментуючих грамнегативних паличок, у яку об'єднані за

рядом фенотипових ознак далекі еволюційно, таксономічно різні бактерії, що характеризуються убіквітарністю розповсюдження. Висока екологічна пластичність дозволяє бактеріям цієї групи домінувати в багатьох екологічних нішах [22].

### 1.1. Поширення НФГНБ у природі та їх вплив на здоров'я господарську діяльність людей

У строкату групу грамнегативних неферментуючих бактерій об'єднують велику кількість біологічних видів мікроорганізмів, які, на відміну від не менш поширеної групи грамнегативних ентеробактерій, відрізняються нездатністю ферментувати глюкозу [6,23].

На сьогодні до цієї групи включають представників понад 15 родин та понад 30 родів мікроорганізмів. Певна їх кількість має високий рівень фенотипової та генотипової спорідненості з представниками роду *Pseudomonas* лише удосконалення генетичних методів лабораторної діагностики та використання для диференціації багатофазового таксономічного аналізу дозволило виділити їх у самостійні таксономічні одиниці [24-25].

Так представники роду *Alcaligenes*, що належать до царства Bacteria, типу Proteobacteria, класу  $\beta$ -Proteobacteria, порядку Burcholderiales, родини Alcaligenaceae, зустрічаються у воді, ґрунті, залишках органічних тканин, що розкладаються; вегетують у кишкових трактах хребетних тварин, нерідко виділяються із вмісту шлунково-кишкового тракту здорових людей. Ці мікроорганізми становлять медичний інтерес, оскільки є збудниками опортуністичних інфекцій, у т.ч. внутрішньолікарняного сепсису [7,26].

Представники того ж порядку, виділені у родину Burkholderiaceae, рід *Burkholderia*, є давніми азот фіксувальними симбіонтами деяких бобових. Завдяки своїй здатності колонізувати ризосферу таких сільськогосподарських культур як кукурудза, рис, горох, соняшник і збільшувати їхню врожайність, ці бактерії являють господарчий інтерес. Крім того, виділені штами цього роду бактерій є

антагоністами ґрунтових патогенів рослин або здатні до деструкції речовин, що забруднюють навколишнє середовище (сирої нафти, гербіцидів, ароматичних сполук і ксенобіотиків). Однак, господарче використання бактерій цього роду несе значні ризики, оскільки вони водночас є небезпечними людськими патогенами, питома вага яких у етіологічній структурі опортуністичних інфекцій в останні роки невпинно зростає [3, 25].

До класу  $\gamma$ -Proteobacteria, порядку Xanthomonadales належить ще декілька родин неферментуючих бактерій, поширених у природі. У родину *Xanthomonadaceae*, рід *Xanthomonada* включено 27 видів бактерій, що зумовлюють серйозні хвороби близько 400 видів рослин, серед них капуста, перець, рис, цитрусові. До тієї ж родини належить рід *Stenotropomonas*, типовий представник якого *S. maltophilia* часто виявляється у водному середовищі (річній та озерній воді, системах очищення та розподілу проточної води, очисних спорудах). Колонізація цим видом санітарно-технічного обладнання у лікувальних закладах призводить до спалахів небезпечних внутрішньолікарняних інфекцій, оскільки збудники характеризуються природною стійкістю до більшості антибіотиків, а також антибіотиків резерву карбапенемового ряду, зберігаються на поверхні мила для миття рук і у розчинах антисептиків.

Неферментуючі бактерії родини *Flavobacteriaceae* вегетують у морських, прісноводних і ґрунтових середовищах, деякі тісно пов'язані з рослинним або тваринним світом[1].

Так з-поміж представників роду *Flavibacterium*, який входить до цієї родини, *F. psychrophlum* – збудник важкої хвороби риб, що спричиняє серйозні економічні збитки господарствам, які займаються вирощуванням форелі. Представники тієї ж родини родів *Myroides* та *Chryseobacterium* поширені у природі, окремі представники беруть участь у ремедіації оточуючого середовища, деякі є патогенами земноводних і птахів. Крім того, досить рідко окремі представники родини зумовлюють розвиток важких гнійно-запальних уражень у людей [27-29].

Серед інших грамнегативних неферментуючих бактерій особливу увагу

фахівців протягом останніх десятиріч привертають представники родів *Pseudomonas* та *Acinetobacter*, питома вага яких у етіологічній структурі захворювань людей бактеріальної природи набуває загрозливих масштабів. Досить зауважити, що двоє представників цих родів (*P. aeruginosa* та *A. baumannii*) у лютому 2017 р. Всесвітньою організацією охорони здоров'я внесено у список «пріоритетних патогенів», що несуть найбільшу загрозу для здоров'я людини [10, 30-31].

У відповідності до Bergey's Manual of determinative bacteriology (Ninth Edition), 2005, рід *Pseudomonas*, який включає в себе близько 200 видів бактерій, віднесено до четвертої групи (грамнегативні аеробні/мікроаерофільні палички та коки), підгрупи А (аеробні палички, які використовують у ролі додаткового джерела вуглецю полі- $\beta$ -гідроксібутират), хемоорганотрофи з метаболізмом чисто дихального типу та використанням кисню як кінцевого акцептору електронів.

В процесі культивування більшість видів не потребує додаткових органічних складових. В кислому середовищі (рН 4,5) бактерії не ростуть. Діапазон температур для росту - від 5 до 42<sup>0</sup>С. Значна частина видів здатна синтезувати пігменти [7, 32-33].

Таксономічне положення роду наступне: Царство: Bacteria; тип Proteobacteria; клас gamma-Proteobacteria, порядок: Pseudomonadales; родина: *Pseudomonadaceae* [34].

Більшість представників роду є сапрофітами, що переважно населяють водойми (річки та озера), а також ризосферу рослин та безліч інших вологих місць. Група включає збудників інфекцій людей, тварин, рослин та комах. Патогенні властивості та здатність викликати гнійні запальні процеси у людей мають декілька мікроорганізмів роду *Pseudomonas*: *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*.

Однак, найнебезпечнішим з медичної точки зору видом є *P. aeruginosa*., Як окремий бактеріальний вид *P. aeruginosa*, вперше згадується у 1862 році А. Lucke, що дослідив та описав нагноєння рани у людини. До того ж він зазначив характерне синьо-зелене забарвлення пов'язок [35].

У чистій культурі цього збудника виділив у 1862 р. С. Gessard. Taylor описав

масовий спалах діареї 1898 р. у мешканців Нью-Йорка, пов'язаний із вживанням криничної води, забрудненої *P. Aeruginosa*. У 1903 р. Thresh повідомляв про епідемію діарейного захворювання, обумовленого тим же збудником і теж пов'язаною із вживанням забрудненої псевдомонадами питної води [36].

Бактерії цього виду поширені у природі і є вільно вегетуючими мікроорганізмами, що вільно вегетують у якостіджерела енергії майже усі природні органічні сполуки. Їх виявляють у ґрунті, воді, на рослинах, у випорожненнях теплокровних тварин, на шкірі й у шлунково-кишковому тракті людей [37].

Цей вид бактерій має необмежені метаболічні можливості та може поводити себе як хемолітотроф (вегетувати в обмежених за складом мінеральних середовищах), як сапрофіт (у харчових продуктах і стічних водах), коменсал (здорове носійство у кишечнику) і, зрештою, як завершений паразит і патоген. Паразитизм *P. aeruginosa* в організмах теплокровних тварин і людей ніякою мірою не визначає існування біологічного виду в природі та має випадковий характер. Наявність складних механізмів регуляції дозволяє псевдомонадам швидко адаптуватися до зміни умов існування в напрямку забезпечення максимальної економічності з енергетичної точки зору. Одночасно, потрапляння у внутрішнє середовище живих організмів супроводжується запуском протеїнів, які виконують роль факторів вірулентності.

Представники виду виявляють патогенність у причетності до рослин, тварин і людей. Так, *Pseudomonas aeruginosa* зумовлює симптоми гнилі у *Arabidopsis thaliana* (крес-салат) та *Lactuca sativa* (салат Латук), вражає деякі види кави, помідорів, картоплі [3]. Це потужний патоген для *Caenorhabditis elegans* (вільно живуча нематода), дрозофіл, та *Galleriamellonella* (воскова міль). За наявності достатньої кількості поживних речовин цей мікроорганізм залишається понад 2 тижні життєздатним в анаеробних умовах. На бавовняних та синтетичних тканинах зберігається понад 2 тижні, на повстистих – понад 150 діб, на вологих поверхнях – близько 100 діб.

*P. aeruginosa* у тваринництві створює велику кількість проблем, оскільки є збудником псевдомонозу молодняка сільськогосподарських тварин (кролів,

свиней, великої рогатої худоби). Із розвитком індустрії вирощування хутрових звірів (норок) у неволі псевдомоноз став однією з найнебезпечніших хвороб, які супроводжуються масовим ураженням молодняка та його загибеллю. Племінному розведенню великої рогатої худоби *P. aeruginosa* заподіює великі економічні збитки, колонізуючи препуцій биків-виробників і забруднюючи сперму.

Появі та поширенню псевдомонозу сприяють різні порушення ветеринарно-санітарних правил утримання та годівлі тварин (тривалі перегони, невпорядковане транспортування, скупчене утримання тварин, згодовування недоброякісних кормів, використання антибіотиків). У різних видів тварин і людини спільні джерела та шляхи поширення псевдомонозної інфекції, захворювання спричиняють одні й ті ж або дуже подібні серологічні варіанти і групи, тому *P. Aeruginosa*, можливо, належить до зооантропонозів. Харчові продукти тваринного походження нерідко контаміновані мікроорганізмами, в результаті чого формується основний шлях передачі стійких бактерій і генів резистентності від сільськогосподарських тварин до людей. Однак, у цьому процесі може мати значення й безпосередній контакт людей із тваринами або з об'єктами довкілля. Факторами передачі можуть стати також фрукти або овочі, контаміновані випорожненнями тварин або брудною водою [38].

Характерною ознакою епідемічного та епізоотичного процесів *P. aeruginosa* як умовно-патогенного убіквітарного мікроорганізму є *host-pathogeninteraction*, тобто взаємодія патогену з організмом господаря. Особливість цієї бактерії полягають в опортунізмі та в тривалій персистенції в організмі господаря і в об'єктах довкілля [39].

Представники іншого роду – *Acinetobacter*, що привертають увагу фахівців медичного профілю, також належать до порядку *Pseudomonadales*, однак, включені до іншої родини – *Moraxellaceae*. Перший представник роду був виділений із ґрунту і описаний Веїєрінскв 1911 р. [29,40].

Рід *Acinetobacter* включає аеробні неферментуючі оксидазопозитивні грамнегативні нерухомі бактерії-прототрофи. За морфологією вони є дуже короткими, овоїдної форми паличками, розміри їх в логарифмічній фазі росту

становлять  $1,0-1,5 \times 1,5-2,5$  мкм.

Представники роду *Acinetobacter spp.* – сапрофіти. Природним середовищем їхнього існування є вода і ґрунт. Види *Acinetobacter* здатні домінувати в багатьох екологічних нішах, поширені в природі та виявляються в ґрунті, на ділянках, забруднених вуглеводнями, в стічних водах, а також на рослинах (зокрема на овочевих культурах), у тварин і в організмі людей [41-42]. *Acinetobacter spp.* здатні пригнічувати ріст конкурентних видів шляхом секреції органічних кислот, біосурфактантів. Вони можуть виживати на вологих і сухих поверхнях, а також в умовах лікарняних установ. Деякі штами були ізольовані з продуктів харчування, питної води. Фахівцями ветеринарної галузі описані випадки зумовлених ацінетобактеріями піодермій у собак, пневмоній у коней і норок, шкірних уражень у гібридних соколів [43-44].

Ці мікроорганізми входять до складу мікрофлори шкіри здорових осіб і частіше колонізують ділянки між пальцями ніг і в паховій зоні (у мешканців спекотного і вологого клімату), можуть перебувати у шлунково-кишковому і уrogenітальному трактах [45-48]. Колонізація шкіри здорових людей може становити до 44,8% від загальної кількості обстежених [49]. Цікаво, що деякі штами ацінетобактерій толерантні до детергентів (мила) [50]. Видовий склад «шкірних» ацінетобактерій дуже відрізняється залежно від особливостей обстежених людей (стиль життя, географічна зона, наявність в анамнезі контакту з антибіотиками) і представлений видами *A. lwoffii*, *A. johnsonii*, *A. haemolyticus*, *A. calcoaceticus*, *A. junii*, *A. baumannii*.

Щодо видового поділу ацінетобактерій слід зазначити, що довгий час через складнощі фенотипової ідентифікації рід *Acinetobacter* ділили на ДНК-групи або геномні види (genomic species), даючи їм цифрову арабську нумерацію. Сучасна таксономія оперує класичними поняттями видів ацінетобактерій. Класифікатор Bergey, який кардинально змінював таксономію протеобактерій у 2004 р., налічував про 16 видів *Acinetobacter* [51]. У 2010 р. їх нараховували уже 23 види. На сьогодні окремі джерела нараховують понад 50 видів цього роду бактерій. Часто через таксономічні складнощі в клінічній практиці рід *Acinetobacter* поділяють всього на



3 групи (комплекси): *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*-, або (Acb) -complex (окислюють глюкозу, негемолітичні); *Acinetobacter lwoffii* (що не окислює глюкозу, негемолітичні); *Acinetobacter haemolyticus* (гемолітичні). У розвитку захворювань людей найчастіше беруть участь *A. baumannii* та *A. lwoffii* [52].

## 1.2. Характеристика медичних проблем, зумовлених представниками родів *Pseudomonas* та *Acinetobacter*

*P. aeruginosa* та *A. baumannii*, як і інші неферментуючі грамнегативні бактерії, є умовно-патогенними мікроорганізмами, які мають певний патогенний потенціал, проте, реалізують його у разі потрапляння до організму людини з порушеними захисними бар'єрами [53]. Додатковими характеристиками цих видів бактерій, які породжують складні медичні проблеми, є їх високий рівень стійкості до антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів, та здатність до утворення біоплівок на поверхнях предметів оточуючого середовища та тканин організму людини [6, 54- 57].

*P. aeruginosa* – це аеробні неферментуючі каталазо- і оксидазопозитивні грамнегативні рухливі психрофільні-мезофільні бактерії-прототрофи, що мають пряму або злегка зігнуту паличкоподібну форму. В нативних препаратах виявляють рухливість, завдяки наявності полярно розташованого джгутика. За певних умов виділяють позаклітинний слиз полісахаридної природи. До того ж високовірулентні штами синтезують його у великій кількості, що дає підстави розглядати слиз як фактор патогенності.

*P. aeruginosa* продукує великий спектр речовин, які розчинюються як пігменти. Описано чотири види водорозчинних пігментів: піоціанін – синьо-зеленого кольору; флюоресцин – жовто-оранжевого; піорубін – червоно- вишневого і піомеланін – буро-чорного кольору. Найбільше значення в діагностиці псевдомонози має піоціанін. Оптимальні умови для синтезу піоціаніну – температура 30-37°C, живильні середовища, що містять гліцерин, аланін та іони деяких металів, особливо Mg та K. Близько 70-80% штамів

*P. aeruginosa* є продуцентами піоціаніну. Піоціанін також належить до факторів патогенності, оскільки він пригнічує вегетацію нормальної мікрофлори тіла людини [58 - 62].

Крім того, *P. aeruginosa* продукують широкий спектр речовин з різноманітними проявами біологічної активності, які можуть виконувати роль факторів патогенності. Так, дві гемолітичні субстанції – термолабільний гемолізін з лецитиназною активністю (фосфоліпаза С) і термостабільний гемолізін, – гідролізують фосфоліпіди, у експериментальних умовах зумовлюють розвиток некрозу тканин печінки і легень.

Протеаза II (еластаза), яку синтезують до 85 % штамів *P. aeruginosa*, руйнує еластин, казеїн, гемоглобін, фібрин, гама-глобуліни, білки системи комплементу. Лужна протеаза гідролізує молекули гама-інтерферону. Колагеназа гідролізує колаген у сполучній тканині [63].

Близько 95 % штамів, виділених в клінічних умовах, є продуцентами цитотоксину, який згубно впливає на поліморфноядерні лейкоцити і призводить до розвитку нейтропенії, зумовлює підвищення проникності клітинних мембран і порушення фізіологічних градієнтів  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  та глюкози. Найважливішим фактором патогенності *P. aeruginosa* вважають екзотоксин А, механізм дії якого схожий з дією дифтерійного екзотоксину і полягає у блокуванні синтезу білків на рибосомах еукаріотичних клітин. Під час введення експериментальним тваринам ця речовина викликає набряки, утворення вогнищ некрозу, метаболічний ацидоз та дихальну недостатність [64].

Вочевидь, така висока «озброєність» цього виду неферментуючих бактерій вивела їх в число лідерів серед бактеріальних патогенів у людей. Так, у хворих на муковісцедоз – генетично детерміноване захворювання, пов'язане з порушенням видільної функції екзокринних залоз – *P. aeruginosa* заселяють нижні дихальні шляхи, сприяють прогресуванню й загостренню хронічної легеневої інфекції, розвитку дихальної недостатності та смерті [8]. За даними організації, яка займається проблемами муковісцедозу в США, частота інфікування хворих на муковісцедоз у віковій групі від 26 до 30 років сягає 81,3 % [65].

*P. aeruginosa* є одним із найбільш частих збудників важких хронічних інфекцій сечовидільних шляхів (пієлонефритів, циститів) [66 - 67].

Ризики виникнення таких уражень особливо високі у пацієнтів, яким проводять катетеризацію сечового міхура. Частота виділення синьо-гнійних паличок, коли є катетер-асоційовані урологічні інфекції, коливається за даними різних авторів у межах від 8 % до 23 % [68 - 72].

Причиною розвитку запальних уражень шкіри та підшкірної клітковини теж нерідко стає *P. aeruginosa*, особливо у випадках локального порушення трофіки тканин або травм [73].

Вхідними воротами інфекції можуть бути варикозні виразки, трофічні виразки у пацієнтів із синдромом «діабетичної стопи», пролежні. Дуже часто паличками синьо-зеленого гною інфікується поверхня обпечених тканин. У осіб із глибокими опіками (III ст.), значних за площею поверхні, таке інфікування має високі ризики розвитку опікового сепсису [74 - 76].

Ураження *P. aeruginosa* слухового апарату нерідко починається запаленням шкіри зовнішнього слухового проходу (зовнішній отит). За відсутності лікування процес поширюється на хрящеву тканину та скроневу кістку. Розвиток синьо-гнійного мастоїдиту, петрозиту, остеомієліту скроневої кістки призводить у подальшому до ураження черепно-мозкових нервів, отогенних абсцесів головного мозку з летальністю до 80 % [77-78].

*P. aeruginosa* є одним із частих етіологічних чинників запальних уражень апарату зору (кон'юнктивіти, кератити, виразки рогівки, панофтальміти)[79]. Найчастіше подібні захворювання виникають унаслідок травм та у користувачів контактних лінз. У останніх вони пов'язані з контамінацією збудниками розчинів для обробки лінз, адже псевдомонади нечутливі до дії мізерних концентрацій антисептиків, які входять до складу таких розчинів з урахуванням високої чутливості епітелію рогівки до хімічних впливів [80 - 83].

Незважаючи на те, що у 10-15 % здорових людей псевдомонади входять до складу нормальної мікрофлори кишечника, вони нерідко є збудниками гастроентеритів і колітів. До того ж, патоморфологічні зміни у різних відділах

шлунково-кишкового тракту можуть мати ступені від легких катаральних до масивних виразково-некротичних із виникненням перфорацій і перитоніту [84].

Найбільше медичних проблем *P. aeruginosa* породжує як збудник і внутрішньолікарняних та інших ятрогенних інфекцій [85]. Оскільки мікроорганізми цього виду є типовими сапрофітами, то найрізноманітніші об'єкти лікарняного середовища можуть ставати резервуаром збудника, особливо ті, що постійно зволожуються. В першу чергу до них належить інгаляційне обладнання, а саме: зволожувачі апаратів штучної вентиляції легень та внутрішні поверхні дихальних контурів, розчини для інгаляційного введення, ультразвукові інгалятори, ендоскопічна апаратура, катетери, харчові трубки, санітарно-технічне обладнання [86]. Будь-які прилади, з яких важко видалити вологу, є потенційним резервуаром паличок синьо-зеленого гною. У них збудники можуть розмножуватися і накопичуватися у величезних кількостях, навіть без джерел вуглеводневого живлення [87].

В умовах стаціонару синьогнійна паличка здатна колонізувати вологі частини тіла пацієнтів (промежину, пахвові западини, вушні раковини, слизові оболонки порожнини носа, ротоглотки, шлунково-кишковий тракт). У середньому частота колонізації госпіталізованих пацієнтів варіює від 2,6 до 24,0%, і значно зростає на фоні проведеної пацієнтам антибактеріальної терапії [88 - 89].

*P. aeruginosa* характеризується високою пластичністю та здатністю до нестримного поширення у лікарняному середовищі. Епідемічний потенціал цього виду збудників надзвичайно високий [90]. У термін близько 7 діб *P. aeruginosa* здатні формувати госпітальні штами з високим рівнем стійкості до дезінфектантів і здатністю викликати спалахи внутрішньолікарняних інфекцій [91]. Навіть бездоганне виконання усіх звичайних технологій дезінфекції після формування таких штамів не досягає елімінації збудників з лікарняного середовища. Дотого ж, госпітальні штами характеризуються значно вищим рівнем вірулентності, у порівнянні з штамми, виділеними з навколишнього середовища. Так, протеолітична активність подібних штамів у середньому у 3,2 рази вища, ніж у штамів позагоспітальних [10, 92].

Колонізуватися подібними штамми можуть різні локуси організму пацієнтів лікувальних закладів, і, відповідно, запальні ураження різноманітної локалізації виникають у осіб, знеслаблених основним захворюванням. Однак, найбільші проблеми псевдомонади створюють у відділеннях реанімації та інтенсивної терапії (ВРІТ) і відділеннях комбустіологічного профілю [93-95].

Пацієнти ВРІТ у переважній більшості потребують тривалої респіраторної підтримки. Загрозливим ускладненням тривалої штучної вентиляції легень є вентилятор-асоційована пневмонія (ВАП), частота якої за даними різних авторів коливається від 22% до 50 % усіх пацієнтів, що отримують респіраторну підтримку, а летальність у хворих з ВАП сягає 80 %. Резервуаром збудників одночасно є колонізована мікроорганізмами рідина зволожувачів повітря в апаратах штучної вентиляції, складові дихального контуру та ендотрахеальні трубки. Питома вага *P. aeruginosa* серед збудників ВАП коливається у межах від 15,6 % до 34,4 % [96–100].

У пацієнтів опікових відділень рівень інфекційних ускладнень сягає 70 %. До того ж, збудниками цих ускладнень у 44,1-67 % випадків стають *P. aeruginosa* [101 - 107].

Варто зазначити, що вивчення видів іншого роду – *Acinetobacter*, тривалий час відбувалося поза зв'язком з їхнім медичним значенням, тому що вони викликали дуже рідкісні випадки захворювань у тяжкохворих пацієнтів і характеризувалися прийнятною чутливістю до антибіотиків [108]. Перші оглядові публікації про них як про серйозні патогени з'явилися лише в 60-70-х рр. ХХ ст., але і після цього патогенність ацінетобактерій деякий час ігнорувалася медичним співтовариством, хоча вже в 90-х роках з'явилися відомості про те, що ацінетобактер у деяких регіонах входить до п'ятірки опортуністів-лідерів [109].

Дуже коротким періодом вивчення, вочевидь, пояснюється невеликий обсяг інформації щодо механізмів патогенного впливу цього виду бактерій на організм людини. Адгезія *A. baumannii* до клітин організму людини і неживих поверхонь відбувається завдяки наявності поверхневих ворсинок (пілі) [110 - 113].

Відомо, що ацінетобактерії здатні долати епітеліальний бар'єр за рахунок

продукції фосфоліпаз, які руйнують мембрани клітин організму людини. Бактеріальні протеїни з ДНКазною активністю (OmpA) пошкоджують мітохондріальний апарат і запускають апоптоз епітеліальних клітин. Сидерофорацінетобактин порушує метаболізм клітин шляхом акцепції іонів заліза. Прямий токсичний ефект на клітини організму людини чинить ліпополісахарид клітинної стінки ацінетобактерій (ендотоксин) за рахунок наявності токсичної складової ліпиду А [114 - 116].

Цей же компонент стимулює продукцію імуноцитами прозапальних інтерлейкінів. Ліпід А і серинова протеїназа ацінетобактерій виявляють антикомплементарну активність, що робить можливим виживання бактерій у системі кровотоку. Незважаючи на те, що до сьогодні ацінетобактерій у друкованих джерелах належить до малопатогенних бактерій, їхня питома вага в чисельній етіологічній структурі запальних бактеріальних хвороб невинно зростає, в першу чергу, це стосується ранових інфекцій. Перші повідомлення про ранову інфекцію м'яких тканин після бойової травми, зумовленої ацінетобактеріями, належать ще до періоду війни у В'єтнамі на початку 70-х років минулого сторіччя [117].

На початку 2000-х років аналіз етіологічної структури ускладнень бойової рани американських солдат під час бойових дій у Іраку показав, що ацінетобактерії виділяються у понад 30 % поранених. Подібна статистика дозволила військовим медикам називати цей вид збудників «іракобактеріями». В сучасності можна стверджувати про збереження тенденції. Так, з початком антитерористичної операції на сході України ацінетобактерії виявляються на ділянках мінно-вибухових ран 45,3 % поранених. До того ж, ознаки запалення далеко не завжди виражені, а зараження відбувається не в момент поранення, а на етапах медичної евакуації [117-119].

*A. baumannii* часто виділяють у разі інфекцій, пов'язаних з наданням медичної допомоги. Здатність цих мікроорганізмів із легкістю колонізувати металеві та полімерні поверхні медичного обладнання та інструментарію розширила для них перелік входних воріт за рахунок збільшення кількості інвазивних маніпуляцій у процесі удосконалення медичних технологій. Описані

випадки стійкої бактеріємії, зумовлені *A. baumannii*, яка розвинулася внаслідок гастроендоскопії [117, 120].

Особливо складні проблеми цей вид бактерій породжує у відділеннях інтенсивної терапії. У важких хворих *A. baumannii* може викликати пневмонії, трахеобронхіти, інфекції кров'яного руслу, сечового тракту, катетер-асоційовані та ранові інфекції [121 - 122].

У відділеннях інтенсивної терапії США в 2003 р. *Acinetobacterspp.* стали причиною 6,9 % із усієї кількості пневмоній, 2,4 % інфекцій кров'яного русла, 2,1 % інфекцій у ділянці хірургічного втручання і 1,6 % інфекції сечовидільної системи. Найбільш важливе клінічне значення видів роду *Acinetobacter* простежується в етіології нозокомінальної, особливо вентилятор-асоційованої пневмонії. Підчас «пізніх» ВАП питома вага ацінетобактерій, як етіологічного агента, сягає 53,8 % [6, 123-124]. В Ізраїлі, за даними сайту antibiotic.ru, протягом останнього десятиліття *Acinetobacter spp.* теж став провідною причиною вентилятор-асоційованих пневмоній [125].

У публікаціях як зарубіжних, так і вітчизняних авторів відзначається високий рівень колонізації бактеріями цього виду опікових ран. Гнійні ускладнення опікових ран зумовлені *Acinetobacter spp.* у 34 % випадків і за частотою перебувають на другому місці після ускладнень, спричинених псевдомонадами [101, 126 - 129].

Незважаючи на те, що неферментуючі бактерії *P. aeruginosata* *A. baumannii* належать до різних родин, схожими ознаками для них є природна стійкість до антибіотиків і наявність міжклітинної сигнальної системи *quorumsensing* (QS), яка регулює продукцію факторів патогенності, здатність до утворення біоплівки підчас контакту збудників із різними поверхнями, зокрема й тканинами організму людей і тварин [130 - 132].

QS є складним біохімічним процесом колективної координації експресії генів у популяції бактерій, який забезпечує адаптивну диференціацію бактеріальних клітин. В ацінетобактерій і псевдомонад у роботі QS бувають участь схожі комплекси сигнальних молекул групи ацил-гомосерин лактонів (АГЛ) [133 -

134].

Зміни у довкіллі клітини запускають синтез АГЛ різних типів, які екскретуються назовні та є сигнальними молекулами для інших клітин. Їхня взаємодія зі специфічними протеїнами інших клітин завершується утворенням гомодимерів, що виконують роль регуляторів транскрипції. Комплекс взаємодіє з промоторними ділянками геному й експресує чисельні гени, відповідальні за рухову активність бактеріальних клітин, синтез структурних складових біоплівкового матриксу, а також - сполук, які виконують роль факторів патогенності [135 - 138].

Активація цих сигнальних систем дозволяє оперативно регулювати експресію до 10 % бактеріального геному, що забезпечує гнучку мінливість активності фізіологічних процесів і безмежний адаптивний потенціал бактерій в популяції. Відомо, що QS регулює і процеси транслокації плазмід між бактеріальними клітинами, а також і носіїв генів стійкості до антибіотиків [139].

У неферментуючих бактерій QS забезпечує не лише внутрішньовидову комунікацію клітин, але й перехресну, що забезпечує корисну взаємодію популяцій різних видів у спільній екологічній ніші [140 - 141].

Важливою біологічною властивістю ацінетобактерій і псевдомонад, що забезпечує тривале виживання їх популяції в умовах несприятливих впливів, є регульований QS процес утворення біоплівок на колонізованих бактеріями поверхнях [142]. Планктонний фенотип бактерій існує на етапах їх транзиту у середовищі, тоді як стійке існування бактеріальних популяцій можливе лише у формі біоплівки. Утворення біоплівок – одна з основних стратегій, що підвищує виживання бактерій у навколишньому середовищі, а також в організмі людини. Здатність бактерій формувати біоплівки, крім іншого, є чинником патогенності та вірулентності бактерій [143 - 144].

Бактерійна біоплівка (ББП) є багатошаровою тривимірною структурою, у якій бактеріальні клітини прикріплені до певної поверхні тавкриті біополімерним матриксом [145]. За хімічним складом біоплівковий матрикс є складним комплексом мікробних екзополісахаридів, білків і гліколіпідів, а його питома вага



складає до 85 % маси біоплівки. Матрикс розділений каналами, заповненими водою, має порожнини. Каналами транспортуються поживні речовини та кисень, видаляються продукти життєдіяльності бактерій. Багат шарова топографія впливає на метаболізм і фізіологічну активність клітин [146 - 147].

У глибоких шарах біоплівок, утворених *P. aeruginosa*, клітини змінюють метаболізм з аеробного типу дихання на нітратний. Анаеробні субпопуляції паличок синьо-зеленого гною мають високий рівень стійкості до впливу чинників мікрооточення. Одним з екзополімерів цього виду бактерій у ББП є альгінат, який зв'язує молекули аміноглікозидних антибіотиків за рахунок інактивації гідрофільних і позитивно заряджених груп у молекулах [148 - 149].

Полімери матриксу ББП і у псевдомонад, і у ацінетобактерій виконують роль молекулярного фільтру, який запобігає хімічним впливам на клітини. Гліцерол-фосфорильовані  $\beta$ -глюкани *P. Aeruginosa* та полі- $\beta$ -(1-6)-N-ацетилглюкозамін *A. baumannii* не лише уповільнюють дифузію, але й активно сорбують дрібні молекули, здатні пошкоджувати бактеріальні клітини. Обмеження простору та концентрації поживних речовин у біоплівці зумовлюють формування у її складі субпопуляції метаболічно неактивних клітин-персистерів. Відсутність у таких клітинах процесів транскрипції, трансляції, реплікації і будь-якого біосинтезу робить їх невразливими до дії антибіотиків, які блокують ці процеси у звичайних клітинах. Крім того, тісний контакт і стабільна локалізація бактеріальних клітин у складі біоплівок сприяє процесам обміну генетичною інформацією між клітинами, що також підвищує адаптивні можливості [150].

Отже, існування *A. baumannii* та *P. aeruginosa* у складі ББП у локусах, де воно може бути шкідливим для людини, є великою проблемою, оскільки ерадикація бактеріальних клітин може бути неможливою [151].

Однією з небезпечних для людини біологічних властивостей псевдомонад і ацінетобактерій є високий рівень природної і набутої резистентності до антибіотиків [152 - 155].

Наявність стійкості до багатьох антибіотиків виявляється навіть у «диких» штамів цих бактерій, виділених з середовища, не забрудненого продуктами

діяльності людей [156 - 157].

Лікарняні штами зазвичай характеризуються одночасною наявністю багатьох механізмів стійкості до  $\beta$ -лактамних антибіотиків, аміноглікозидів, фторхінолонів, амфеніколів, тетрациклінів [158].

З 90-х років минулого сторіччя реєструються штами ацінетобактерій та псевдомонад, резистентних до карбапенемів та колістіну, і частота виділення подібних ізолятів невпинно зростає [159]. Так, у хірургічних стаціонарах України за період з 2011 до 2015 рр. показник частоти виділення карбапенемрезистентних штамів *P. aeruginosa* зріс на 67,4 %. Схожі тенденції виявляються і у інших країнах. Ефективних методів лікування пацієнтів з інфекційними процесами, зумовленими панрезистентними до сучасного арсеналу антибіотиків штамми бактерій, не існує, що зумовлює високі показники летальності та призводить до значних соціально-економічних втрат [160 - 161].

Найбільш актуальним і епідеміологічно значущим механізмом множинної резистентності неферментуючих грамнегативних бактерій до антибіотиків вважають продукцію  $\beta$ -лактамаз [162 - 164].

Взаємодія молекул цих ферментів з  $\beta$ -лактамним антибіотиком запускає гідроліз «критичного» амінного зв'язку лактамного кільця, що й призводить до інактивації антибіотика. Нині відомо понад 350  $\beta$ -лактамаз, які поділені на 4 молекулярних класи та групи за класифікацією Bush [165 - 168].

На підставі розподілу  $\beta$ -лактамаз на молекулярні класи й групи можна охарактеризувати їхній спектр активності та ефективність інгібіторів  $\beta$ -лактамаз [169 - 170].

У межах молекулярних класів ферменти характеризуються загальними властивостями та відповідною амінокислотною гомологією.  $\beta$ -лактамази розрізняються: 1) за здатністю до переважного гідролізу тих чи інших  $\beta$ -лактамних антибіотиків, наприклад, пеніцилінів або цефалоспоринів, або перших і других рівною мірою; 2) плазмідною або хромосомною локалізацією генів, що кодують антибіотикорезистентність (у разі плазмідної локалізації генів відбувається швидка внутрішньовидова і міжвидова поширеність резистентності, а

у випадках хромосомної локалізації спостерігається клонова поширеність резистентності); 3) за чутливістю до інгібіторів  $\beta$ -лактамаз – клавуланової кислоти, сульбактаму, тазобактаму та нових інгібіторів – релобактаму та авібактаму.  $\beta$ -лактамази класу А (генетичні групи TEM, SHV, GES, KPC) гідролізують природні й напівсинтетичні пеніциліни, цефалоспорини, монобактами та різняться за чутливістю до інгібіторів. Молекулярний клас С (генетичні групи AmpC, FOX-1, CMY), націлений переважно на руйнацію цефалоспоринів I-III поколінь, нечутливий до інгібіторів. Ферменти класу D (генетична група OXA) здатні гідролізувати пеніциліни, а також оксацилін та клоксацилін, карбапенеми і найчастіше виявляються у псевдомонад [171 - 173].

На відміну від ферментів трьох інших класів  $\beta$ -лактамази молекулярного класу В відносять до металоензимів (метало- $\beta$ -лактамази), оскільки у них у ролі коферменту присутній атом цинку. Небезпека ферментів цього класу зумовлена їхньою високою каталітичною активністю і широким спектром субстратної специфічності, який охоплює всі  $\beta$ -лактамні антибіотики, що існують. Описано 6 генетичних груп метало- $\beta$ -лактамаз: VIM, IMP, SPM, GIM, SIM та AIM [174 - 175].

Важливе епідеміологічне значення має топографія генів множинної резистентності до антибіотиків. Більшість генів, що кодують продукцію карбапенемаз, входять до складу високомобільних інтегронів, які швидко поширюються між мікроорганізмами за допомогою плазмід і транспозонів [176-178].

Крім того, у складі таких інтегронів нерідко присутні генні касети, що несуть гени стійкості до антибіотиків інших класів, і їхня передача супроводжується появою штамів із множинною стійкістю. Реальну небезпеку становлять плазмідні  $\beta$ -лактамази розширеного спектру (БЛРС) класу А грамнегативних бактерій. БЛРС локалізуються на плазмідах та гідролізують більшість  $\beta$ -лактамних антибіотиків – групи пеніцилінів, цефалоспоринів I, II і III поколінь та частково частково - IV покоління [179-180].

Стійкість ізолятів псевдомонад і ацінетобактерій до антибіотиків аміноглікозидного ряду може бути зумовлена продукцією однієї з трьох

відомих груп аміноглікозид-модифікувальних ферментів, а саме: аміноацетилтрансферазами, фосфорилазами чи аденілтрансферазами, які каталізують реакції приєднання до молекул антибіотика залишків оцтової чи фосфорної кислоти чи нуклеотиду аденіну, що й призводить до інактивації препарату. Гени, що контролюють синтез цих ферментів, у НФГНБ найчастіше теж розташовуються у плазмідах [181-182].

Тривалий проміжок часу ефективними антипсевдомондними препаратами залишалися фторхінолони. Однак, в останні роки більшість клінічно значимих штамів і псевдомонад, і ацінетобактерій не виявляють чутливості до антибіотиків цієї групи [183]. Основними механізмами стійкості неферментуючих грамнегативних бактерій до фторхінолонів є зміна структури ДНК-гірази та активне виведення препарату за межі бактеріальних клітин (ефлюкс) [184 - 185].

Окремим видом резистентності до антибіотиків будь-якої хімічної структури є біоплівкова стійкість, зумовлена як захисною функцією біоплівкового матриксу, так і присутністю у біоплівковій популяції бактерій клітин-персистерів [186-187].

Отже, НФГНБ біологічних видів *P. aeruginosa* та *A. baumannii* характеризуються сукупністю біологічних властивостей, які забезпечують їм універсальність поширення, потенційну здатність спричиняти патологічні зміни в організмі людей, стійкість до несприятливих впливів оточуючого середовища, а також широкого переліку протимікробних засобів, що застосовуються у медичній практиці. Перераховані характеристики вивели ці види бактерій на провідне місце у переліку бактеріальних патогенів людей [188].

Біологічними властивостями *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, які мають найбільше медичне значення, є здатність до плівкоутворення та стійкість до сучасних антибіотиків [189-190]. Подальше дослідження чинників, що впливають на інтенсивність утворення біоплівок ацінетобактеріями та псевдомонадами, допоможуть достовірно спрогнозувати вірогідність утворення високорезистентних форм збудників запальних процесів у клінічних умовах, та

зробити цей важливий біологічний процес керованим. Дослідження на фенотиповому та молекулярно-генетичному рівні як складних процесів, що відбуваються в популяції мікроорганізмів під впливом антимікробних сполук, допоможе одержати інструменти для прогнозування, контролю та запобігання стрімкого розповсюдження антибіотикорезистентності[191].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика джерел і методів виділення та ідентифікації штамів бактерій, використаних у дослідженні

Дослідження біологічних властивостей умовно-патогенних мікроорганізмів, їх ідентифікацію та оцінку клінічної значимості проводили за загальноприйнятими методиками в умовах акредитованої науково-дослідної бактеріологічної лабораторії кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

Матеріал для виділення НФГНБ забирали у пацієнтів, що лікувалися в опіковому відділенні Вінницької обласної клінічної лікарні ім. М. І. Пирогова. Від пацієнтів опікового відділення одержували зразки (гній, виділення) з ранових поверхонь для мікробіологічного дослідження. Частина штамів, використаних у дослідженнях, було виділено від поранених, які отримали мінно-вибухові травми з локалізацією в нижніх кінцівках. Поранені брали участь в антитерористичній операції на сході України, проходили лікування у військово-медичному клінічному центрі міста Вінниці, військових шпиталях Києва, Харкова, Дніпра.

Забір ранового вмісту проводили пластиковим аплікатором, який переносили у пробірку з транспортним середовищем SARSTEDT AG&Co Germany. Транспортування матеріалу проводили у відповідності до Наказу Міністерства охорони здоров'я України № 234 про організацію профілактики внутрішньолікарняних інфекцій в акушерських стаціонарах від 10.05.2007. Виділення чистих культур неферментуючих бактерій проводили чашковим методом з використанням м'ясо-пептонного агару, хромогенних агарів для *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (Graso Biotech). Контроль якості поживних середовищ проводили відповідно до рекомендацій фірм-виробників, які викладені у сертифікатах до продукції, а також відповідно до інформаційного листа МОЗ

України № 05.4.1/1670[192].

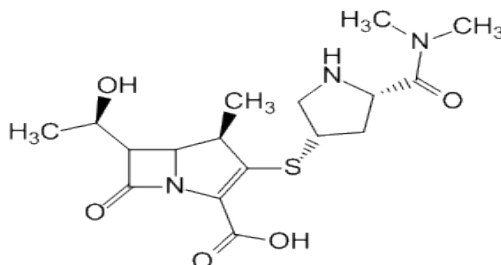
Ідентифікацію клінічних штамів мікроорганізмів виконували згідно загальноприйнятих мікробіологічних методів за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями згідно Визначника бактерій Берджі (2004). Біохімічне типування проводили на діагностичних панелях NEFERMtest 24 фірми PLIVA-Lachema a. s. Брно, Чеська республіка. Набір містить 24 біохімічних тести (індол, аргінін, уреаза, лізин, глюкоза, фруктоза, інозитол, сахароза, фосфатаза,  $\beta$ -галактозидаза,  $\beta$ -глюкоронідаза, N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідаза, манітол, ксилоза, целобіоза, галактоза, нітрати, нітрити, ескулін, гамма-глутамілтрансфераза, лактоза, мальтоза, трегалоза, цитрат Сімонса), розташованих в 3-рядовій пластинці, які були доповнені тестом для визначення цитохромоксидазної активності – ОКСІтестом. У випадку сумнівних результатів частину штамів додатково досліджували за допомогою автоматизованої системи ідентифікації бактерій (VITEK® 2 Biomerieux).

Усього в процесі роботи з досліджуваним матеріалом було виділено 81 штам НФГНБ мікроорганізмів, а саме: 1 штам *Alcaligenes faecalis*, 2 штами *Stenotrophomonas maltophilia*, 3 штами *Burkholderia cepacia*, 35 штамів *Acinetobacter baumannii* та 40 штамів *Pseudomonas aeruginosa*. З урахуванням малої кількості виділених штамів перших трьох біологічних видів і неможливості провести з ними дослідження, що дозволять зробити статистично достовірні висновки, у подальших дослідженнях використовували тільки виділені культури *Acinetobacter baumannii* та *Pseudomonas aeruginosa*. З метою порівняння у дослідженнях було використано 2 музейні штами: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 і *Acinetobacter baumannii* ATCC 15151, одержані із музею живих культур бактеріологічної лабораторії кафедри мікробіології ВНМУ ім. М.І. Пирогова.

Використані у дослідженнях штами бактерій мали типові для цих біологічних видів морфологічні, тинкторіальні, культуральні та біохімічні ознаки.

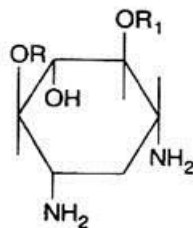
## 2.2. Характеристика хімічних реактивів та антибіотиків, використаних у дослідженні

Меропенем –  $C_{17}H_{25}N_3O_5S$ , антибіотик карбапенемового ряду для системного застосування.



У дослідженнях використаний серійний препарат виробництва ПАТ «Київмедпрепарат». Реєстраційне посвідчення №UA/10759/01/01 від 24.06.2015 р. Порошок від білого до світло-жовтого кольору для розчину для ін'єкції.

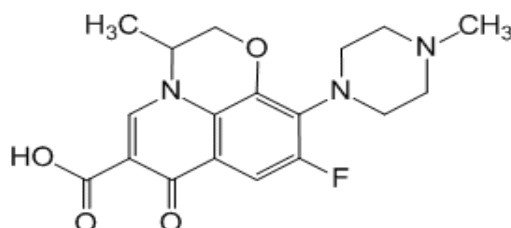
Амікацин –  $C_{22}H_{43}N_5O_{13}$ , антибіотик аміноглікозидного ряду для системного застосування.



де R, R<sub>1</sub> – аміноцукри

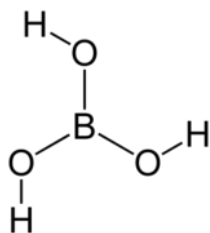
У дослідженнях використаний серійний препарат виробництва ПАТ «Київмедпрепарат». Реєстраційне посвідчення №UA/1036/01/04. Порошок від білого до світло-жовтого кольору для розчину для ін'єкції.

Левофлоксацин –  $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ , антибактеріальний засіб групи фторхінолонів. У дослідженнях використаний серійний препарат 0,5 % розчин для ін'єкцій виробництва ПАТ «Київмедпрепарат». Реєстраційне посвідчення № UA/11163/01/01 від 04.11.2015р.





Борна кислота –  $H_3BO_3$ , має властивості слабого антисептика, в медицині використовується у вигляді 2-4 % розчинів.



У медичній практиці нерідко використовується для лікування уражень різної локалізації, зумовлених синьо-гнійними паличками. У дослідженнях використані серійні зразки борної кислоти у вигляді порошку виробництва ФФ Віола. Реєстраційне посвідчення № UA 8303/01/01 від 04.09.2017 р.

Крім того, у дослідженнях використані: буфер BUFOROWANY ROZTWOR NaCl PERTONEM O PH 7.0 (Польща), гідроксид калію, сірчана кислота, хлорид натрію, сечовина, мальтоза, галактоза, лактоза, глюкоза.

### 2.3. Методи визначення фенотипової чутливості бактерій до антибіотиків

Чутливість виділених штамів мікроорганізмів до антибіотиків досліджували з використанням стандартного диско-дифузійного методу (ДДМ). За діаметром зон затримки росту мікроорганізмів навколо стандартного диска з певним антибіотиком клінічні ізоляти поділяли на чутливі, помірно стійкі та стійкі до дії цього антибактеріального засобу. Класифікацію штамів, що спричиняють розвиток інфекцій, пов'язаних з наданням медичної допомоги, за ступенем прояву резистентності провели відповідно до стандартів EUCAST. Штами, що виявили резистентність хоча б до одного антибіотика з трьох різних груп належать до полірезистентних (MDR multidrug-resistant). Штами, що виявили чутливість тільки до 1 чи 2 окремих препаратів із рекомендованого переліку належать до штамів з розширеною резистентністю (XDR extensively drug-resistant). Бактерії, виділені із рани, що виявили високий рівень чутливості до багатьох хіміопрепаратів, були визначені як неполірезистентні (nMDR).

Мінімальні бактеріостатичні (МБСК) та бактерицидні (МБЦК) концентрації

антибіотиків визначали методом послідовних серійних розведень антибіотиків у рідкому поживному середовищі (Методичні вказівки МВ 9.9.5-143-2007. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Київ: МОЗ України (2007). Для цього поживне середовище (МПБ) розливали у 2 мл пробірки. Потім у першу пробірку додавали 2 мл розчину досліджуваного антибіотика і готували послідовні двократні розведення препарату в поживному середовищі. У пробірки додавали завись досліджуваної культури в концентрації  $10^6$  колонієутворюючих одиниць (КУО) у кількості 0,2 мл. Пробірки розміщували в термостаті на 18-24 год.

Найменшу концентрацію препарату, котра затримувала візуально ріст мікробів після завершення інкубації, вважали мінімальною інгібуючою (або бактеріостатичною) концентрацією (МІК–МБсК). Мінімальну кількість препарату, котра викликала загибель мікроорганізмів після 24-годинної інкубації, визначали як мінімальну бактерицидну концентрацію (МБцК).

Досліди супроводжували відповідними контролюми (контроль середовища на стерильність; контроль росту культури в середовищі без препарату; контроль досліджуваного препарату). Досліди проводили в 3-х повторях з кожною концентрацією антимікробного засобу з метою отримання достовірних результатів.

#### 2.4. Методи виявлення генів резистентності до антибіотиків у неферментуючих бактерій

Для дослідження генетичного матеріалу культури направлялися до репозиторію полірезистентних мікроорганізмів Військового інституту досліджень ім. Волтера Ріда, США. Обмін культурами проводився в рамках «Згоди про подальший розвиток співробітництва та передачу матеріалів під час спільного дослідження» № W81XWH-17-0315 між Вінницьким національним медичним університетом ім. М. І. Пирогова та Інститутом досліджень центру Волтера Ріда, США. Загалом для аналізу у Військовому інституті досліджень ім. Волтера Ріда для дослідження були відібрані тільки ті культури, що за профілем

антибіотикорезистентності належали до полірезистентних (виявляли стійкість хоча б до одного антибіотика з трьох різних класів).

У репозиторії полірезистентних мікроорганізмів проводилося визначення первинної структури нуклеотидних послідовностей для всього генетичного матеріалу, що містили ізоляти. Дослідження проводилося методом сиквенування «нового покоління» (next – generation sequencing) на платформі Appliedbio systems / life technologies (SOLiD system) [193]. Для ідентифікації генів резистентності проводилося порівняння виділених нуклеотидних послідовностей за базою GenBank® у Національному центрі біотехнології та інформації (National Center for Biotechnology Information (NCBI) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>]). Для порівняння використовували технологію BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Нові послідовності, отримані від представлених мікроорганізмів внесено до цієї бази даних.

Визначення генів, які детермінують продукцію карбапенемаз молекулярного класу В (VIM), у досліджених бактерій виконали методом полімеразної ланцюгової реакції з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією продуктів ампліфікації в режимі «реального часу» в навчально – науковій клініко – діагностичній лабораторії ПЛР Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова. Ампліфікацію здійснили на приладі «BioRad IQ5» відповідно до методичних вказівок набору «ФЛУОРОПОЛ-РВ» комплектації «OneStep». Остаточну ідентифікацію генів резистентності ацінетобактерій, псевдомонад до карбапенемів (VIM) виконали за допомогою набору реагентів для визначення ДНК методом ПЛР в режимі «реального часу» відповідно до інструкції виробника (01784-РВ-С; ООО НПФ «Літех») [194].

## 2.5. Методика вивчення швидкості формування стійкості до антибіотиків у НФГНБ

Швидкість формування резистентності мікроорганізмів до амікацину, левофлоксацину та меропенему досліджували *in vitro* методом пасажування

мікроорганізмів у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) із збільшуваними концентраціями антибіотика. Для цього готували ряд послідовних двократних розведень меропенему у пробірках з м'ясо-пептонним бульйоном (МПБ). У пробірки додавали досліджувану культуру бактерій та інкубували протягом 24 годин у термостаті за температури 37°C. Після цього визначали в ряду пробірку з максимальною концентрацією антибіотика, в якій ще візуально спостерігається ріст бактерій і використовували її вміст як інокулят для наступного пасажу. Паралельно у кожному пасажі визначали мінімальну бактерицидну концентрацію (МБЦК) антибіотиків шляхом висіву вмісту пробірок, у яких візуально не відзначалося росту бактерій, на м'ясо-пептонний агар. Оскільки у досліджах використовували протимікробні препарати з бактерицидною дією, критерієм швидкості формування стійкості штаму бактерій до антибіотиків вважали середній показник МБЦК після проведення визначеної кількості пасажів у поживному середовищі з антибіотиком.

## 2.6. Методи дослідження плівкоутворювальної активності псевдомонад та ацінетобактерій

Вивчення біоплівкоутворювальної здатності клінічних ізолятів визначали за допомогою спектрофотометричного методу за G.D. Christensen (MtP-test «microtiterplatetest»), який полягає у відтворенні біоплівки на полімерних багатолункових планшетах з наступним забарвленням 1%-розчином кристалічного фіолетового [195 - 196].

Біоплівки моделювали в рідких поживних середовищах, відповідно до виду збудника. Культивування бактерій проводили у м'ясо-пептонному та триптон-соєвому бульйонах та у мінімальному середовищі: ізотонічний розчин хлориду натрію з додаванням окремих компонентів, вплив яких на інтенсивність плівкоутворення необхідно було визначити.

Визначення проводили в плоскодонних полістеролових 96-лункових планшетах для імуноферментного аналізу. Задля цього готували мікробну

суспензію з добової культури бактерій, яку розводили поживним середовищем у 100 разів до помутніння 0,5 за стандартом МакФарланда. Концентрація мікроорганізмів у 1 мл суспензії становила  $10^6$  КУО. Отримані суспензії додавали у кожну лунку по 200 мкл (по 8 лунок на кожний дослід), інкубували за температури 37°C протягом 24 год. Після завершення інкубації ретельно відмивали лунки планшетів віднеприкріплених клітин дистильованою водою, біоплівки фіксували 96% етанолом впродовж 10 хв, висушували і забарвлювали 1% розчином кристалічного фіолетового. Через 15 хвилин барвник видаляли, лунки промивали і після висушування додавали по 200 мкл етилового спирту для елюції барвника. Для негативного контролю один ряд планшета (8 лунок) був заповнений відповідним стерильним поживним середовищем.

Визначення оптичної густини (OD) проводили на мікропланшетному аналізаторі GBGChroMate 4300 (Awareness Technology, Inc., USA) за довжини хвилі 630 нм. OD для кожного штаму визначали у трьох повторах, результати усереднювали. Штам вважався позитивним щодо плівкоутворення, якщо середнє значення його OD було більшим, ніж середня оптична щільність негативного контролю, збільшена на три стандартних відхилення (SD): (OD негативного контролю +  $(3 \times SD)$  негативного контролю). OD негативного контролю розраховувалося для кожного планшета окремо. Інтенсивність плівкоутворення оцінювали за величиною відносного показника оптичної щільності [197].

Для вивчення інтенсивності плівкоутворення дослідженими штамами мікроорганізмів в умовах зниженого атмосферного тиску використовували апарат для вакуумної терапії ран Neaso-NP32S.

## 2.7. Математико-статистичні методи дослідження

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням пакету прикладних програм Microsoft Excel 2003, «BioStatLE», Medcalc. Аналіз якісних даних проводився за допомогою критерію  $\chi^2$ . Вираховувалися середні арифметичні значення для ряду даних (M) та похибки середніх величин (m);

стандартне відхилення (SD), верхній ( $Q_v$ ) та нижній ( $Q_n$ ) кватилі, як міри розсіювання; мінімальне ( $M_{\min}$ ) та максимальне ( $M_{\max}$ ) значення, як показники розмаху вибірки. Достовірність отриманих даних оцінювали шляхом парного порівняння та визначення довірчого інтервалу на підставі розрахунку коефіцієнта Стьюдента (t), у випадку нормального розподілу, та за критерієм U Манна-Уитні – в інших випадках. Відмінності вважали статистично значущими у відповідності з прийнятим у медико-біологічних дослідженнях показником  $p \leq 0,05$  [198].

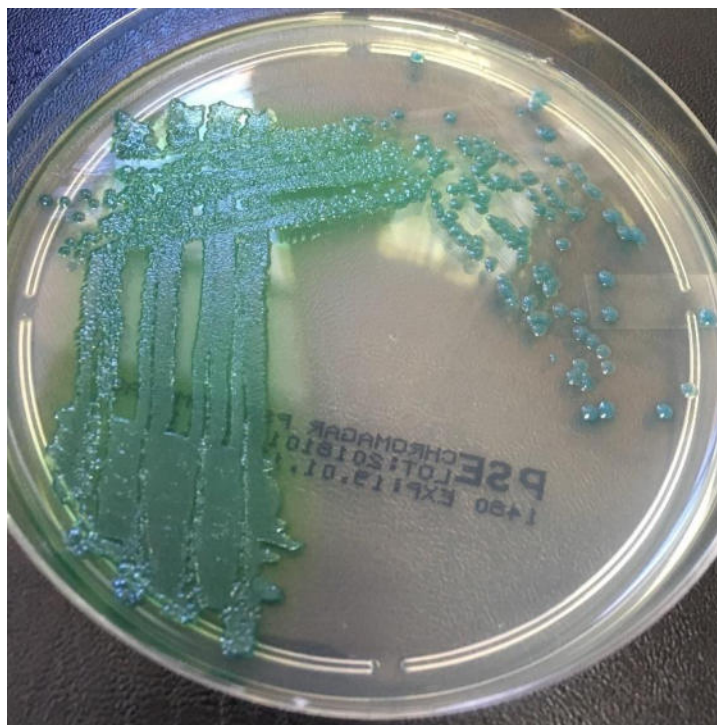
### РОЗДІЛ 3

## ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ ПСЕВДОМОНАД ТА АЦІНЕТОБАКТЕРІЙ

Грамнегативні неферментуючі бактерії родів *Pseudomonas* та *Acinetobacter* найпоширенішими у сьогоденні госпітальними і позагоспітальними патогенами, які характеризуються високою пластичністю біологічних властивостей іздатністю швидко адаптуватися до змін у оточуючому середовищі. Проявом модифікаційної мінливості бактерій цих родів є внутрішньовидова міжштамова гетерогенність морфологічних, культуральних та біохімічних характеристик.

У дослідженнях було використано 40 штамів *Pseudomonas aeruginosa*, виділених у пацієнтів із гнійно-запальними ураженнями м'яких тканин (ускладнення опікових та вогнепальних травм). Морфологічні характеристики усіх використаних у дослідженнях штамів псевдомонад були однотипними. У мазках, забарвлених за Грамом, клітини псевдомонад були тонкі, іноді зігнуті, неупорядковано розташовані у полі зору мікроскопа грамнегативні палички довжиною 3-5 мкм. У нативних препаратах виявляли рухливість.

У культуральних характеристиках псевдомонад спостерігалася певна неоднорідність. Усі виділені штами добре росли на простому МПА, однак, у первинному висіві міжштамові відмінності виявлялися в утворенні колоній усіх трьох типів (S-, R-, та M-колонії). У процесі 24-годинного культивування 28 (70 %) штамів продукували синьо-зелений пігмент, у трьох (7,5 %) штамів пігмент мав бурі відтінки (піорубін), 9 (22,5 %) штамів візуально не викликали помітних змін кольору середовища. На хромагарі для псевдомонад утворювали типові колонії синьо-зеленого кольору (рис.3.1). Проте, незалежно від форм колоній і пігментоутворення, ріст культур супроводжувався утворенням характерного для псевдомонад запаху.



**Рис. 3.1.** Ріст *Pseudomonasaeruginosa* на хромагарі для псевдомонад.

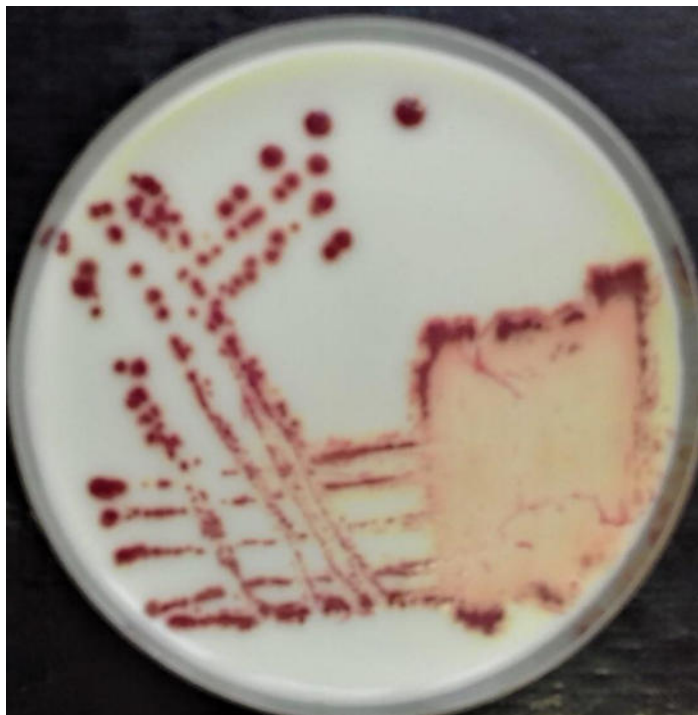
Досліджені штами *Acinetobacterbaumannii* (35) були виділені у тієї ж категорії хворих. У мазках клітини ацінетобактерій мали вигляд коротких овоїдних паличок розміром приблизно  $1,5 \times 2,5$  мкм. У полі зору мікроскопа вони розташовувалися компактними скупченнями або попарно. Частина штамів (4) у первинних висівах мали нетипову морфологію (тонкі грамнегативні палички, до 5 мкм довжиною, неупорядковано розташовані у полі зору). Під час забарвлення за Грамом, незалежно від особливостей морфології, клітини забарвлювалися грамнегативно, проте, у порівнянні з псевдомонадами, характеризувалися вищою інтенсивністю забарвлення. Рухливості не виявляли.

Ацінетобактерії добре росли на простому МПА, утворюючи помутнілі, опуклі, слизисті S-форми колоній. На хромогенному агарі для ацінетобактерій утворювали характерні забарвлені колонії червоного кольору (рис. 3.2).

Досліджені штами ацінетобактерій, здебільшого, виявляли типову ферментативну активність (табл. 3.1). Жоден із виділених штамів не продукував оксидази і уреазу, не виявляв здатності ферментувати аргініну, орнітину, лізину, манітолу, трегалози, мальтози, сахарози, інозиту, ескуліну. Усі досліджені штами



розщеплювали арабінозу і галактозу. Високий рівень гетерогенності штамів спостерігали у співставленні до лактози, яку здатні ферментувати 40% використаних у дослідженнях штамів ацінетобактерій, та за продукцією фосфатази (31,4 % штамів – позитивні; 68,6 % – негативні) і утилізації малонату (65,7 % штамів – позитивні; 34,3 % – негативні).



**Рис. 3.2.** Ріст *Acinetobacter baumannii* на хромагарі для ацінетобактерій.

Ряд одержаних нами біохімічних показників виділених штамів не співпадав з характерними для біологічного виду, згідно із ідентифікаційними таблицями виробника тест-систем NEFERMtest 24. Так, згідно таблиць *A. baumannii* не продукують  $\beta$ -глюкозидази і завжди утилізують цитрат Сімонса. Поміж досліджених нами, 3 штами виявилися позитивними за продукцією  $\beta$ -глюкозидази і 4 штами не утилізували цитрату під час трикратного повторення досліді з використанням панелі NEFERMtest 24. До того ж, видова належність штамів була підтверджена за допомогою автоматичного бактеріологічного аналізатора.

Таблиця 3.1

## Біохімічні властивості бактерій, використаних у дослідженнях

№	Тест	Вид бактерій	
		<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		Кількість штамів з позитивною/негативною ознакою	
1.	Оксидаза	0/35	40/0
2.	Уреаза	0/35	38/2
3.	Аргінін	0/35	40/0
4.	Орнітин	0/35	0/40
5.	Лізін	0/35	0/40
6.	Ацетамід	0/35	40/0
7.	β- глюкозидаза	3/32	5/35
8.	N - ацетилβ-D-глюкозамінідаза	5/30	1/39
9.	Цитрат	31/4	40/0
10.	Лактоза	14/21	0/40
11.	Манітол	0/35	18/22
12.	Трегалоза	0/35	4/36
13.	Ксилоза	33/2	34/6
14.	Арабіноза	35/0	35/5
15.	α-галактозидаза	0/35	0/40
16.	β-галактозидаза	0/35	0/40
17.	Малонат	23/12	37/3
18.	Галактоза	35/0	40/0
19.	Мальтоза	0/35	2/38
20.	Целобіоза	19/16	2/38
21.	Сахароза	0/35	1/39
22.	Інозитол	0/35	0/40
23.	γ-глутамілтрансфераза	7/28	40/0
24.	Фосфатаза	11/24	9/31
25.	Ескулін	0/35	11/29

Досліджені штами *P. aeruginosa* здебільшого теж характеризувалися

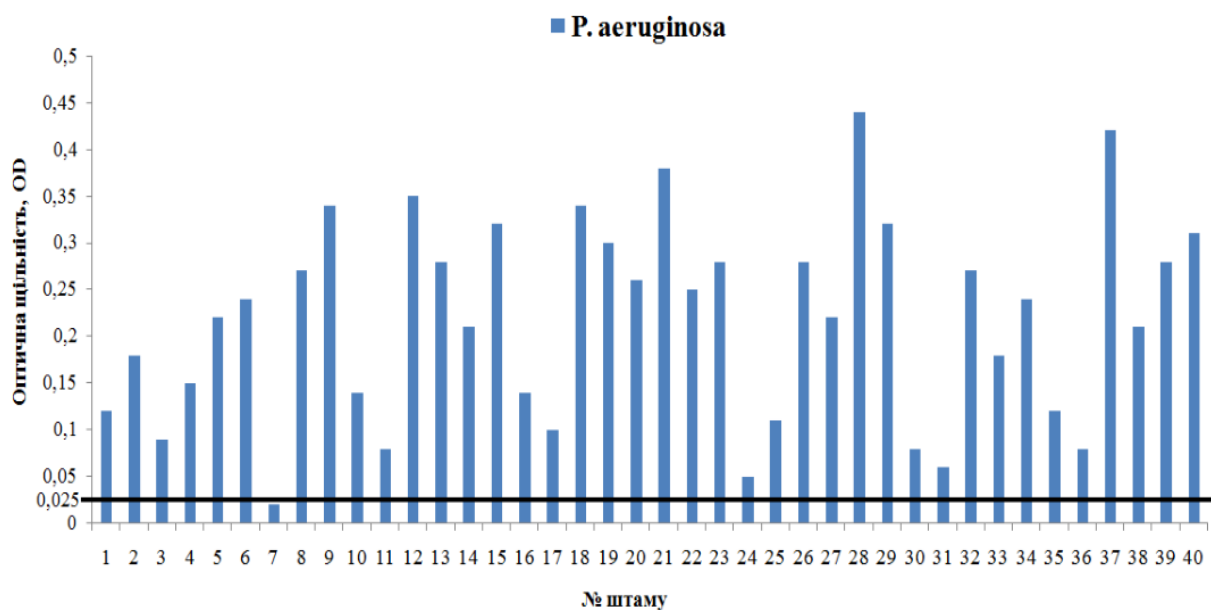
типовими біохімічними властивостями. Усі штами були оксидазопозитивними, більшість (38 з 40) продукували уреазу, жоден неутилізував орнітину, лізину та лактози. Високий рівень варіабельності увиділених штамів псевдомонад спостерігали відповідно до манітолу (45 % штамів за ознакою позитивні, 55 % штамів – негативні). Однак, варіабельність цієї ознаки різних штамів *P. aeruginosa*, як і ферментація трегалози, ксилози та арабінози, є загальновідомою властивістю виду.

Здатність до швидкої фіксації на твердих поверхнях і утворення біоплівок є найважливішою біологічною властивістю грамнегативних неферментуючих бактерій родів *Acinetobacter* та *Pseudomonas*, що допомагає їм виживати у несприятливих умовах і заселяти чисельні екологічні ніші. Нами визначено здатність до плівкоутворення усіх використаних у дослідженні штамів неферментуючих бактерій за умови культивування в триптон-соєвому бульйоні за температури 37°C.

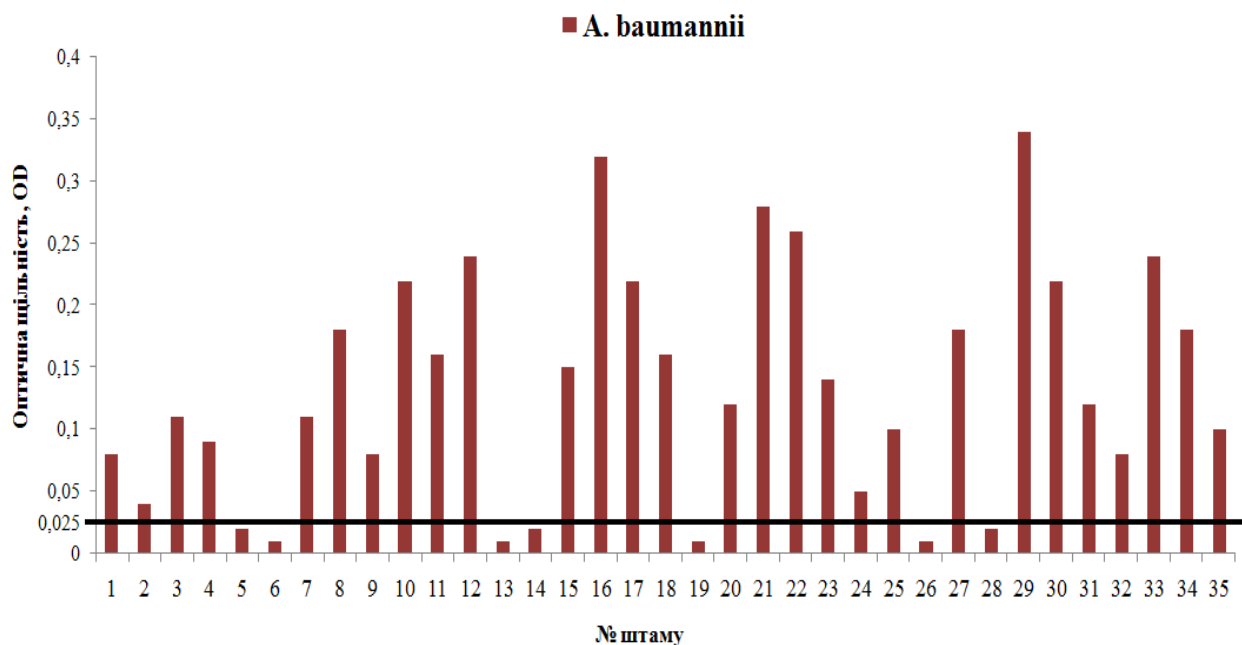
Оптичну щільність (OD) для кожного штаму визначали у трьох повторах, результати усереднювали. Штам вважався позитивним щодо здатності до плівкоутворення, якщо середнє значення його OD було більшим, ніж середня оптична щільність негативного контролю збільшена на три стандартних відхилення (SD):  $(OD \text{ негативного контролю} + (3 \times SD \text{ негативного контролю}))$ . OD негативного контролю розраховувалося для кожного планшета окремо. Плівкоутворювальну активність досліджених штамів *P. aeruginosa* ілюструє рис. 3.3.

Результати досліджень свідчать про істотні міжвидові та міжштамові відмінності за здатністю до плівкоутворення та інтенсивністю вираженості цієї біологічної ознаки. Чорна горизонтальна лінія на діаграмі означає найменше значення оптичної щільності, вище якого штам вважався позитивним за ознакою здатності до плівкоутворення. З цієї кількості досліджених штамів (40) лише один (2,5 %) належав до таких, що не здатні до плівкоутворення. Середній показник ( $M \pm SD$ ) інтенсивності утвореної плівки дорівнював  $0,22 \pm 0,02$ . У досліджених штамів ацінетобактерій плівкоутворююча активність була помітно нижчою, що

підтверджують наведені показники на рис. 3.4.



**Рис. 3.3.** Рівень плівкоутворюючої активності досліджених штамів *P. aeruginosa*.



**Рис. 3.4.** Рівень плівкоутворюючої активності досліджених штамів *A. baumannii*.

За обраним критерієм 7 з 35 штамів цього виду (20 %) не виявляли здатності

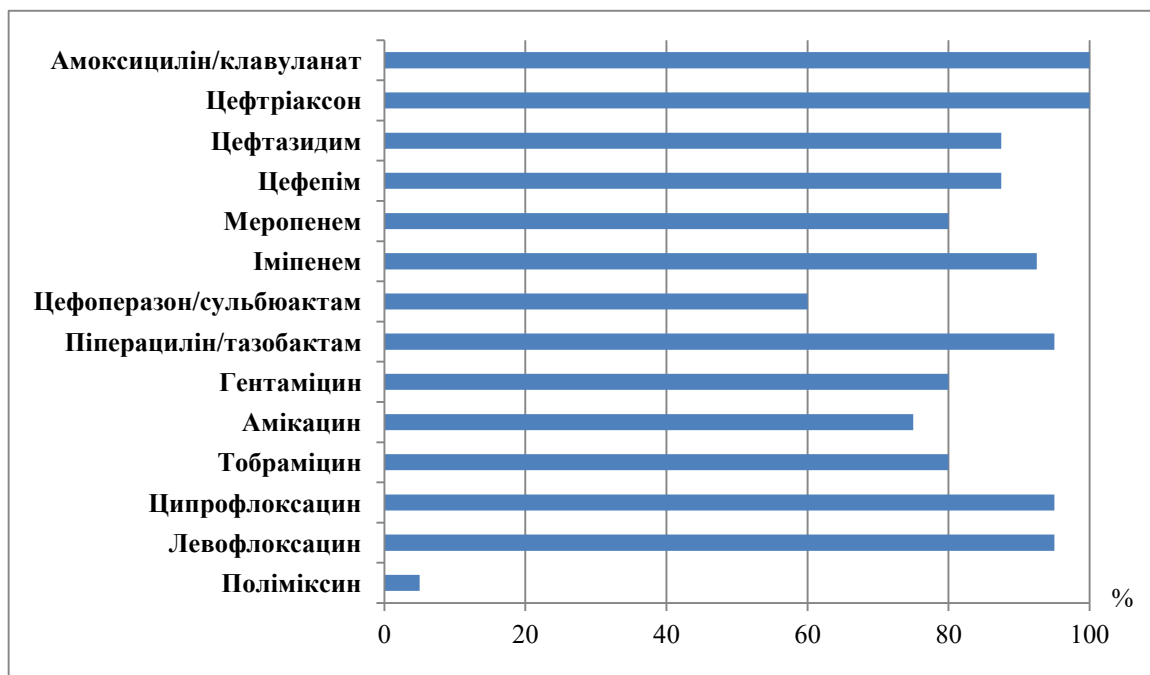
до плівкоутворення. Середній показник інтенсивності плівкоутворення ( $0,13 \pm 0,02$ ) теж був статистично достовірно нижчим, ніж у псевдомонад. Дотого ж, 60 % досліджених штамів *P. aeruginosa* мали показник інтенсивності плівкоутворення вищий за середнє значення. Серед штамів *A. baumannii* лише 45 % за інтенсивністю плівкоутворення перевищували середній показник.

Найнебезпечнішою характеристикою псевдомонад і ацінетобактерій є високий рівень їх природної та набутої резистентності до антибіотиків. Наявність стійкості до багатьох антибіотиків виявляється навіть у «диких» штамів цих бактерій, виділених з середовища, незабрудненого продуктами діяльності людей. Лікарняні штами, зазвичай, характеризуються одночасною наявністю декількох механізмів стійкості до  $\beta$ -лактамних антибіотиків, аміноглікозидів, фторхінолонів, амфеніколів, тетрациклінів. Формування резистентності у всіх випадках зумовлене генетично: набуттям нової генетичної інформації або зміною рівня експресії власних генів. Швидке розповсюдження стійкості до антибіотиків серед неферментуючих бактерій значною мірою зумовлене тим, що генетичні детермінанти механізмів стійкості у них найчастіше локалізовані всередині мобільних генетичних елементів – інтегронів або кон'югативних плазмід.

Результати проведеного нами вивчення фенотипової чутливості та носійства генетичних детермінант стійкості до антибіотиків дослідженими клінічними штамами псевдомонад та ацінетобактерій, виділеними у пацієнтів лікувальних закладів України, підтверджують сучасні глобальні тенденції розповсюдження високорезистентних варіантів цих видів бактерій. Рівень стійкості до найбільш широко вживаних у клінічній практиці антибіотиків, поміж рекомендованих до визначення для *P. aeruginosa* Керівництвом EUCAST, відображено на рис. 3.5.

Понад 80 % взятих нами у дослідження штамів псевдомонад були резистентними до цефтазідіму, цефепіму меропенему, іміпенему, піперациліну-тазобактаму, гентаміцину, тобраміцину, ципрофлоксацину. Жоден досліджений штам не виявляв чутливості до амоксацилін-клавуланату, цефтриаксону і левофлоксацину. Стійкість до амікацину, який часто емпірично застосовується як

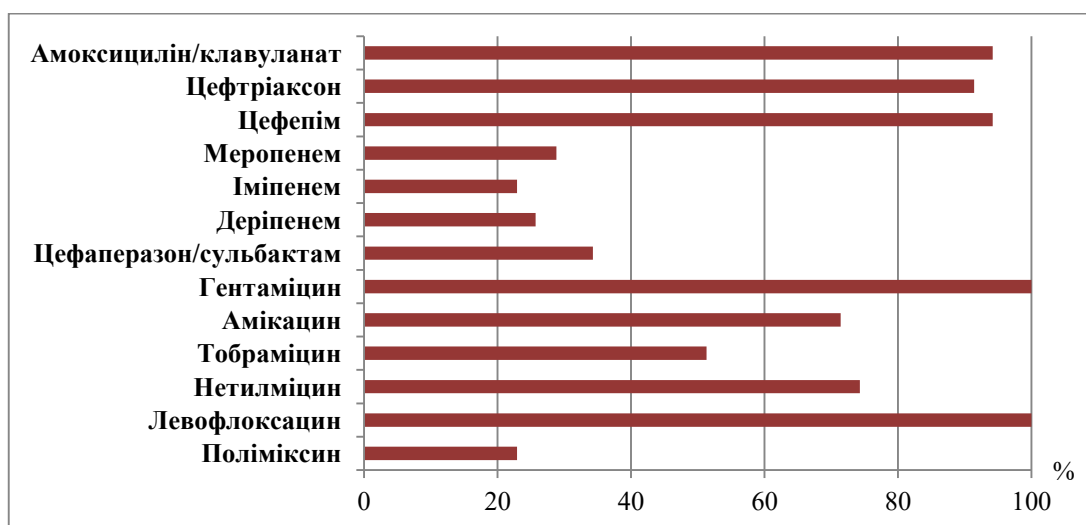
антипсевдомонадний засіб, виявило 75 % досліджених штамів. Відносно ефективним, у порівнянні з іншими антибіотиками, виявився захищений сульбактамом цефоперазон, чутливість до якого виявили 40 % досліджених штамів. Найнижчий рівень резистентності у псевдомонад виявлено до поліміксину, стійкими до якого виявилися тільки 2 з 40 взятих у дослідження штамів *P. aeruginosa*.



**Рис. 3.5.** Характеристика рівня резистентності досліджених штамів *P. aeruginosa* до антибіотиків.

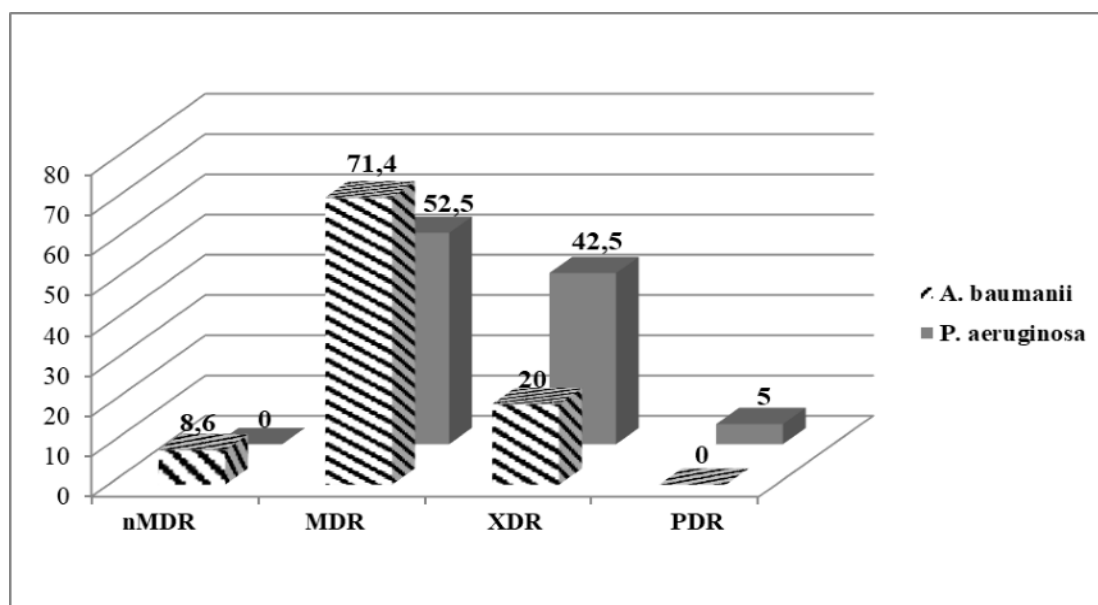
Досліджені штами ацінетобактерій теж характеризувалися високим рівнем стійкості до антибіотиків. Жоден із досліджених штамів не виявляв чутливості до гентаміцину, 94,2 % штамів були стійкими до амоксициліну-клавуланату і цефепіму, 91,4 % штамів – до цефтріаксону. Понад 70 % штамів виявляли стійкість до антибіотиків аміноглікозидного ряду амікацину і нетилміцину. Відносно чутливими ацінетобактерії виявилися до карбапенемових антибіотиків меропенему, іміпенему і доріпенему, стійкими до яких були лише 28,8 %, 22,9 %, 25,7 % штамів відповідно. Крім того, лише близько третини досліджених штамів були резистентними до захищеного цефоперазону. Поліміксин щодо ацінетобактерій виявився теж достатньо дієвим. Однак, у порівнянні з

псевдомонадами (5 % резистентних штамів), рівень стійкості був значно вищим (22,9 % резистентних штамів) (рис. 3.6).



**Рис. 3.6.** Характеристика рівня резистентності до антибіотиків досліджених штамів *A. baumannii*.

Класифікація досліджених штамів неферментуючих бактерій за ступенем прояву резистентності, проведеним відповідно до стандартів EUCAST, має такий вигляд, як зображено на рисунку 3.7.



**Рис. 3.7.** Розподіл досліджених штамів неферментуючих бактерій на групи за рівнем резистентності до антибіотиків.

Серед псевдомонад, штамів, які слід віднести до немультрезистентних (nMDR), не виявлено. З поміж штамів *A. baumannii* до цієї групи належать 8,6 %. Переважна більшість (71,4 %) досліджених ацетобактерій належали до групи мультрезистентних (MDR). У *P. aeruginosa* MDR-штамів було менше за рахунок зсуву на користь групи штамів із розширеною резистентністю (XDR), відносна кількість яких становила 42,5 %. Серед ацетобактерій показник належності до XDR-штамів дорівнював 20%. Крім того, серед псевдомонад 5 % штамів належали до панрезистентних (PDR), тоді як серед *A. baumannii* таких варіантів не виявлено.

Порівнюючи фенотипово виявлені рівні резистентності неферментуючих бактерій двох видів, слід зазначити високу стійкість обох видів до широкого переліку сучасних антибіотиків. Однак, у медичному сенсі більш проблемним є *P. aeruginosa*, оскільки загалом за інтегральною оцінкою характеризуються дещо вищим рівнем стійкості.

У результаті вивчення молекулярно-генетичних характеристик досліджених штамів неферментуючих бактерій та мультилокусного сиквенс-типуювання було встановлено, що їхня генетична структура характеризується певним різноманіттям неспоріднених сиквенс-типів, до того ж, значна частка належить до міжнародних клонів високого епідемічного ризику. Так, 40 % досліджених штамів *A. baumannii* належать до сиквенс-типу ST78 за схемою Pasteur, представників якого ізолювали у Німеччині, Італії, США, Росії, Грузії, Білорусі та в інших країнах. Небезпечність цього клону ацетобактерій спричинена абсолютною стійкістю до  $\beta$ -лактамних антибіотиків, зумовленою наявністю генів, відповідальних за синтез  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру дії *bla*CTXM-115 та OXA40-подібної карбапенемази *bla*OXA72 [199-200].

Серед досліджених штамів *P. aeruginosa* було виявлено представників двох глобальних клонів високого ризику, а саме: ST235 (4 штами) та ST1047 (3 штами). Географія поширення цих клонів є по-справжньому глобальною, оскільки охоплює країни Європи, Азії, Африки, Північної та Південної Америки. Ці варіанти псевдомонад є носіями генів, відповідальних за синтез метало- $\beta$ -лактамаз *bla*IMP-34 та *bla*VIM-2. Означені гени належать до складу інтегронів



1-го класу, в складі генних касет яких акумулюються генетичні детермінанти стійкості до антибіотиків різних класів, і які у складі мобільних генетичних елементів поширюються по горизонталі у мікробних популяціях. Перелік генетичних детермінант стійкості до антибіотиків, виявлених у досліджених штамів неферментуючих бактерій, наведено у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

**Перелік генетичних детермінант резистентності до  $\beta$ -лактамних, аміноглікозидних та фторхінолонових антибіотиків, виявлених у досліджених штамів неферментуючих бактерій**

Хімічна група антибіотиків	Генетичні детермінанти стійкості	
	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
$\beta$ -лактами	<i>blaGES-11; blaADC-25; blaADC-152; blaTEM-1D; blaCTX-M115; blaCTX-M124; blaPER-1; blaCARB-16; blaOXA-90; blaOXA-66; blaOXA-72; blaOXA-100; blaOXA-23; blaOXA-69</i>	<i>blaIMP-1; blaIMP-34; blaVIM-2; blaNDM-1; blaPAO; blaVEB-1; blaVEB-9; blaPER-4; blaPDC-11; blaPDC-12; blaPDC-16; blaPDC-31; blaPDC-35; blaPDC-98; blaOXA10; blaOXA-14; blaOXA-50; blaOXA-395; blaOXA-396; blaOXA-488; blaOXA-846; blaCARB-2</i>
Аміноглікозиди	<i>aac(3)-Ia; ant(2'')-1a; ant(3'')-1a; ant(3)-IIa; aph(3')-1c; aph(3)-Via; aph(3')-Vib; aph(6)-1d; armA; aac(6')-1b; aacA5; aac(6')-Iap</i>	<i>aacA4; aacA8; rmtB4; aac(6)-1b; aac(6')-1b4; aac(6')-II; aac(3)-I; aac(3)-Ib; aadAI; aadAII; aadA6; aadB; aph(3')-IIb; aph(3')-Ic; aph(6)-1d; aph(3')-VIa; aph(3')-VIIb; aph(3'')-1b</i>
Фторхінолони	—	<i>VCqnr1; aac(6')-II</i>

Резистентність до пеніцилінів і цефалоспоринів досліджених штамів *A. baumannii* була зумовлена наявністю широкого переліку генів серинових  $\beta$ -лактамаз усіх трьох молекулярних класів (A, C, D). Стійкість до карбапенемів – наявністю генів  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру дії молекулярних класів A і D: *blaGES-11, blaOXA-90, blaOXA-66, blaOXA-72, blaOXA-100, blaOXA-23,*

*blaOXA-69*. Всього у досліджених штамів виявлено 14 різних генетичних детермінант резистентності до  $\beta$ -лактамних антибіотиків. Метало- $\beta$ -лактамаз класу В серед штамів ацінетобактерій, які циркулюють у лікувальних закладах м. Вінниця не виявлено.

Взяті до дослідження штами *P. aeruginosa* виявилися носіями 22 різних генів стійкості до  $\beta$ -лактамів. До того ж заслуговує особливої уваги поширеність серед досліджених штамів генів, відповідальних за синтез метало- $\beta$ -лактамаз, які зумовлюють абсолютну стійкість до антибіотиків цієї групи, не інактивуються блокаторами  $\beta$ -лактамаз і у складі мобільних генетичних елементів можуть поширюватися у мікробних популяціях. Носіями таких генів виявилися 20 % досліджених штамів псевдомонад. Найчастіше (у 5 штамів) виявлялися гени метало- $\beta$ -лактамаз *blaIMP*-типів. У двох випадках продукцію метало-ферментів кодували гени *blaVIM-2* і один штам виявився носієм Нью-Делі-метало- $\beta$ -лактамази *blaNDM-1*.

Резистентність до антибіотиків аміноглікозидного ряду мікроорганізмів обох видів була спричинена наявністю генів широкого переліку варіантів аміноглікозид-ацетилтрансфераз (*aac*), аміноглікозид-аденілтрансфераз (*ant*, *aad*) та аміноглікозид-фосфотрансфераз (*aph*). У псевдомонад було виявлено 18 варіантів таких генетичних детермінант, у ацінетобактерій – 11. В окремих штамів *A. baumannii*, крім того, було виявлено здатність синтезувати 16S-метилтрансферазу, яка інактивує всі антибіотики-аміноглікозиди.

Відомо, що стійкість до фторхінолонів у неферментуючих бактерій найчастіше викликана точковими мутаціями і амінокислотними замінами у структурі ДНК-гірази і топоізомерази [201].

В окремих штамів *P. aeruginosa*, крім того, були виявлені гени *aac(6')-II*, що кодують синтез ацетилтрансфераз, здатних модифікувати молекули не лише аміноглікозидів, але й фторхінолонів, та *qnrVC1*, відповідальний за синтез захисного для гіраз і топоізомераз білка.

Узагальнюючи результати досліджень, наведені у цьому розділі, варто відзначити, що штами неферментуючих грамнегативних бактерій біологічних

видів *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, які зумовлюють розвиток гнійно-запальних ускладнень у пацієнтів лікувальних закладів хірургічного та комбустіологічного профілю в Україні, характеризуються гетерогенністю окремих біологічних властивостей. Міжштамова варіабельність морфологічних та культуральних ознак, а також характеристик ферментативної активності, визначених рутинними загальноприйнятими лабораторними методами, можуть ускладнювати ідентифікацію і призводити до діагностичних помилок.

Циркуляторніштами ацінетобактерій і псевдомонад характеризуються високим рівнем плівкоутворювальної активності та у випадку колонізації ранових поверхонь плівковою формою можуть викликати складнощі у елімінації за рахунок набуття вищого ступеню стійкості до зовнішніх фізичних та хімічних впливів, а також обмеження впливу імунних чинників. Одночасно, *P. aeruginosa* виявляють вищу плівкоутворювальну активність, у порівнянні з *A. baumannii*. Так, з-поміж досліджених нами штамів *A. baumannii*, 20 % не виявляли здатності до плівкоутворення, тоді як серед штамів *P. aeruginosa* таких було лише 2,5 %. Умови, що стимулюють або пригнічують плівкоутворювальну активність неферментуючих бактерій потребують подальшого вивчення.

Результати мультилокусного сиквенс-типування досліджених штамів показали появу в лікувальних закладах України міжнародних клонів неферментуючих бактерій високого епідемічного ризику, а саме *A. baumannii* ST78, *P. Aeruginosa* ST235 та ST1047. Питома вага таких штамів серед досліджених псевдомонад становила 17,5 %, а у *A. baumannii* сягала 40%. Означені варіанти неферментуючих бактерій характеризуються носійством чисельних генетичних детермінант стійкості до антибіотиків. Досліджені штами загалом виявилися носіями 36 різних генетичних детермінант стійкості до  $\beta$ -лактамних антибіотиків, а також генів серинових карбапенемаз *bla*GES-11, *bla*OXA-72, *bla*OXA-23; генів метало- $\beta$ -лактамаз *bla*IMP-1, *bla*IMP-34, *bla*VIM-2, *bla*NDM-1. Штами обох видів мали гени повного переліку трансфераз, що інгібують дію антибіотиків аміноглікозидного ряду.

Фенотипові прояви стійкості до антибіотиків цілком відповідали

молекулярно-генетичним характеристикам, адже понад 80 % штамів *P. aeruginosa* виявляли резистентність до цефалоспоринів III-IV поколінь, карбапенемів та фторхінолонів. За стандартами, 52,5 % штамів цього виду належали до мультирезистентних, а 42,5 % – до штамів із розширеною резистентністю. Ацінетобактерії демонстрували дещо нижчий рівень фенотипової резистентності, оскільки залишалися відносно вищою чутливістю до карбапенемів, проте у 72,4 % випадків теж належали до мультирезистентних.

Означені біологічні характеристики ізольованих госпітальних штамів *A. baumannii* та *P. aeruginosa* вимушують визнати їхню небезпечність для здоров'я людей, велике медичне значення і потребують подальшого вивчення і пошуку засобів впливу.

## РОЗДІЛ 4

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ХІМІЧНИХ ТА ФІЗИЧНИХ ЧИННИКІВ НА ПЛІВКОУТВОРЮЮЧУ АКТИВНІСТЬ НФГНБ

Важливим елементом стратегії виживання усіх представників таксономічного домену *Bacteria* є здатність до утворення біоплівки. НФГНБ у переліку представників цього домену відомі високо вираженою здатністю до біоплівкоутворення, що у значній мірі зумовлює їхнє медичне значення. Особливе місце серед інших НФГНБ у цьому сенсі посідають види *P. aeruginosa* та *A. baumannii*. Адже високорезистентні до впливу зовнішніх несприятливих чинників сесильні форми цих видів бактерій спричиняють стійку колонізацію не лише різноманітних об'єктів навколишнього середовища, але й санітарно-технічного обладнання у медичних закладах, катетерів, дихальних контурів апаратів штучної вентиляції легень, медичних імплантантів і, зрештою, ранових поверхонь.

Утворення бактеріальних біоплівок - багатоетапний динамічний процес, який регулюється складною системою міжклітинних комунікацій, а також quorum sensing, що забезпечує координовану експресію генів у популяції бактерій та її функціональну диференціацію.

Закономірності формування складних структурованих мікробних спільнот активно вивчаються. Однак, на сьогодні залишається без відповіді ряд питань. Накопичення даних щодо впливу різноманітних чинників на процес утворення бактеріями біоплівок може бути основою для розробки методів його регуляції.

#### 4.1. Вплив складу середовища культивування на плівкоутворюючу активність *P. Aeruginosa* та *A. baumannii*

З метою дослідження впливу складу середовища культивування на інтенсивність плівкоутворення псевдомонадами і ацінетобактеріями, нами були визначені показники активності цього процесу під час культивування протягом доби

за температури 37°C у «голодному» середовищі – стерильній воді для ін'єкцій, стерильному ізотонічному розчині хлориду натрію та стерильній воді для ін'єкцій з додаванням 1 % однієї з таких речовин: глюкози, мальтози, галактози, аргініну, лізину, сечовини. Крім того, було визначено інтенсивність плівкоутворення досліджених штамів в умовах додавання до «голодного середовища» 1 % нормальної сироватки крові коня. Показники оцінювали у порівнянні з такими прикультивування у триптон-соевому бульйоні (ТСБ). У дослідженнях використали по 5 штамів кожного виду бактерій, показники інтенсивності плівкоутворення яких у триптон-соевому бульйоні дорівнювали середнім для досліджуваної популяції у межах середньої похибки ( $0,22 \pm 0,02$  для *P. aeruginosa*;  $0,13 \pm 0,02$  для *A. baumannii*). Одержані результати узагальнено в табл. 4.1.

Таблиця 4.1

**Показники інтенсивності плівкоутворення в середовищі у присутності різних складових**

Умови культивування	Вид мікроорганізмів	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
	Відносний показник оптичної густини	
Вода для ін'єкції	$0,004 \pm 0,001$	$0,094 \pm 0,011$
Ізотонічний розчин NaCl	$0,152 \pm 0,023$	$0,098 \pm 0,018^2$
1 % розчин глюкози	$0,174 \pm 0,025^{1,2}$	$0,100 \pm 0,021^2$
1 % розчин мальтози	$0,182 \pm 0,026^{1,2}$	$0,106 \pm 0,025^2$
1 % розчин галактози	$0,182 \pm 0,026^{1,2}$	$0,102 \pm 0,022^2$
1 % розчин аргініну	$0,148 \pm 0,028^2$	$0,096 \pm 0,011^2$
1 % розчин лізину	$0,154 \pm 0,028^2$	$0,094 \pm 0,013^2$
1 % розчин сечовини	$0,202 \pm 0,016^{1,2}$	$0,104 \pm 0,018^2$
1 % розчин сироватки	$0,232 \pm 0,025^1$	$0,132 \pm 0,024^1$
Триптон-соевий бульйон	$0,228 \pm 0,018$	$0,136 \pm 0,025$

Примітка: <sup>1</sup> – різниця достовірна ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ростом тієї ж культури в ізотонічному розчині хлориду натрію; <sup>2</sup> – різниця достовірна ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ростом у триптон-соевому бульйоні.

Аналіз наведених у табл. 4.1 даних свідчить про те, що у процесі культивування досліджених штамів мікроорганізмів в умовах відсутності будь-яких поживних речовин (стерильній воді для ін'єкцій) ацінетобактерії зберігають здатність до плівкоутворення, на відміну від псевдомонад. Середній показник інтенсивності утворення біоплівки *P.aeruginosa* в таких умовах не відрізнявся від негативного контролю, а у досліджених штамів *A. baumannii* становив  $0,094 \pm 0,011$ . Таку здатність ацінетобактерій важко пояснити, враховуючи наявні уявлення про поширення закону збереження маси на всі біологічні процеси. Лише можна константувати високі адаптивні можливості цього виду бактерій та припустити наявність у нього певних внутрішніх резервів для виживання в екстремальних умовах.

Інтенсивність утворення біоплівок *A. baumannii* у ізотонічному розчині хлориду натрію істотно не відрізнялася від такої у дистильованій воді, хоча була достовірно нижчою, ніж підчас культивування у повноцінному штучному живильному середовищі (ТСБ). У таких умовах псевдомонади виявляли здатність до утворення біоплівок, однак, інтенсивність плівкоутворення була теж істотно нижчою ( $0,152 \pm 0,023$ ), ніж або для ТСБ ( $0,228 \pm 0,018$ ), що легко пояснити браком пластичного матеріалу.

Основою біоплівкового матриксу є полісахариди. Тому, введення в середовище культивування цукрів може сприяти утворенню бактеріями біоплівок. Однак, введення нами у склад «голодного» середовища культивування глюкози чи мальтози не змінювало інтенсивності плівкоутворення ацінетобактеріями. Показники оптичної щільності утворених біоплівок до того ж статистично достовірно не відрізнялися від таких у процесі культивування у стерильній воді та фізіологічному розчині хлориду натрію. Так само, не спостерігалось зростання активності плівкоутворення і у присутності галактози, хоча у НЕФЕРМ-тесті досліджені штами за ознакою утилізації галактози були позитивними. У досліджених штамів *P. aeruginosa* в таких умовах інтенсивність плівкоутворення зростала і була статистично достовірно вищою, ніж підчас культивування у воді чи ізотонічному розчині. Одночасно, не мало значення який саме з трьох цукрів був

доданий до середовища та здатності його розщеплювати, встановленій у НЕФЕРМ-тесті.

У НЕФЕРМ-тесті *A. baumannii* не розщеплювали амінокислоти аргінін та лізин. *P. aeruginosa* утилізували аргінін і не розщеплюють лізин. Додавання нами у «голодне» середовище будь-якої з цих кислоту концентрації 1% не призвело до змін плівкоутворювальної активності псевдомонад і ацінетобактерій, показники оптичної густини елюату не відрізнялися від такої у процесі культивування у ізотонічному розчині. Тобто, поява у середовищі цих азотовмісних сполук не стимулювала утворення біоплівки обома видами неферментуючих бактерій. Однак, на введення у середовище простішої за будовою низькомолекулярної азотовмісної речовини сечовини ацінетобактерії та псевдомонади відреагували по-різному. Ацінетобактерії не змінювали плівкоутворювальної активності у присутності у поживному розчині 1% сечовини. Уреаза позитивні штами псевдомонад нарощували інтенсивність плівкоутворення до показника оптичної густини  $0,202 \pm 0,016$ , що перевищувало показник культивування у ізотонічному розчині більш ніж на 30 %.

Найвищий рівень плівкоутворюючої активності обидва види неферментуючих бактерій виявляли в присутності протеїнів тваринної сироватки. Показники плівкоутворюючої активності бактерій обох видів у присутності нормальної конячої сироватки стали близькими до показників культивування у повноцінному поживному середовищі (ТСБ). Відносний приріст показника інтенсивності плівкоутворення за умови присутності сироватки, у порівнянні з культивуванням у ізотонічному розчині, у *A. baumannii* склав 34 %, а у *P. aeruginosa* – 48 %.

Отже, культивування ацінетобактерій і псевдомонад у «голодних» середовищах із додаванням окремих додаткових компонентів показало, що за відсутності мінеральних і будь-яких поживних речовин псевдомонади не здатні утворювати біоплівки, тоді як ацінетобактерії все ж зберігають здатність до переходу у плівкову форму. Додавання у середовище лише хлориду натрію забезпечує плівкоутворення псевдомонадами. Вочевидь, відсутність катіонів



натрію та аніонів хлору обмежує фізіологічну активність цього виду бактерій.

Наявність у середовищі культивування простих цукрів (моноцукрів глюкози та галактози чи дисахариду мальтози) не впливає на плівкоутворювальну активність ацінетобактерій, водночас стимулює інтенсивність плівкоутворення у псевдомонад. На підставі означеного вище, процес плівкоутворення у *P. aeruginosa* можна визнати більш залежним від іонного складу середовища і наявності у ньому джерел енергії та пластичного матеріалу, ніж у *A. baumannii*.

Наявність у середовищі азотвмісних сполук не є обов'язковою умовою плівкоутворення для обох видів неферментуючих бактерій, адже цей процес здійснюється і за їхньої відсутності. Додавання у середовище окремих амінокислот не чинить стимулювального впливу на активність утворення біоплівки. Однак, додавання у середовище сечовини істотно активізує плівкоутворення *P. aeruginosa*.

Наявність у живильному середовищі сироватки крові тварин, яка містить широкий перелік різноманітних іонів, цукрів, азотвмісних сполук та протеїнів, створює оптимальні умови для утворення біоплівки *A. baumannii* та *P. aeruginosa*.

#### 4.2. Вплив температури та рН середовища на плівкоутворюючу активність *P. aeruginosa* та *A. baumannii*

Температурний оптимум росту і розмноження клінічних штамів *A. baumannii* і *P. aeruginosa* лежить у межах від 25°C до 37°C. Нами визначено інтенсивність плівкоутворення цими мікроорганізмами у процесі культивування в ТСБ протягом доби за наступних значень температури, а саме: 27°C, 32°C, 37°C, та 39°C. Інтервал між температурами визначення був обраний довільно з метою визначити температурний діапазон, за якого процес плівкоутворення буде найбільш активним. У дослідженні використали по 10 штамів кожного виду бактерій, показники інтенсивності плівкоутворення яких у триптон-соєвому бульйоні за  $t=37^{\circ}\text{C}$  дорівнювали середнім для дослідженої популяції у межах середньої похибки ( $0,22\pm 0,02$  для *P. aeruginosa*;  $0,13\pm 0,02$  для *A. baumannii*).

Вважається, що піку біологічної активності мікроорганізми, адаптовані до вегетації у організмі людини, досягають за температури, близької до 37°C. Однак, результати проведених нами досліджень, узагальнені в табл. 4.2, свідчать про те, що пік плівкоутворюючої активності у неферментуючих грамнегативних бактерій спостерігається за дещо нижчих значень температури середовища. Можна припустити, що процес плівкоутворення, як адаптивна реакція, в ацінетобактерій і псевдомонад активізується у неоптимальних для росту і розмноження умовах.

Таблиця 4.2

**Показники інтенсивності плівкоутворення за різних температур  
культивування**

Умови культивування(t°C)	Вид мікроорганізмів	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A.baumannii</i>
	Відносний показник оптичної густини	
27°C	0,255±0,021 <sup>1</sup>	0,130±0,016
32°C	0,231±0,024	0,152±0,018 <sup>1</sup>
37°C	0,225±0,022	0,134±0,017
39°C	0,177±0,018 <sup>1</sup>	0,118±0,014 <sup>1</sup>

Примітка: <sup>1</sup> – різниця достовірна (p<0,05) у порівнянні з ростом тієї ж культури за t 37°C.

Найвищий рівень інтенсивності плівкоутворення (0,255±0,021) *P. aeruginosa* виявляли за температури 27°C. У процесі збільшення температури на 5°C інтенсивність плівкоутворення псевдомонад зменшувалася майже на 10 %. Значення показника оптичної густини (0,231±0,024) при 32°C не мало статистично достовірних відмінностей від такого в умовах культивування за t 37°C.

*A. baumannii* виявляли максимальну плівкоутворювальну активність теж за температур, менших за 37°C, однак вищих, ніж для *P. aeruginosa*. За температури

27°C показник оптичної густини утворених ацінетобактеріями плівок статистично достовірно не відрізнявся від такого при 37°C, хоча і був дещо нижчим. Найбільш інтенсивним процесом плівкоутворення у цього виду бактерій був за температури культивування 32°C.

У представників обох видів неферментуючих бактерій показники інтенсивності плівкоутворення істотно знижувалися під час підвищення температури культивування до 39°C. Це може бути пов'язане із падінням активності плівкоутворення у процесі підвищення температури, однак, не можна виключити і прискореного визрівання біоплівки і переходу її у фазу дисперсії.

Отже, процеси інтенсивного плівкоутворення у *P. aeruginosa* та *A. baumannii* виникають за температур нижчих за температуру тіла людини. Цей факт необхідно враховувати в процесі вивчення закономірностей біоплівкоутворення у неферментуючих грамнегативних бактерій.

Дослідження впливу рН середовища культивування на плівкоутворювальну активність неферментуючих бактерій проводили з використанням ізотонічного буферного розчину пептону з рН 7,0. Концентрацію водневих іонів у розчині змінювали шляхом поступового, під контролем рН-метрії, додавання у вихідний розчин 1 N розчинів NaOH чи H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Культивування проводили за t° 37°C, у дослідах використали по 10 штамів *P. aeruginosa* та *A. baumannii*. Одержані результати наведені у табл. 4.3.

Як видно з наведених у табл. 4.3 показників, ацінетобактерії і псевдомонади однаково реагують на окислення середовища культивування: коли значення рН середовища сягає 5,0, інтенсивність плівкоутворення у бактерій обох видів різко зменшується (показник оптичної густини у *P. aeruginosa* нижчий більше ніж у 2 рази у порівнянні з таким за рН=7,0, а у *A. baumannii* – більше ніж у 3 рази).

Реакція на залуження середовища у псевдомонад і ацінетобактерій була різною. Коли значення рН середовища культивування становило 8,0, у *A. baumannii* інтенсивність плівкоутворення статистично достовірно зростала. Коли ж значення рН показник інтенсивності плівкоутворення *P. aeruginosa* статистично достовірно зменшувався.

Таблиця 4.3

**Показники інтенсивності плівкоутворення за різних значень рН  
середовища культивування**

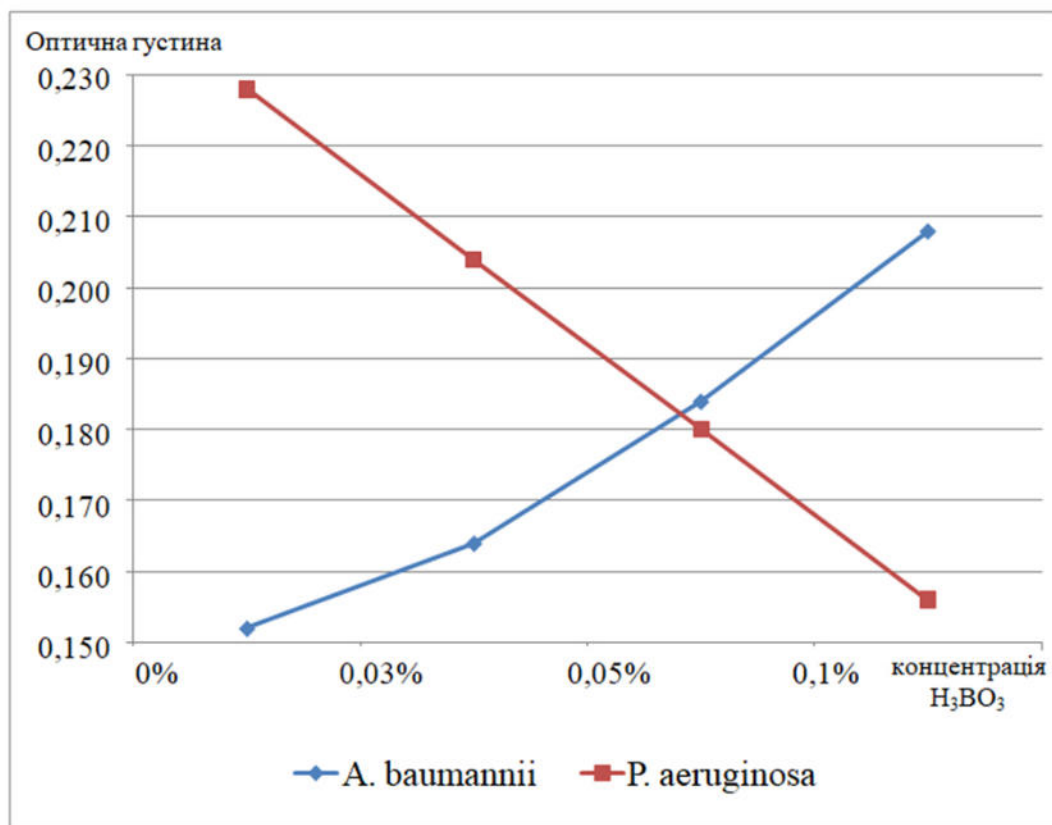
Умови культивування(рН)	Вид мікроорганізмів	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A.baumannii</i>
	Відносний показник оптичної густини	
5,0	0,112±0,014 <sup>1</sup>	0,044±0,015 <sup>1</sup>
7,0	0,230±0,021	0,154±0,018
8,0	0,188±0,018 <sup>1</sup>	0,187±0,022 <sup>1</sup>

Примітка: <sup>1</sup> – різниця достовірна ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ростом тієї ж культури за рН середовища 7,0.

Відомо, що опікові рани, вміст яких завжди має лужне середовище, найчастіше стійко колонізуються *A. baumannii* уже з перших днів виникнення, а синьо-гнійна інфекція приєднується пізніше, коли рН ранового вмісту наближається до нейтральних значень [101]. Вочевидь, що це явище можна пояснити саме високою активністю ацінетобактерій у лужному середовищі.

Існує практика лікування запальних процесів, спричинених синьо-гнійною інфекцією, розчинами борної кислоти. Цікаво було з'ясувати, чи пов'язана визнана лікарями-практиками ефективність цього методу із впливом рН середовища на активність неферментуючих бактерій. Нами досліджено інтенсивність плівкоутворення псевдомонадами і ацінетобактеріями в присутності у буферному розчині пептону борної кислоти у трьох концентраціях: 0,03 %, 0,05 %, 0,1 %. Визначення проведено на 5 штаммах кожного виду бактерій.

Вимірювання рН середовищ такого складу показало, що, будучи слабкою кислотою, борна кислота ( $H_3BO_3$ ) в означених концентраціях не змінює концентрації водневих іонів і рН середовища залишається нейтральною (7,0). Тим не менше, плівкоутворююча активність неферментуючих бактерій до того ж змінюється (рис. 4.1).



**Рис. 4.1.** Інтенсивність плівкоутворення *P. aeruginosa* та *A. baumannii* у середовищі в присутності різних концентрацій  $H_3BO_3$ .

Присутність борної кислоти у поживному середовищі стримувало утворення біоплівки *P. aeruginosa*. Показник інтенсивності плівкоутворення цього виду бактерій зменшувався більш ніж на 10 % в присутності 0,003 %  $H_3BO_3$ , у порівнянні з культивуванням у звичайній буферній пептонній воді. У максимальній з досліджених концентрацій борної кислоти інтенсивність плівкоутворення псевдомонад падала майже у 1,5 рази. Реакція ацетобактерій на введення у середовище борної кислоти була протилежною: чим вищою була концентрація борної кислоти, тим більшим був показник інтенсивності плівкоутворення.

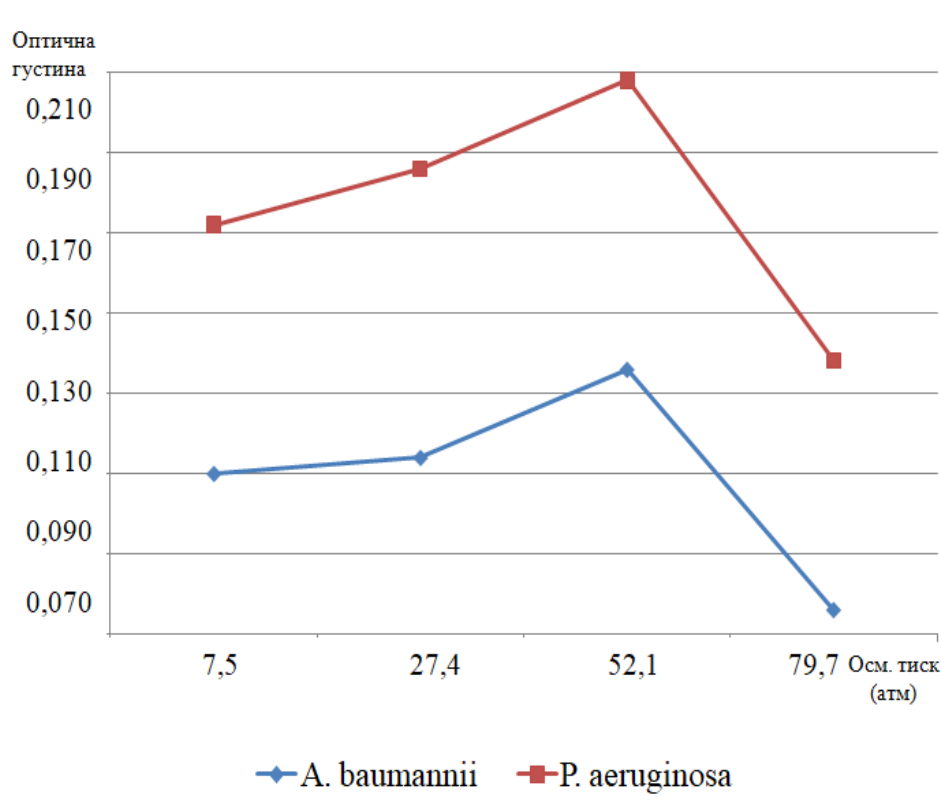
Отже, борна кислота стимулювала плівкоутворення ацетобактеріями і пригнічувала плівкоутворення псевдомонад. Одночасно механізм такого впливу препарату не пов'язаний зі зміною кислотно-лужного балансу середовища. Пригнічення борною кислотою у низьких концентраціях плівкоутворення

*P. aeruginosa* частиною механізму антисептичної дії препарату. Однак, ця дія є слабкою, оскільки у відношенні іншого виду неферментуючих бактерій не виявляється. Навпаки, борну кислоту можна використовувати для стимуляції плівкоутворення у *A. baumannii*.

4.3. Вплив осмотичного та зниженого атмосферного тиску на плівкоутворювальну активність *P. aeruginosa* та *A. baumannii*

Прокаріотичні мікроорганізми характеризуються толерантністю до змін атмосферного тиску. Однак, чутливість до впливу осмотичного тиску у представників таксономічного домену Bacteriaria відрізняється у широкому діапазоні. Вище нами показана здатність ацінетобактерій і псевдомонад до утворення біоплівки у ізотонічному розчині хлориду натрію. Щодо галотолерантності цих видів бактерій у доступній літературі інформації недостатньо. Цікаво було дослідити як підвищений осмотичний тиск змінює плівкоутворювальну активність *P. aeruginosa* та *A. baumannii*.

Інтенсивність плівкоутворення визначали після 24-годинного культивування за температури 37°C у 96-лункових планшетах у середовищі, єдиною поживною речовиною у якому була глюкоза в концентрації 1 %. Крім того, для створення осмотичного тиску у середовище додавали хлорид натрію у різних концентраціях (0,9 %, 3 %, 6 %, 9 %). Розрахунковий осмотичний тиск у таких середовищах становив відповідно 7,5 атм, 27,4 атм, 52,1 атм та 79,7 атм. Визначення проведено на 10 штаммах бактерій кожного виду, обраховані середні показники оптичної густини елюату. Одержані результати ілюструє рис. 4.2.



**Рис. 4.2.** Інтенсивність плівкоутворення *P. aeruginosa* та *A. baumannii* в умовах різного осмотичного тиску.

Підвищення осмотичного тиску до певної межі у обох видів супроводжувалося незначним зростанням інтенсивності плівкоутворення. Приріст показника інтенсивності плівкоутворення у присутності 3 % хлориду натрію у *P. aeruginosa* був на рівні 8 %, а у *A. baumannii* – 4 %, у порівнянні з таким в умовах ізотонічного розчину. У процесі зростання концентрації хлориду натрію до 6 % ( $P_{\text{осм}}=52,1$  атм) обидва види мікроорганізмів утворювали біоплівки найактивніше. Показники щільності біоплівок у них були на понад 20 % вищими, ніж у ізотонічному розчині. Однак, у 9 % розчині солі ( $P_{\text{осм}}=79,7$  атм) інтенсивність плівкоутворення різко падала і оптична густина елюату зменшувалася до значень істотно нижчих, ніж у ізотонічних умовах. Тобто, наростання осмотичного тиску, зумовлене підвищенням концентрації хлориду натрію у середовищі, викликало у неферментуючих бактерій захисну реакцію у вигляді підвищення інтенсивності плівкоутворення, і у присутності у середовищі 6 % солі цей процес був найінтенсивнішим. У 9 % розчині хлориду натрію, коли рівень осмотичного тиску

близький до 80 атм, спостерігали різке пригнічення активності біоплівкоутворення. Вочевидь, у подібних умовах ресурс захисних фізіологічних реакцій *P. aeruginosa* та *A. baumannii* вичерпується.

У сучасній лікувальній практиці знижений тиск використовують як чинник, що прискорює загоювання інфікованих ран (ВАК-терапія). Зниження тиску у рані є способом її механічного дренажу, що сприяє швидкому очищенню ранового ложа і, за даними окремих авторів, цей фактор здатен чинити руйнівну дію на вже утворені на рановій поверхні мікробні плівки [202]. Однак, інтенсивність плівкоутворення неферментуючими бактеріями в умовах зниженого тиску залишається малодослідженою.

Інтенсивність формування біоплівок оцінювали за показниками оптичної щільності після 24-годинного паралельного інкубування в ТСБ тих самих штамів за температури 37°C у 96-лункових планшетах в нормальних умовах та під впливом негативного тиску. Для створення негативного тиску планшет з внесеними культурами розміщували у герметичний контейнер, до якого приєднували апарат для вакуумної терапії ран Неасо-NP32S. За допомогою цього апарату в контейнері, в якому знаходився планшет, протягом всього періоду інкубації підтримували від'ємний тиск на рівні - 125 мм.рт.ст. Визначення було проведене на 10 штамів кожного виду бактерій, показники інтенсивності плівкоутворення яких в триптон-соевому бульйоні в звичайних умовах дорівнювали середнім для дослідженої популяції у межах середньої похибки ( $0,22 \pm 0,02$  для *P. aeruginosa*;  $0,13 \pm 0,02$  для *A. baumannii*). Одержані результати наведені у табл. 4.4.

Як свідчать показники, наведені у табл. 4.4, у обох видів бактерій біоплівки, що були утворені в умовах негативного тиску, мали більшу оптичну густину. Одночасно приріст оптичної густини біоплівок у *P. aeruginosa* становив близько 7 %, у порівнянні з біоплівками, утвореними у звичайних умовах *A. baumannii* на знижений тиск реагували більш вираженим посиленням інтенсивності плівкоутворення, оскільки приріст показника оптичної густини становив понад 13 %.



**Показники інтенсивності плівкоутворення в умовах нормального атмосферного та зниженого тиску**

Умови культивування (атмосферний тиск, мм.рт.ст.)	Вид мікроорганізмів	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A.baumannii</i>
	Відносний показник оптичної густини	
760	0,226±0,016	0,132±0,021
-125	0,241±0,026 <sup>1</sup>	0,150±0,0221 <sup>1</sup>

Примітка: <sup>1</sup> – різниця достовірна ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ростом того ж виду бактерій за нормального атмосферного тиску

Отже, активізація утворення біоплівки, як захисна реакція на зовнішні подразники, спостерігається у неферментуючих бактерій і в умовах негативного тиску в оточуючому середовищі. Існування цього явища необхідно враховувати у інжинірингу вентиляційних систем та систем водопостачання. Не заперечуючи лікувальної ефективності ВАК-терапії, слід враховувати в процесі її використання високу вірогідність утворення на поверхні ран сесільних форм бактерій, що характеризуються високим рівнем стійкості до протимікробних засобів і сприяють хронізації запального процесу.

Узагальнюючи результати досліджень, наведені у цьому розділі, слід відзначити високу адаптивну здатність неферментуючих бактерій *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, яка виявляється у здатності утворювати біоплівку в умовах відсутності у оточуючому середовищі джерел енергії і пластичного матеріалу. До того ж, процес плівкотворення у *P. aeruginosa* є більш залежним від іонного складу середовища і наявності у ньому поживних речовин, ніж у *A. baumannii*. Наявність у середовищі глюкози, мальтози, галактози чи сечовини посилює інтенсивність плівкоутворення псевдомонадами і не впливає на плівкоутворення *A. baumannii*.

Процеси плівкоутворення у *P. aeruginosa* та *A. baumannii* інтенсивно перебігають за температур, нижчих за температури тіла людини (27°C та 32°C відповідно). Підвищення температури оточуючого середовища до 39°C пригнічує

активність плівкоутворення в обох видів мікроорганізмів.

Сприятливими для плівкоутворення *P. aeruginosa* є нейтральні значення рН оточуючого середовища. Окислення середовища інгібує активність плівкоутворення мікроорганізмами обох видів. У слаболужному середовищі активність плівкоутворення *A. baumannii* зростає, а у *P. aeruginosa* – падає. Борна кислота, яка є слабкою кислотою і у низьких концентраціях не змінює рН середовища, пригнічує плівкоутворення у псевдомонад і стимулює плівкоутворення ацетобактеріями.

Підвищення осмотичного тиску до певної межі (52,1 атм ) у оточуючому середовищі неферментуючих бактерій досліджених видів середовищі стимулює процеси утворення біоплівки. Подальше зростання осмотичного тиску веде до зменшення ними інтенсивності плівкоутворення. Негативний тиск оточуючого середовища сприяє посиленню процесів плівкоутворення *P. aeruginosa* та *A. baumannii*.

## РОЗДІЛ 5

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ АНТИБІОТИКІВ НА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АЦІНЕТОБАКТЕРІЙ І ПСЕВДОМОНАД

Однією з найнебезпечніших, з медичної точки зору, біологічних властивостей псевдомонад і ацінетобактерій є високий рівень природної та набутої резистентності до антибіотиків. Наявність стійкості до багатьох антибіотиків виявляється навіть у «диких» штамів цих бактерій, виділених з середовища, незабрудненого продуктами діяльності людини. У середовищі в присутності антибіотиків представники цих родів здатні швидко змінювати метаболізм і окремі біологічні характеристики та ухилятися від згубних впливів.

Нами вище показано, що переважна більшість штамів ацінетобактерій та псевдомонад, які циркулюють у лікарняних установах, характеризуються фенотиповою множинною стійкістю до широкого переліку антибіотиків і є носіями різноманітних генетичних детермінант цієї властивості. Більшість штамів у ДДМ не виявляли чутливості до антибіотиків, а за кількісного визначення зберігали життєздатність у процесі культивування у поживному середовищі з вмістом понад 1000 мкг/мл антибіотика. Такі прояви стійкості до меропенему мали, наприклад, штами *P. aeruginosa* – носії генів метало- $\beta$ -лактамаз *blaVIM-2* чи *blaNDM-1*, а також *A. baumannii* – носії гену  $\beta$ -лактамази розширеного спектру *blaCTX-M115*. Окремі з досліджених штамів, особливо носії генів  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру дії оксацилінового типу класу D, підчас визначення чутливості до меропенему за допомогою ДДМ мали граничні, за стандартами EUCAST, значення діаметрів зон пригнічення і могли бути приналежними до помірно стійких варіантів. Викликає інтерес з'ясувати з якою швидкістю відбувається експресія цих детермінант стійкості, що фенотипово не проявлені повною мірою. З цією метою нами була визначена швидкість зростання ступіню стійкості псевдомонад і ацінетобактерій з різними генетичними характеристиками до окремих антибіотиків у процесі культивування у середовищі із зростаючими концентраціями препарату.

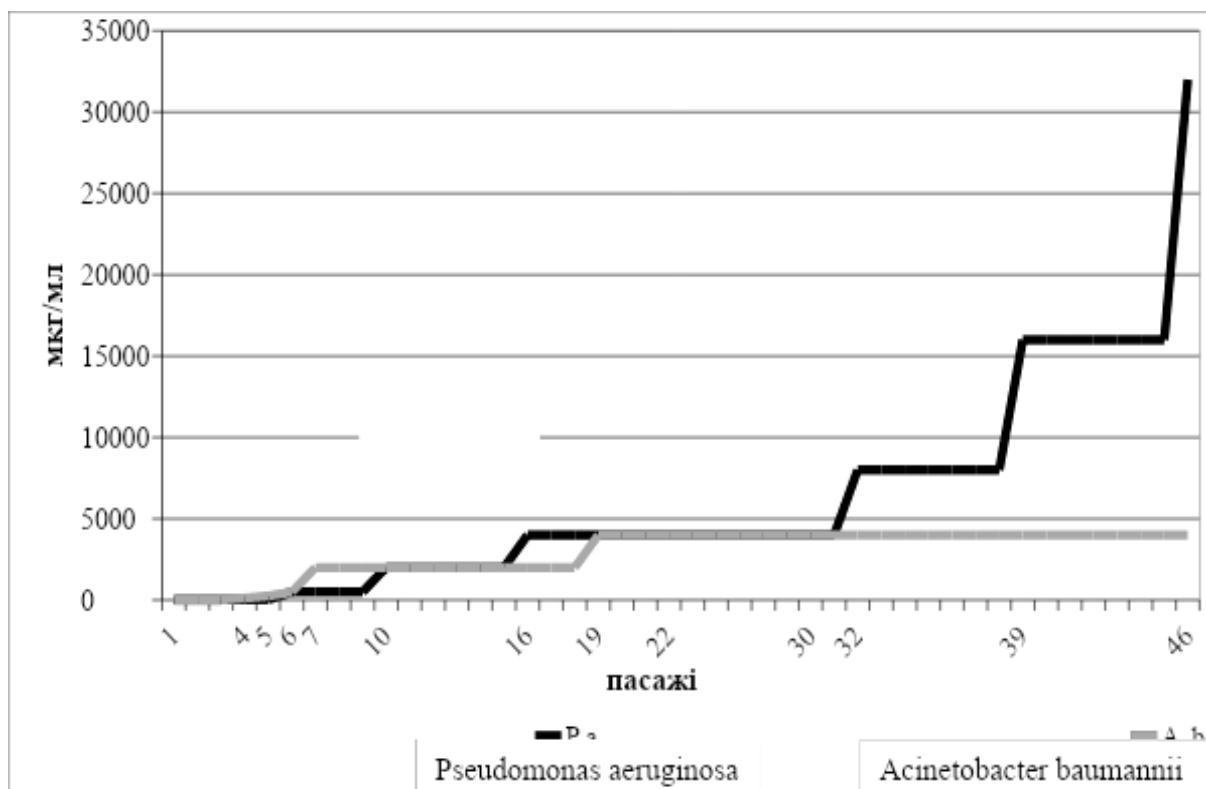
### 5.1. Швидкість формування стійкості до антибіотиків псевдомонадами і ацінетобактеріями в штучних умовах

У дослідженні швидкості формування стійкості до меропенему псевдомонад у штучних умовах використали 3 штами *P. aeruginosa*, які були носіями гена серинових  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру дії класу D *blaOXA-50* і виявляли помірну чутливість до меропенему підчас тестування ДДМ. Кількісне визначення початкового рівня чутливості до меропенему методом серійних розведень показало, що МБсК препарату для цих штамів дорівнювала 7,8 мкг/мл, а МБцК – 31,25 мкг/мл. Швидкість адаптації мікроорганізмів до середовища з меропенемом визначали за кількістю пасажів у наростаючих концентраціях антибіотика, необхідних для досягнення максимального значення МБцК препарату.

За такою ж схемою було проведено дослідження з 3 штамами *A. baumannii*, у геномі яких містилися детермінанти  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру дії *blaOXA-72*. Ці штами за даними ДДМ також були помірно чутливими до меропенему і мали однакові з псевдомонадами показники МБсК та МБцК антибіотика.

Криві швидкості формування стійкості до меропенему, зображені на рис. 5.1, свідчать про те, що зміни ступеню стійкості псевдомонад і ацінетобактерій до антибіотика в процесі культивування у його збільшених концентраціях відбувалися стрибкоподібно. Так у досліджених штамів псевдомонад до четвертого пасажу показник МБцК антибіотика тримався на вихідному рівні, і на 4 пасажі – зріс у 4 рази і на рівні 125 мкг/мл тримався до 10 пасажу, після чого знову зріс до 500 мкг/мл. Після низки подібних стрибкоподібних змін культури на 46-му пасажі набули здатності зберігати фізіологічну активність в присутності 32000 мкг/мл меропенему. Подальше пасажування не призвело до зростання МБцК меропенему. Отож, субстратна індукція генетично детермінованої здатності до продукції  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру дії досліджених штамів псевдомонад збільшила стійкість мікробної популяції до антибіотика карбапенемового ряду більше ніж у

1000 разів.



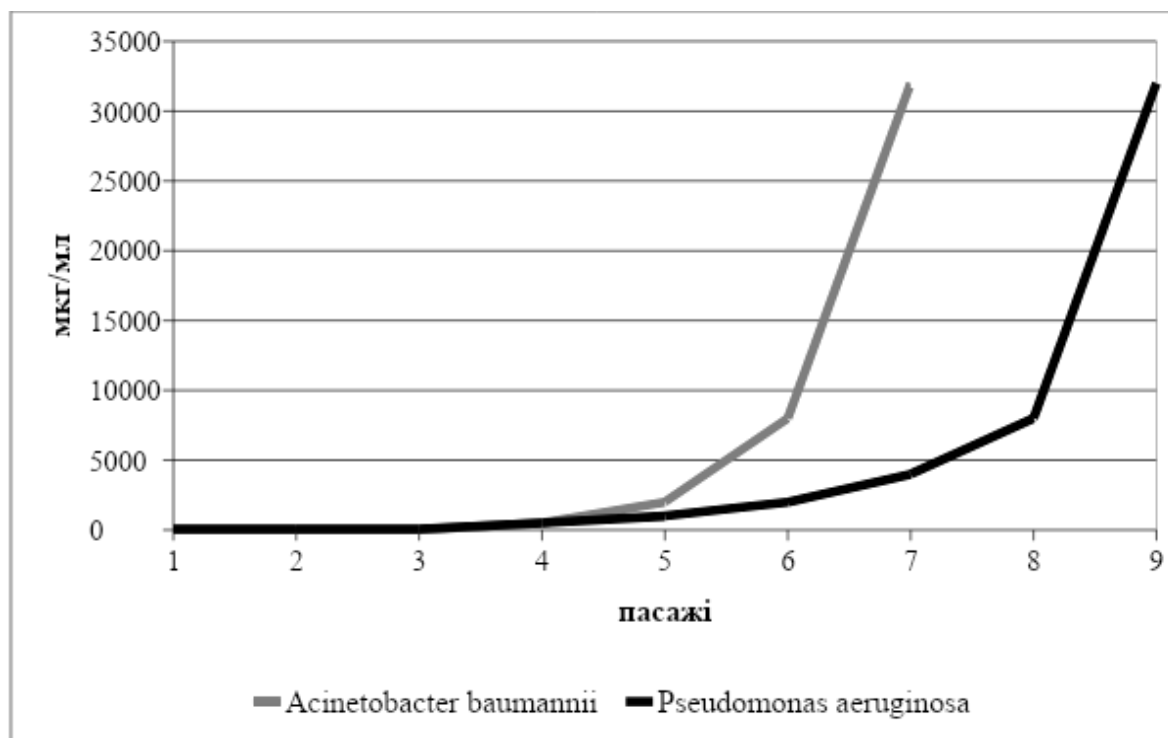
**Рис. 5.1.** Швидкість зростання стійкості ацінетобактерій і псевдомонад до меропенему в процесі пасажування у середовищі із збільшеними концентраціями антибіотика.

У досліджених штамів *A. baumannii* адаптація до високих концентрацій меропенему відбувалась повільніше, ніж у *P. aeruginosa*, і показник МБцК не досягав таких високих значень. Бактерицидний ефект спостерігали при концентрації антибіотика 31,25 мкг/мл протягом 5 пасажів. На 6 пасажі спостерігали стрибок показника МБцК до 500 мкг/мл і на такому рівні він зберігався до 19-го пасажу, коли показник знову зріс у 8 разів. На рівні 4000 мкг/мл бактерицидна концентрація меропенему для *A. baumannii* зберігалася до 46-го пасажу. Подальшого пасажування не проводили.

Отже, у штамів *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, що мають гени, відповідальні за синтез карбапенемаз серинового типу, і фенотипово не виявляють високої стійкості до меропенему, в присутності у середовищі субстрату синтез руйнівного для антибіотика ферменту здатен ступінчасто посилюватися.

У процесі лікування інфекційних захворювань, зумовлених

неферментуючими бактеріями, широко застосовуються антибіотики аміноглікозидного ряду. Нами проведено дослідження швидкості формування стійкості псевдомонад і ацінетобактерій підчас пасажування в середовищі із концентраціями амікацину, що зростають. Одержані результати ілюструє рис. 5.2.



**Рис. 5.2.** Швидкість зростання стійкості ацінетобактерій і псевдомонад до амікацину в процесі пасажування у середовищі з концентраціями антибіотика, що зростають

У дослідженні також використовували ті штами неферментуючих бактерій, які за результатами дослідження ДДМ можна було віднести до помірно чутливих. Серед таких штамів *A. baumannii* був виявлений один, у якого у процесі повного секвенування геному не було виявлено жодного гену, відповідального за синтез руйнівних для аміноглікозидних антибіотиків ферментів. Два штами виявилися носіями гену аміноглікозид-фосфаттрансферази типу *aph(3')-Ic*, дія якої поширюється на канаміцин і не стосується амікацину. Мінімальна бактерицидна концентрація амікацину для використаних штамів ацінетобактерій на початку дослідження становила 31,25 мкг/мл.

З-поміж взятих у дослідження штамів *P. aeruginosa* один був носієм досить

широкого переліку детермінант резистентності до аміноглікозидних антибіотиків, серед яких аміноглікозид-аденилтрансферази типів *aad A1*, *aad B* та аміноглікозид-фосфаттрансферази типів *aph(3')IIIb*, *aph(6)-Id*, які не трансформують молекул амікацину. Крім того, у цього штаму був присутній ген аміноглікозид-фосфаттрансферази *aph(3')VIa*, яка інактивує амікацин. Два інших штами псевдомонад були носіями гену аміноглікозид-фосфаттрансферази *aph(3')-IIIb*, дія якої на амікацин не поширюється. Мінімальна бактерицидна концентрація амікацину для трьох описаних штамів псевдомонад на початку дослідження дорівнювала 62,5 мкг/мл.

Як свідчать криві, зображені на рис. 5.2, формування стійкості до амікацину у неферментуючих бактерій у штучних умовах відбувається значно швидше, ніж до меропенему. Впродовж перших трьох пасажів бактерицидний ефект амікацину на досліджені штами *P. aeruginosa* досягався при концентрації препарату 62,5 мкг/мл у середовищі. Починаючи з 4 пасажу МБЦК препарату з кожним пасажем зростала у 2-4 рази і на 9 пасажі досягла 32000 мкг/мл. Подібного рівня стійкості псевдомонад до меропенему було досягнуто лише після 46-ти пасажів.

У досліджених штамів *A. baumannii* процес адаптації до високих концентрацій амікацину був ще коротшим, адже показника МБЦК у 32000 мкг/мл було досягнуто уже на VII пасажі. Такий рівень стійкості ацетобактерій до меропенему був недосяжним, адже МБЦК на рівні 4000 мкг/мл зберігалася понад 40 пасажів.

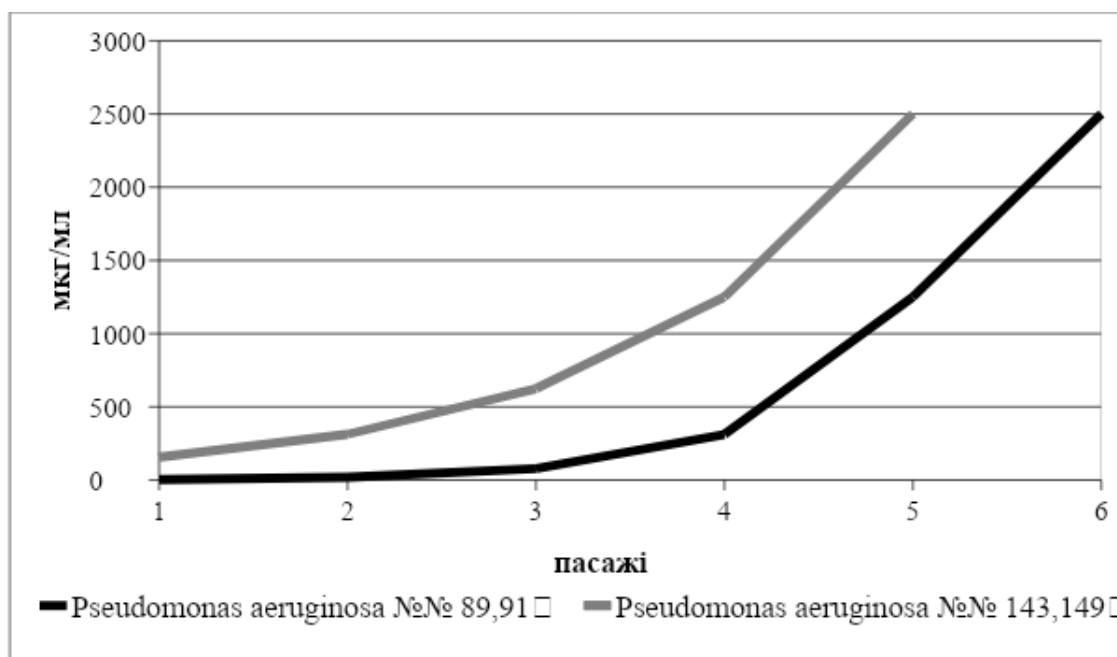
Слід підкреслити, що процес зростання стійкості до амікацину для штамів одного виду з різними генетичними детермінантами стійкості до аміноглікозидів був синхронним і не відрізнявся за швидкістю. Стійкість взятих у дослідження штамів *A. baumannii*, які не мали генів продукції руйнівних для амікацину ферментів, зростала не менш стрімко, ніж у псевдомонад, у яких могли бути експресувались наявні гени. Вочевидь, що у процесі адаптації досліджених видів неферментуючих бактерій до впливу аміноглікозидних антибіотиків беруть участь додаткові механізми, не пов'язані з продукцією ферментів, які трансформують молекули аміноглікозидів.

Для боротьби з інфекціями, спричинених неферментуючими бактеріями, у сучасній медичній практиці, крім антибіотиків карбапенемової і аміноглікозидної груп, часто застосовують фторхінолони. Серед виділених і досліджених нами штамів *A. baumannii* чутливих чи помірно чутливих варіантів до препаратів фторхінолонового ряду не було. Ще одне обмеження у дослідженні швидкості формування стійкості неферментуючих бактерій до фторхінолонів полягало у тому, що доступними для нас були лише готові рідкі лікарські форми левофлоксацину, наявні в аптечній мережі, що представлені 0,5 % розчином. Це не дозволяло створити в експерименті концентрації препарату, вищої за 2500 мкг/мл.

У дослідженні нами було використано два штами *P. aeruginosa* (№№ 89, 91), які не мали у складі геному детермінант стійкості до фторхінолонових сполук і за результатами досліджень ДДМ виявляли чутливість до левофлоксацину. Кількісне визначення показало, що МБцК левофлоксацину для них становить 2,4 мкг/мл. Для порівняння у дослідження було взято ще два штами *P. aeruginosa* (№№ 143, 149), які мали у складі геному детермінанту стійкості до фторхінолонів, а саме ген *qnrVC1*, відповідальний за синтез захисного для гіраз і топоізомераз білка. На ці варіанти псевдомонад на початку експерименту левофлоксацин бактерицидно діяв у концентрації 156,3 мкг/мл.

Результати дослідження швидкості зростання стійкості до левофлоксацину обох варіантів псевдомонад відображені на рис. 5.3. Процес адаптації псевдомонад до високих концентрацій левофлоксацину відбувався навіть швидше, ніж до таких амікацину. Для штамів *P. aeruginosa* №№ 143, 149, які мали генетично детермінований специфічний механізм протидії фторхінолонам, МБцК з кожним пасажем зростала удвічі і на 5 пасажі досягла максимального значення. У штамів, які не мали генетичних детермінант резистентності до фторхінолонів і були чутливими до левофлоксацину, показник МБцК левофлоксацину з кожним пасажем зростав у 4-8 разів і вони швидко наздоганяли за рівнем стійкості первинно-резистентні штами. Для досягнення максимально можливого показника їм знадобилось лише на один пасаж більше.





**Рис. 5.3.** Швидкість зростання стійкості *P. aeruginosa* до левофлоксацину в процесі пасажування у середовищі зі збільшуваними концентраціями антибіотика

Як і у дослідях з амікацином, швидкість формування резистентності до левофлоксацину в штучних умовах у штамів псевдомонад з різними генетичними характеристиками була однаково високою. Якщо припустити, що у варіантів бактерій, які не мають генетично зумовлених специфічних механізмів стійкості до фторхінолонів, формування резистентності забезпечується точковими мутаціями, і амінокислотними замінами у структурі ДНК-гірази і топоізомерази, то потрібно визнати, що частота таких мутації в присутності у середовищі антибіотика є надзвичайно великою.

Отже, проведені дослідження показали, що у процесі пасажування *P. aeruginosa* і *A. baumannii* у поживних середовищах з концентраціями антибіотиків, що зростають, швидко відбувається адаптація до впливу високих концентрацій препаратів аміноглікозидного та фторхінолонового рядів. До антибіотика карбапенемового ряду меропенему стійкість наростала ступінчасто і потребувало значно більшої кількості пасажів. До того ж, *P. aeruginosa* досягають значно вищих показників стійкості до меропенему, ніж *A. baumannii*.

## 5.2. Характеристика змін біологічних властивостей *A. baumannii* та *P. aeruginosa* після штучного формування стійкості до антибіотиків

Адаптація до існування у несприятливому для життєдіяльності середовищі потребує від клітин будь-якого рівня організації мобілізації фізіологічних резервів і може супроводжуватись зміною різних біологічних характеристик. Антибіотики здатні як активувати, так і пригнічувати ферментні системи мікроорганізмів, викликати зміни ультраструктури бактеріальних клітин на молекулярному і генетичному рівнях. Формування стійкості до одних антибіотиків може супроводжуватися перехресним зростанням стійкості до антибіотиків інших груп.

Нами проведений аналіз чутливості до антибіотиків різних груп, визначеної ДДМ, штамів *A. baumannii* та *P. aeruginosa*, які були штучно адаптовані до середовища з високими концентраціями меропенему, у порівнянні з чутливістю тих самих штамів до процесу штучної адаптації. У табл. 5.1. наведені дані щодо тих антибіотиків, до яких стійкість після адаптації змінилася.

Кількість проведених спостережень недостатня для формування статистично достовірних висновків. Тим не менше, навіть на невеликій кількості адаптованих до меропенему штамів прослідковуються досить виразні тенденції щодо змін чутливості неферментуючих бактерій до антибіотиків різних груп, які супроводжують зростання рівня стійкості до меропенему. Цілком очікувано паралельно зростанню стійкості до меропенему у всіх досліджених штамів неферментуючих бактерій зросла стійкість до іншого антибіотика карбапенемової групи – іміпенему. Штами *A. baumannii*, які виявляли помірну чутливість до цефтриаксону, після штучного формування стійкості до меропенему перейшли до категорії «резистентних» до цього антибіотика.

Серинові  $\beta$ -лактамази молекулярного класу D, носіями генетичних детермінант синтезу яких були всі використані в цьому дослідженні штами неферментуючих бактерій, є варіабельними щодо чутливості до впливу інгібіторів  $\beta$ -лактамаз. До того ж, усі використані штами ацінетобактерій і псевдомонад виявляли помірну чутливість до захищеного сульбактамом цефоперазону, а два з

трьох досліджених штамів ацінетобактерій були помірно чутливими до захищеного сульбактамом ампіциліну. Після формування стійкості до меропенему всі штами набули резистентності до цих комбінацій. Можна зробити висновок, що субстратна експресія наявних генетичних детермінант синтезу  $\beta$ -лактамаз і гіперпродукція останніх нівелює дію їхніх інгібіторів.

Таблиця 5.1

**Характеристика чутливості *A. baumannii* та *P. aeruginosa* до антибіотиків після формування резистентності до меропенему**

Антибіотик	Вид мікроорганізмів, № штаму											
	<i>A. baumannii</i>						<i>P. aeruginosa</i>					
	1	1A*	85	85A	28	28A	20	20A	68	68A	96	96A
Ампіцилін/ сульбактам	пмч	р	пмч	р	р	р	р	р	р	р	р	р
Цефтриаксон	пмч	р	пмч	р	р	р	р	р	р	р	р	р
Цефоперазон/ сульбактам	пмч	р	пмч	р	пмч	р	пмч	р	пмч	р	пмч	р
Іміпенем	ч	р	пмч	р	пмч	р	пмч	р	пмч	р	пмч	р
Амікацин	пмч	р	ч	р	р	р	р	р	пмч	р	пмч	р
Моксифлокса- цин	р	пмч	р	пмч	р	пмч	р	пмч	р	р	р	ч
Рифампіцин	пмч	ч	пмч	ч	пмч	ч	пмч	ч	р	р	р	ч
Поліміксин	пмч	ч	пмч	ч	ч	ч	пмч	ч	ч	ч	ч	ч

Примітки: \*- А - варіант штаму після штучної адаптації до меропенему; «ч» - чутливий; «пмч» - помірно чутливий; «р» - резистентний

Паралельно зростанню рівня стійкості до меропенему відбулися зміни чутливості у досліджених штамів щодо антибіотика аміноглікозидного ряду амікацину. По два штами кожного виду неферментуючих бактрій, які були чутливими або помірно чутливими до амікацину, перейшли у категорію резистентних.

Водночас, була помітною тенденція підвищення чутливості досліджених штамів до окремих антибіотиків у процесі формування стійкості до меропенему. Так, у ацінетобактерій і окремих штамів псевдомонад зросла чутливість до

препарату фторхінолонової групи моксифлоксацину. У тих же штамів підвищився рівень чутливості до рифампіцину. Враховуючи те, що обидва препарати впливають на генетичний апарат мікробних клітин, можна припустити, що високі концентрації меропенему не зчинили згубного впливу на клітини стійких бактерій, однак все ж вплинули на проникність оболонок і тим самим збільшили доступність генних мішеней для дії тропних до генетичного апарату молекул. Це припущення підтверджується тим, що у штамів, які були помірно чутливими до поліміксину, рівень чутливості до цього препарату зріс. Адже поліміксин за механізмом дії є мембранотропною сполукою і спостережуваний ефект можна пояснити сумациєю пошкоджувальної дії.

Штучне формування стійкості до амікацину в досліджених штамів *A. baumannii* супроводжувалося зростанням стійкості до тобраміцину та до  $\beta$ -лактамних антибіотиків. Штами, які до початку пасажування були помірно чутливими або чутливими до цефтриаксону, захищеного цефоперазону і ампіциліну, меропенему перейшли у категорію стійких до цих антибіотиків.

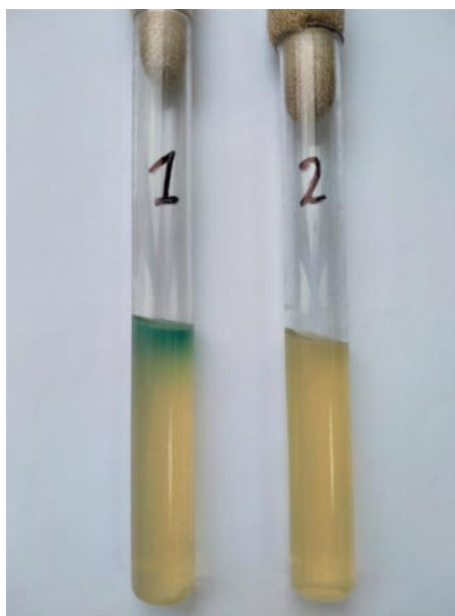
У адаптованих до високих концентрацій левофлоксацину штамів обох видів бактерій паралельних змін чутливості до антибіотиків інших груп не спостерігалося. Проте у всіх досліджених випадках було відзначено зростання стійкості до інших фторхінолонів (ципрофлоксацину, моксифлоксацину).

Крім змін чутливості до антибіотиків різної хімічної структури, у штамів *A. baumannii* зі штучно сформованою стійкістю до меропенему спостерігали тенденцію до зниження ферментативної активності. Усі використані у дослідженні штами цього виду бактерій до початку експерименту були «позитивними» за ознакою здатності утилізувати цитрат на середовищі Симмонса. Варіанти тих же штамів, які внаслідок штучної адаптації зберігали фізіологічну активність у присутності 4000 мкг/мл меропенему, втратили цю здатність. Крім того, штами цього виду, які до пасажування у середовищі зі збільшуваними концентраціями меропенему мали здатність розщиплювати малонат і целобіозу, після завершення формування резистентності стали негативними за цими ознаками. У адаптованих до високих концентрацій антибіотиків штамів *P. aeruginosa* змін ферментативної

активності у проведеному дослідженні не спостерігали.

Видовою біологічною ознакою *P. aeruginosa* є здатність до продукції водорозчинного пігменту піоціаніну, який у процесі культивування забарвлює поживні середовища у характерний синьо-зелений колір. Інтенсивність пігментоутворення псевдомонадами залежить від багатьох чинників, а також парціального тиску кисню, вмісту сполук азоту та неорганічного фосфору у середовищі, присутності речовин з бактеріостатичною дією, тощо. Відомо, наприклад, що в присутності у середовищі еритроміцину чи хлорамфеніколу інтенсивність пігментоутворення зменшується. Близько 15 % штамів *P. aeruginosa* взагалі не мають здатності до пігментоутворення [203].

Всі використані у дослідженнях зі штучного формування стійкості до антибіотиків штами псевдомонад до початку експерименту продукували характерний синьо-зелений пігмент. У адаптованих до середовищ з високими концентраціями антибіотиків варіантів *P. aeruginosa* у більшості випадків ця властивість змінювалася (рис. 5.4).



**Рис. 5.4.** Ріст штаму *P. Aeruginosa* №89 на напіврідкому МПА (1 - ріст до початку адаптації до антибіотика; 2 - ріст того ж штаму, адаптованого до левофлоксацину).

Оцінку інтенсивності пігментоутворення у досліджених штамів псевдомонад проводили візуально за характером змін кольору поживного середовища у процесі висіву у високому стопчику напіврідкого МПА після 72 год. інкубації. Результати візуальної оцінки здатності до пігментоутворення досліджених штамів псевдомонад до початку експерименту і після завершення адаптації до високих концентрацій антибіотика узагальнені у табл. 5.2.

Таблиця 5.2

**Інтенсивність пігментоутворення штамами *P. aeruginosa*, адаптованих до середовищ з високими концентраціями антибіотиків**

Штам	До початку експерименту	Адаптований до меропенему (32000 мкг/мл)	Адаптований до амікацину (32000 мкг/мл)	Адаптований до левофлоксацину (2500 мкг/мл)
<i>P. aeruginosa</i> № 89	++	-	++	-
<i>P. aeruginosa</i> № 91	++	+	+++	-
<i>P. aeruginosa</i> № 96	++	+	+++	-

Примітка: - відсутність забарвлення поживного середовища; + забарвлення середовища у салатово-зеленуватий колір на глибину 0,5 см; ++ забарвлення середовища у зелений колір на глибину 1-1,5 см; +++ забарвлення середовища у зелено-синій колір на глибину 2-3 см.

Очевидне і найбільш виражене зниження інтенсивності пігментоутворення спостерігали після пасажування досліджених штамів у середовищах із збільшуваними концентраціями левофлоксацину. Усі спостережені штами псевдомонад повністю втрачали здатність продукувати синьо-зелений пігмент. Продукція пігменту була пригніченою і у штамів, штучно адаптованих до меропенему. Водночас, у двох із трьох досліджених штамів псевдомонад, що

пройшли тривале пасажування у середовищах з антибіотиком аміноглікозидного ряду амікацином, спостерігали посилення інтенсивності пігментоутворення. Слід зазначити, що зміни інтенсивності пігментоутворення були стійкими, оскільки властивість не відновлювалася до першопочаткового рівня після 5-кратного пересіву досліджених штамів у рідкому поживному середовищі (МПБ) без антибіотиків.

Утворення біоплівки є одним з найефективніших способів виживання неферментуючих бактерій в умовах несприятливих впливів мікрооточення, а саме антибіотиків. Відомо, що у плівках ці мікроорганізми виявляють значно нижчий рівень чутливості до антибіотиків, ніж їхні планктонні форми. Цікаво було з'ясувати чи змінилася плівкоутворювальна здатність досліджених штамів неферментуючих бактерій після тривалого пасажування у середовищах з наростаючими концентраціями антибіотиків. Нами було визначено плівкоутворювальну активність штамів, штучно адаптованих до антибіотиків, в ТСБ без антибіотиків і порівняно з показниками тих самих штамів, що не пройшли процедури штучної адаптації. Результати порівняння ілюструє табл. 5.3.

У таблиці наведені середні показники оптичної щільності елюату плівок трьох штамів кожного біологічного виду, визначених у трьох повторностях для кожного. Аналіз наведених даних свідчить, що варіанти культур *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, адаптовані до середовищ з високими концентраціями меропенему, в умовах відсутності у середовищі антибіотика, статистично достовірних змін плівкоутворювальної активності, у порівнянні з неадапованими варіантами, не виявляли. У варіантів обох біологічних видів, адаптованих до амікацину і левофлоксацину, плівкоутворювальна активність статистично достовірно зросла, у порівнянні з неадапованими до антибіотиків варіантами, навіть у безантибіотиковому середовищі.

Таблиця 5.3

**Плівкоутворювальна активність неферментуючих бактерій, штучно адаптованих до високих концентрацій антибіотиків**

Варіант бактерій	Вид мікроорганізмів	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
	Відносний показник оптичної густини	
Неадаптований до антибіотиків	0,235±0,111	0,142±0,024
Адаптований до МП	0,222±0,114	0,136±0,028
Адаптований до АМ	0,298±0,105 <sup>1</sup>	0,216±0,061 <sup>1</sup>
Адаптований до ЛВ	0,279±0,109 <sup>1</sup>	0,187±0,035 <sup>1</sup>

Примітка: МП – меропенем; АМ – амікацин; ЛВ – левофлоксацин; <sup>1</sup> – різниця достовірна ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з неадаптованими культурами.

Узагальнюючи результати досліджень, викладені у цього розділі слід відзначити такі ключові положення.

Клінічні штами *P. aeruginosa*, що мають генетичні детермінанти синтезу  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру дії, але фенотипово не виявляють високого рівня стійкості до карбапенемів, підчас потрапляння у середовище, у якому присутній меропенем, здатні швидко адаптуватися до впливу високих концентрацій цього антибіотика шляхом субстратної індукції синтезу великої кількості руйнівних ферментів. До того ж, рівень стійкості зростає у 1024 рази і сягає надзвичайно високих значень: препарат зберігає згубний вплив на адаптовані варіанти бактерій лише у концентрації понад 30 000мкг/мл (3 % розчин).

Штами *A. baumannii* зі схожими генетичними і фенотиповими характеристиками також здатні істотно нарощувати рівень стійкості у присутності в середовищі меропенему (за нашими спостереженнями у 128 разів). Однак, процес адаптації ацінетобактерій, у порівнянні з псевдомонадами, відбувається значно повільніше і не сягає такого високого рівня.

Формування стійкості неферментуючих бактерій до антибіотика аміноглікозидного ряду амікацину відбувається значно швидше ніж формування



стійкості до меропенему. Адаптація до високих концентрацій амікацину відбувається однаково швидко, як у тих штамів *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, що мають генетичні детермінанти стійкості до аміноглікозидів, так і у тих, у яких подібні детермінанти відсутні.

Не менш швидко, ніж до амікацину, у *P. aeruginosa* може зростати резистентність до антибіотика фторхінолонового ряду левофлоксацину. Дотого ж, генетичні характеристики також не відіграють вирішального значення, оскільки штами, що не мають відомих генетичних елементів, відповідальних за стійкість до фторхінолонів, швидко адаптуються до високих концентрацій левофлоксацину.

Формування стійкості до меропенему у клінічних штамів *P. aeruginosa* може супроводжуватися зростанням стійкості до захищених цефалоспоринових антибіотиків і амікацину. В процесі формування стійкості *A. baumannii* до амікацину паралельно може зростати стійкість до антибіотиків аміноглікозидного ряду та до усіх  $\beta$ -лактамних антибіотиків.

Формування стійкості неферментуючих бактерій до меропенему може супроводжуватися зміною окремих фенотипових біологічних характеристик. Так, ацінетобактерії можуть втрачати окремі характерні ознаки ферментативної активності, а псевдомонади – здатність до пігментоутворення. Подібні можливі зміни необхідно враховувати у процесі ідентифікації виділених клінічних штамів неферментуючих бактерій підчас лабораторної діагностики.

Варіанти клінічних штамів ацінетобактерій і псевдомонад, адаптовані до високих концентрацій амікацину і левофлоксацину, виявляють підвищену плівкоутворювальну активність і, як наслідок, можуть мати пріоритетне становище у колонізації твердих поверхонь, у порівнянні з штамами, неадаптованими до цих антибіотиків.

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

До групи НФГНБ на сьогодні зараховуються понад 30 біологічних видів, які належать до родів *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Flavibacterium*, *Myroides*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Kingella*, *Eikenella* та ін. Представники цієї групи бактерій домінують у багатьох екологічних нішах, демонструючи приголомшливі пристосувальні можливості. Останні десятиріччя ознаменувалися збільшенням кількості захворювань, спричинених представниками родів *Pseudomonas* та *Acinetobacter*, питома вага яких у етіологічній структурі захворювань людей бактеріальної природи різко зросла. Тому, враховуючи тенденцію до поширення панрезистентних до антибіотиків штамів цих мікроорганізмів, Всесвітня організація охорони здоров'я зарахувала *P. aeruginosa* та *A.baumannii* до групи «пріоритетних патогенів», які несуть найбільшу загрозу для здоров'я людини. Дослідження впливу різноманітних чинників на біологічну активність найбільш актуальних для медичної практики представників цієї групи мікроорганізмів допоможе розробити стратегію стримування їхнього негативного впливу на життєдіяльність людини.

Дисертаційне дослідження виконано відповідно до плану науково-дослідної роботи «Дослідження біологічних властивостей мікроорганізмів, віднесених Всесвітньою організацією охорони здоров'я до списку «провідних патогенів», що несуть найбільшу загрозу для здоров'я людини, та розробка засобів боротьби з ними» (Державний реєстраційний номер 0117U006903) кафедри мікробіології, імунології та вірусології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. Тему дисертаційної роботи «Характеристика впливу чинників оточуючого середовища на біологічну активність грамнегативних неферментуючих бактерій» затверджено на засіданні Вченої ради Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (протокол №4 від 30.11.2017 р.). Метою дисертаційної роботи було обрано пошук способів регуляції процесів біоплівкоутворення та формування стійкості до антибіотиків

грамнегативнимі неферментуючими бактеріями шляхом вивчення впливу на ці процеси різноманітних чинників.

Матеріал для виділення НФГНБ забирали у пацієнтів, що лікувалися в опіковому відділенні Вінницької обласної клінічної лікарні ім. М. І. Пирогова. Частину штамів, використаних у дослідженнях, було виділено від поранених, які отримали мінно-вибухові травми з локалізацією в нижніх кінцівках. Поранені брали участь в антитерористичній операції на сході України, проходили лікування у військово-медичному клінічному центрі міста Вінниці, військових шпиталях Києва, Харкова, Дніпра. Усього в процесі роботи з досліджуваним матеріалом було виділено 81 штам ГНБ. В експериментальних дослідженнях використовували 75 штамів мікроорганізмів, а саме: 35 штамів *Acinetobacter baumannii* та 40 штамів *Pseudomonas aeruginosa*.

У процесі виконання дисертаційного дослідження, у відповідності з поставленими завданнями, було вивчено морфологічні, культуральні, біохімічні властивості виділених штамів бактерій, визначено їхню фенотипову чутливість до широкого переліку використовуваних у сучасній медичній практиці антибіотиків. Проведено визначення первинної структури нуклеотидних послідовностей генетичного матеріалу та ідентифіковано гени резистентності до антибіотиків. Методом пасажування мікроорганізмів у м'ясо-пептонному бульйоні з наростаючими концентраціями антибіотиків визначено швидкість формування стійкості у штучних умовах штамами-носіями різних генетичних детермінант резистентності. Дослідження впливу складу поживного середовища, рН середовища, температури культивування, підвищеного осмотичного тиску та зниженого атмосферного тиску на біоплівкоутворювальну здатність клінічних ізолятів *A. baumannii* та *P. aeruginosa* визначали у 96-лункових полімерних планшетах за допомогою спектрофотометричного методу за G.D. Christensen.

За результатами наших досліджень властивостей 40 штамів *P. aeruginosa*, виділених від пацієнтів з гнійно-запальними ураженнями м'яких тканин, встановлено їхню морфологічну однотипність, але виявлено ознаки культуральної гетерогенності, яка проявилася в утворенні S-, R-, та M-колоній. До того ж 70 %

штамів псевдомонад продукували синьо-зелений пігмент, у 7,5 % штамів пігмент мав бурі відтінки (піорубін), а 22,5 % ізолятів не викликали візуально помітних змін кольору середовища. Найбільш стабільною видовою культуральною ознакою псевдомонад був специфічний запах, який відчувався в процесі росту культур незалежно від культуральних особливостей штаму. На відміну від псевдомонад, ацінетобактерії характеризувалися однорідністю культуральних ознак, утворюючи на МПА помутнілі, опуклі, слизисті S-форми колоній, однак у процесі мікроскопії мазків, забарвлених за методом Грама, мали міжштамові відмінності у морфології клітин (поперечному та подовжньому розмірі, взаємному розташуванні клітин).

Усі досліджені штами псевдомонад та ацінетобактерій проявляли типову для біологічного виду ферментативну активність, маючи незначну гетерогенність за деякими другорядними біохімічними ознаками. Гетерогенність *A. baumannii* була встановлена за їхньою здатністю ферментувати лактозу, яка була виявлена у 40% штамів, та за продукцією фосфатази та утилізації малонату. Високий рівень варіабельності у виділених штамів *P. aeruginosa* спостерігали за їхньою здатністю ферментувати манітол і ескулін.

У процесі проведення бактеріологічної діагностики слід враховувати, що міжштова варіабельність морфологічних та культуральних ознак, а також характеристик ферментативної активності, визначених рутинними загальноприйнятими лабораторними методами, можуть ускладнювати ідентифікацію і призводити до діагностичних помилок[4].

У природних умовах більшість бактерій виявляють здатність прикріплюватися до різних поверхонь і формувати на них біоплівки, які є складною сукупністю бактеріальних клітин, заповнених у самогенеровану матрицю екзополімерів. Цей процес є ключовою стратегією виживання видів під час вимушених змін умов існування, таких як відсутність необхідних для розмноження поживних речовин, коливання температури тощо. Організовані у біоплівку бактерії уникають впливу чинників імунітету і здатні витримувати вплив у тисячі разів вищих концентрацій протимікробних хімічних сполук, ніж планктонні форми тих же штамів мікроорганізмів. Неферментуючі грамнегативні бактерії і серед них

особливо *P. aeruginosa* відомі високою плівкоутворюючою активністю, що робить їх найкращою моделлю для вивчення процесів плівкоутворення бактерій загалом [204 – 205].

Нами проведено порівняльне експериментальне дослідження активності плівкоутворення виділеними штамми *P. aeruginosa* та *A. baumannii* в різних умовах. Перш за все, привернула увагу наявність суттєвих міжштамових і, особливо, міжвидових, відмінностей інтенсивності плівкоутворення *P. aeruginosa* та *A. baumannii* в стандартних умовах культивування. Псевдомонади виявляли помітно вищу здатність до плівкоутворення, у порівнянні з ацінетобактеріями. Так, лише один штам із 40 (2,5 %) досліджуваних не утворював біоплівку. Середній показник ( $M \pm SD$ ) інтенсивності утвореної плівки у псевдомонад дорівнював  $0,22 \pm 0,02$ . Серед ацінетобактерій 20 % ізолятів виявилися нездатними до плівкоутворення, а середній показник інтенсивності плівкоутворення *A. baumannii* був статистично достовірно нижчим ( $0,13 \pm 0,02$ ). У 60% досліджених штамів *P. aeruginosa*, показник інтенсивності утворення біоплівок був вищим за середнє значення. В ацінетобактерій тільки 45 % виділених культур за інтенсивністю плівкоутворення перевищували середній показник.

Вивчення впливу складу середовища культивування на утворення біоплівок неферментуючими грамотрицативними бактеріями показало, що навіть в умовах відсутності будь-яких джерел енергії і пластичного матеріалу, неферментуючі бактерії зберігають здатність структуруватися у біоплівку. Можна розглядати таку здатність як захисну реакцію на потрапляння в «голодні», тобто стресові умови обмеження в життєво необхідних елементах, яка реалізується за рахунок внутрішніх резервів бактеріальних клітин [18, 206].

Одночасно було встановлено, що ацінетобактерії проявляють високі адаптивні властивості та утворюють біоплівки навіть у стерильній дистильованій воді. Для активації процесу плівкоутворення псевдомонадами була необхідна наявність у середовищі хлориду натрію. Враховуючи те, що основою біоплівкового матриксу є полісахариди, можна було очікувати, що введення до середовища культивування цукрів може сприяти утворенню бактеріями біоплівок.

Однак, проведені експерименти показали, що введення до складу «голодного» середовища культивування глюкози, мальтози чи галактози в концентрації 1 % не змінювало інтенсивності плівкоутворення ацетобактеріями. Показники оптичної щільності утворених біоплівки до того ж статистично достовірно не відрізнялися від таких у процесі культивування у стерильній воді та фізіологічному розчині хлориду натрію. Додавання жбудь-якого з цих цукрів до середовища культивування псевдомонад істотно стимулювало інтенсивність утворення ними біоплівки, а показники інтенсивності плівкоутворення були статистично достовірно вищими, ніж під час культивування псевдомонад у воді чи ізотонічному розчині.

Наявність у середовищі азотвмісних сполук не є обов'язковою умовою плівкоутворення для обох видів неферментуючих бактерій, адже цей процес здійснюється і за їхньої відсутності. Додавання до середовища амінокислот аргініну чи лізину не чинило стимулювального впливу на активність утворення біоплівки представниками обох видів бактерій, незважаючи на те, що у НЕФЕРМ-тесті більшість досліджених штамів псевдомонад виявляли здатність розщиплювати аргінін. На введення у середовище простішої за будовою низькомолекулярної азотвмісної речовини сечовини ацетобактерії і псевдомонади реагували по-різному. Ацетобактерії не змінювали плівкоутворювальної активності у поживному розчині за присутності 1% сечовини. Уреаза-позитивні штами псевдомонад нарощували інтенсивність плівкоутворення до показника оптичної густини  $0,202 \pm 0,016$ , що перевищувало показник культивування в ізотонічному розчині ( $0,152 \pm 0,023$ ) більше ніж на 30 %.

Найвищий рівень плівкоутворювальної активності обидва види неферментуючих бактерій виявляли в присутності протеїнів тваринної сироватки. Показники плівкоутворювальної активності бактерій обох видів в ізотонічному розчині хлориду натрію з додаванням 1 % нормальної конячої сироватки були близькими до показників культивування у повноцінному поживному середовищі (ТСБ). Відносний приріст показника інтенсивності плівкоутворення за умови присутності сироватки, у порівнянні з культивуванням у ізотонічному розчині, у

*A. baumannii* склав 34 %, а у *P. aeruginosa* – 48 %.

На підставі результатів проведених нами досліджень, процес плівкоутворення загалом у *P. aeruginosa* можна визнати більшою мірою залежним від іонного складу середовища і наявності у ньому джерел енергії та пластичного матеріалу і водночас більш «гнучким», ніж у *A. baumannii*. Плівкоутворення як захисна реакція на обмеження в енергетичних і пластичних ресурсах у ацінетобактерій характеризується високою стабільністю і меншою мірою змінюється наявністю додаткових хімічних субстратів у оточуючому середовищі.

Дослідження інтенсивності плівкоутворення за різних температур культивування дозволило виявити різницю оптимальних умов для розвитку цього процесу у *P. aeruginosa* та *A. baumannii*. Найвищий рівень інтенсивності плівкоутворення ( $0,255 \pm 0,021$ ) *P. aeruginosa* виявляли за температури  $27^{\circ}\text{C}$ . У *A. baumannii* він був найбільш інтенсивним за температури культивування  $32^{\circ}\text{C}$ . У представників обох видів неферментуючих бактерій показники інтенсивності плівкоутворення істотно знижувалися у процесі підвищення температури культивування до  $39^{\circ}\text{C}$ .

Отже, процеси інтенсивного плівкоутворення у *P. aeruginosa* та *A. baumannii* виникають за температур, нижчих за температуру тіла людини. Цей факт необхідно враховувати за необхідності моделювання біоплівкоутворення у неферментуючих грамотригативних бактерій.

Дослідження впливу рН середовища культивування на плівкоутворюючу активність неферментуючих бактерій дало можливість зробити висновок про те, що ацінетобактерії і псевдомонади різко зменшують здатність утворювати плівки в кислому середовищі. Так, за значення рН середовища 5,0 показник інтенсивності утворення біоплівок у псевдомонад дорівнював  $0,112 \pm 0,014$  проти показника  $0,230 \pm 0,021$  за значення рН 7,0. Для ацінетобактерій ці показники змінювалися від  $0,154 \pm 0,018$  за значення рН 7,0 до  $0,044 \pm 0,015$  за значення рН середовища 5,0. У лужному середовищі *A. baumannii* активували ( $0,187 \pm 0,022$ ), а *P. aeruginosa*, навпаки, зменшували ( $0,188 \pm 0,018$ ) інтенсивність утворення біоплівок. Цей факт дає пояснення різним термінам інфікування опікових ран ацінетобактеріями та

псевдомонадами. Останні контамінують уражені ділянки пізніше, тобто тоді, коли рН ранового вмісту наближається до нейтральних значень.

Існує практика лікування запальних процесів, зумовлених синьо-гнійними паличками, розчинами борної кислоти. У Росії розчини борної кислоти до теперішнього часу використовуються для лікування синьогнійних отитів [207-208]. Нами досліджено вплив різних концентрацій (0,03 %, 0,05 %, 0,1 %) борної кислоти на активність плівкоутворення псевдомонад і ацінетобактерій. Вимірювання рН показало, що будучи слабкою кислотою, борна кислота ( $H_3BO_3$ ) в означених концентраціях не змінює концентрації водневих іонів і рН середовища залишається нейтральним (7,0). Однак, плівкоутворююча активність неферментуючих бактерій у присутності борної кислоти змінюється. Присутність борної кислоти у поживному середовищі, дійсно, потужно гальмує утворення біоплівки *P. aeruginosa*. Показник інтенсивності плівкоутворення цього виду бактерій зменшувався більше ніж на 10 % у присутності 0,003 %  $H_3BO_3$ , у порівнянні з культивуванням у звичайній буферній пептонній воді. У максимальній з досліджених концентрацій борної кислоти інтенсивність плівкоутворення псевдомонад падала майже у 1,5 рази. Реакція ацінетобактерій на введення у середовище борної кислоти була протилежною: чим вищою була концентрація борної кислоти, тим більшим був показник інтенсивності плівкоутворення.

Отже, борна кислота стимулювала плівкоутворення ацінетобактеріями і пригнічувала плівкоутворення псевдомонад. До того ж, механізм такого впливу препарату не був пов'язаним зі зміною кислотно-лужного балансу середовища. Пригнічення борною кислотою у низьких концентраціях плівкоутворення *P. aeruginosa* є частиною механізму антисептичної дії препарату. Однак, ця дія є слабкою, оскільки не виявляється у відношенні іншого виду неферментуючих бактерій. Навпаки, борну кислоту можна використовувати для стимуляції плівкоутворення у *A. baumannii*.

Чутливість до впливу осмотичного тиску бактерій коливається у широкому діапазоні. Нами визначено плівкоутворювальна активність *P. aeruginosa* та *A. baumannii* у присутності різних концентрацій (0,9 %, 3 %, 6 %, 9 %)



хлориду натрію. Розрахунковий осмотичний тиск у таких середовищах становив, відповідно, 7,5 атм, 27,4 атм, 52,1 атм та 79,7 атм. Наростання осмотичного тиску, зумовлене підвищенням концентрації хлориду натрію у середовищі, викликало у неферментуючих бактерій захисну реакцію у вигляді підвищення інтенсивності плівкоутворення. Приріст показника інтенсивності плівкоутворення у присутності 3 % хлориду натрію у *P. aeruginosa* був на рівні 8 %, а у *A. baumannii* – 4 %, у порівнянні з таким в умовах ізотонічного розчину. У процесі зростання концентрації хлориду натрію до 6 % ( $P_{осм}=52,1$  атм) обидва види мікроорганізмів утворювали біоплівки найактивніше. Показники щільності біоплівок були вищими у них на понад 20 %, ніж у ізотонічному розчині. У 9 % розчині хлориду натрію при рівні осмотичного тиску, близькому до 80 атм, спостерігали різке пригнічення активності біоплівкоутворення. Вочевидь, у подібних умовах ресурс захисних фізіологічних реакцій *P. aeruginosa* та *A. baumannii* вичерпується.

Результатами експериментальних досліджень встановлено, що негативний атмосферний тиск на рівні -125 мм.рт.ст. стимулює інтенсивність плівкоутворення *P. aeruginosa* та *A. baumannii*. Тому, не заперечуючи лікувальної ефективності ВАК-терапії, яка останніми роками знайшла широке застосування у хірургічній практиці, слід враховувати в процесі її використання високу вірогідність утворення на поверхні ран сесільних форм бактерій, що характеризуються високим рівнем стійкості до протимікробних засобів і сприяють хронізації запального процесу.

Резистентність мікроорганізмів до антибіотиків і, як наслідок, різке зниження ефективності етіотропної терапії інфекційних захворювань є серйозною загрозою добробуту і здоров'ю людства. Актуальність та серйозність цієї проблеми повною мірою усвідомлена міжнародною медичною спільнотою. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) 2001 року розробила та опублікувала «Глобальну стратегію ВООЗ зі стримання стійкості до протимікробних препаратів», у якій рекомендовано розглядати вказану проблему як один із пріоритетів системи охорони здоров'я (World Health Organization, 2001). Для консолідації дій у боротьбі з антибіотикорезистентністю 2009 року створено Трансатлантичну цільову групу з дослідження антимікробної резистентності

(Transatlantic Task force on Antimicrobial Resistance / TATFAR). Інфекції, спричинені антибіотикорезистентними штамми збудників, включено до переліку захворювань, що підлягають постійному епідеміологічному нагляду [177].

Нами проведено детальне вивчення стійкості виділених штамів псевдомонад і ацінетобактерій до широкого переліку сучасних антибіотиків. Серед псевдомонад, штамів, які за стандартами EUCAST слід віднести до немультрезистентних (nMDR), не виявлено. З числа штамів *A. baumannii* до цієї групи належать 8,6 %. Переважна більшість (71,4 %) досліджених штамів ацінетобактерій належало до групи мультрезистентних (MDR). У *P. aeruginosa* MDR-штамів було менше (52,5 %) за рахунок зсуву на користь групи штамів з розширеною резистентністю (XDR), відносна кількість яких становила 42,5 %. Серед ацінетобактерій показник належності до XDR-штамів дорівнював 20%. Крім того, серед псевдомонад 5 % штамів належало до панрезистентних (PDR), тоді як серед *A. baumannii* таких варіантів не виявлено.

Порівнюючи встановлені рівні фенотипової резистентності неферментуючих бактерій двох видів слід, відмітити високу стійкість обох видів до широкого переліку сучасних антибіотиків. Однак, у медичному сенсі більш проблемними є *P. aeruginosa*, оскільки загалом за інтегральною оцінкою їхній рівень стійкості до більшості досліджених антибіотиків за нашими спостереженнями інших авторів є вищим [179].

У результаті вивчення молекулярно-генетичних характеристик досліджених штамів неферментуючих бактерій та мультилокусного секвенсування було встановлено, що їхня генетична структура характеризується певним різноманіттям неспоріднених секвенс-типів. Одночасно, значна частка належить до міжнародних клонів високого епідемічного ризику. Так, 40 % досліджених штамів *A. baumannii* належать до секвенс-типу ST78 за схемою Pasteur. Небезпечність цього клону ацінетобактерій спричинена абсолютною стійкістю до  $\beta$ -лактамних антибіотиків, зумовленою наявністю генів, відповідальних за синтез  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру дії *bla*CTXM-115 та OXA40-подібної карбапенемази *bla*OXA72. Поява представників цього клону у лікувальних

зкладах України свідчить про близьку небезпеку повної втрати ефективності антибіотиків карбапенемового ряду.

Серед досліджених штамів *P.aeruginosa* було встановлено представників двох глобальних клонів високого ризику, а саме: ST235 (4 штами) та ST1047 (3 штами). Географія поширення цих клонів є по-справжньому глобальною, оскільки охоплює країни Європи, Азії, Африки, Північної та Південної Америки. Ціваріантипсевдомонад є носіями генів, відповідальних за синтез метало- $\beta$ -лактамаз *blaIMP-34* та *blaVIM-2*.

Усього у досліджених госпітальних штамів ацінетобактерій встановлена наявність чотирнадцяти, а у псевдомонад - 22 генетичних детермінант  $\beta$ -лактамаз, що відповідають за резистентність до пеніцилінів, цефалоспоринів, карбапенемів. Слід звернути увагу на те, що серед них були гени, відповідальні за продукцію метало- $\beta$ -лактамаз типу *blaNDM-1*, які гідролізують усі наявні  $\beta$ -лактамі антибіотики і зумовлюють абсолютну стійкість до антибіотиків цієї групи, і крім того, не пригнічуються класичними інгібіторами, що використовуються для створення «захищених»  $\beta$ -лактамів [181].

Стійкість до антибіотиків аміноглікозидного ряду у бактерій обох видів пояснюється наявністю генів аміноглікозид-ацетилтрансфераз (*aac*), аміноглікозид-аденилтрансфераз (*ant*, *aad*) та аміноглікозид-фосфотрансфераз (*aph*). Нами виявлено 18 варіантів таких генетичних детермінант у псевдомонад, у ацінетобактерій – 11. Деяким ізолятам *A. baumannii* було властиво продукувати 16S-метилтрансферазу, яка інактивує всі антибіотики-аміноглікозиди. Окремі штами *P. aeruginosa* містили гени *aac (6')-II*, відповідальні за синтез ацетилтрансфераз, які змінюють структуру молекул аміноглікозидів та фторхінолонів, та ген *qnrVC1*, відповідальний за синтез захисного для гіраз і топоізомераз білка.

Окремі з досліджених штамів, які мали гени, відповідальні за синтез серинових карбапенемаз, під час визначення чутливості до меропенему за допомогою ДДМ мали граничні, за стандартами EUCAST, значення діаметрів зон пригнічення і могли бути приналежними до помірностійких варіантів. Нами було

досліджено швидкість експресії детермінант стійкості, яка першопочатково в популяції фенотипово не виявлялася. З цією метою нами було визначено швидкість зростання ступіню стійкості псевдомонад і ацінетобактерій з різними генетичними характеристиками до окремих антибіотиків у процесі культивування у середовищі зі збільшуваними концентраціями препарату.

Дослідження швидкості формування стійкості до меропенемупсевдомонад та ацінетобактерій встановило стрибкоподібні зміни їхнього ступеня резистентності до антибіотика в процесі культивування в концентраціях препарату, що зростали. У досліджених штамів псевдомонад початковий показник МБцК меропенему становив 31,25 мкг/мл і до четвертого пасажу тримався на вихідному рівні, на 4 пасажі – зріс відразу у 4 рази і на рівні 125 мкг/мл тримався до 10 пасажу, після чого знову зріс до 500 мкг/мл. Після низки подібних стрибкоподібних змін культури на 46-му пасажі набули здатності зберігати фізіологічну активність у присутності 32000 мкг/мл меропенему. Тобто, субстратна експресія наявних генетичних детермінант настільки збільшила продукцію  $\beta$ -лактамаз, що стійкість мікробної популяції псевдомонад до меропенему зросла більш, ніж у 1000 разів.

У досліджених штамів *A. baumannii* адаптація до високих концентрацій меропенему відбувалася повільніше. Бактерицидний ефект спостерігали за концентрації антибіотика 31,25 мкг/мл протягом 5 пасажів. На 6 пасажі спостерігали стрибок показника МБцК до 500 мкг/мл і на такому рівні він зберігався до 19-го пасажу, коли показник знову зріс у 8 разів. На рівні 4000 мкг/мл бактерицидна концентрація меропенему для *A. baumannii* зберігалася до 46-го пасажу.

Нами було встановлено, що формування стійкості до амікацину, навіть у штамів *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, що не мали генів синтезу руйнівних для аміноглікозидів ферментів, відбувається швидше, ніж до формування стійкості до меропенему. Впродовж перших трьох пасажів бактерицидний ефект амікацину на досліджені штами *P. aeruginosa* досягався за концентрації препарату у середовищі 62,5 мкг/мл. Починаючи з 4 пасажу МБцК препарату з кожним пасажем зростала у

і на 9 пасажі досягла 32000 мкг/мл. Такий рівень резистентності синьогнійна паличка досягала до меропенему після 46-ти пасажів. Досліджувані ізоляти *A. baumannii* формували стійкість до амікацину ще швидше. Показника МБцК у 32000 мкг/мл було досягнуто на 7 пасажі.

Для дослідження швидкості формування стійкості псевдомонад до левофлоксацину – препарату групи фторхінолонів, ми використовували штами з наявністю генів резистентності та без них. Результати дослідження швидкості зростання стійкості до левофлоксацину обох варіантів псевдомонад показали, що їхня адаптація до високих концентрацій левофлоксацину відбувалася швидше, ніж до амікацину. Для штамів *P. aeruginosa* з генетично детермінованим механізмом резистентності до фторхінолонів, МБцК з кожним пасажем зростала вдвічі і вже на 5 пасажі досягла максимального значення. У штамів псевдомонад, які були чутливими до левофлоксацину, показник МБцК антибіотика з кожним пасажем зростав у 4-8 разів і вони швидко надолужували за рівнем стійкості первинно-резистентні штами. Для досягнення максимально можливого показника їм знадобилося лише на один пасаж більше.

У процесі штучного формування високого рівня стійкості у неферментуючих бактерій до меропенему відзначено перехресне зростання резистентності до іміпенему, цефалоспоринів III покоління, захищених сульбактамомампіциліну і цефоперазону, амікацину. Крім того, у ацінетобактерій одночасно змінювалися характеристики ферментативної активності, а псевдомонади втрачали здатність до пігментоутворення. Тобто, формування стійкості до меропенему призводило до змін біологічних властивостей, які можуть ускладнювати ідентифікацію бактерій у процесі бактеріологічних досліджень.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та експериментальне обґрунтування вирішення актуального науково-практичного завдання сучасної мікробіології щодо визначення практично важливих біологічних характеристик і можливостей впливу на плівкоутворювальну активність найбільш поширених у лікувальних закладах нашої країни видів грамнегативних неферментуючих бактерій, моніторингу рівня антибіотикорезистентності госпітальних штамів *P. aeruginosa* та *A. baumannii*.

1. У лікувальних закладах хірургічного та комбустіологічного профілю нашої країни циркулюють грамнегативні неферментуючі бактерії, що належать до родів *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*. Поміж них сукупна питома вага представників біологічних видів *Acinetobacter baumannii* та *Pseudomonas aeruginosa* становить 92,6 %.

2. Міжштамова варіабельність морфологічних та культуральних ознак, а також характеристик ферментативної активності, визначених рутинними загальноприйнятими лабораторними методами для штамів *A. baumannii* та *P. aeruginosa*, можуть ускладнювати ідентифікацію і призводити до діагностичних помилок. Циркулюючі штами ацінетобактерій і псевдомонад характеризуються неоднаково високим рівнем плівкоутворювальної активності. 3-поміж досліджених штамів *A. baumannii* 20 % не виявляли здатності до плівкоутворення, тоді як серед штамів *P. aeruginosa* таких було лише 2,5 %.

3. Виділені штами *A. baumannii* та *P. aeruginosa* характеризувались високим рівнем резистентності до антибіотиків. Так 52,5 % штамів *P. aeruginosa* за стандартами EUCAST належали до мультирезистентних, 42,5 % – до штамів з розширеною резистентністю, а 5 % – до панрезистентних. Серед ацінетобактерій 8,6 % штамів були немультрезистентними, 71,4 % – мультирезистентними і 20 % належали до штамів із розширеною резистентністю.

4. За результатами вивчення молекулярно-генетичних характеристик

досліджених штамів неферментуючих бактерій та мультилокусногосиквенс-типуння доведена присутність серед циркулюючих штамів міжнародних клонів високого епідемічного ризику. Так, 40% досліджених штамів *A. baumannii* належать до сиквенс-типу ST78, 17,5% штамів *P. aeruginosa* – до сиквенс-типів ST235 та ST1047. Досліджені штами є носіями 36 різних генетичних детермінант стійкості до  $\beta$ -лактамних антибіотиків, зокрема генів серинових карбапенемаз *blaGES-11*, *blaOXA-72*, *blaOXA-23*; генів метало- $\beta$ -лактамаз *blaIMP-1*, *blaIMP-34*, *blaVIM-2*, *blaNDM-1*. Штами обох видів мають гени повного переліку трансфераз, що інгібують антибіотики аміноглікозидного ряду.

5. Процеси плівкоутворення у *P. aeruginosa* та *A. baumannii* інтенсивно перебігають за температур, нижчих за температуру тіла людини (27°C та 32°C відповідно). Підвищення температури оточуючого середовища до 39°C пригнічує активність плівкоутворення обох видів мікроорганізмів. Сприятливими для плівкоутворення у *P. aeruginosa* є нейтральні значення рН середовища. У слабокислому середовищі (рН 5,0) активність плівкоутворення мікроорганізмами обох видів пригнічується. У слаболужному середовищі (рН 8,0) активність плівкоутворення *A. baumannii* зростає, а у *P. aeruginosa* – знижується. Борна кислота у концентраціях 0,05 % – 0,1 %, не змінюючи рН середовища, пригнічує плівкоутворення у псевдомонад і стимулює плівкоутворення ацетобактеріями.

6. Зростання осмотичного тиску в оточуючому середовищі в діапазоні від 7,5 атм (ізотонічний розчин NaCl) до 52,1 атм стимулює процеси утворення біоплівку *P. aeruginosa* та *A. baumannii*. Подальше зростання осмотичного тиску веде до пригнічення плівкоутворювальної активності. Негативний атмосферний тиск на рівні - 125 мм.рт.ст. стимулює процеси плівкоутворення псевдомонадами і ацетобактеріями.

7. Клінічні штами *P. aeruginosa*, що є носіями генетичних детермінант синтезу  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру дії, та фенотипово не виявляють високого рівня стійкості до карбапенемів, за наявності у середовищі меропенему здатні швидко адаптуватися до впливу високих концентрацій антибіотика. При цьому рівень їх стійкості зростає у 1024 рази. Адаптація *P. aeruginosa* та *A. baumannii* до

високих концентрацій амікацину і левофлоксацину відбувається значно швидше, ніж адаптація до меропенему, навіть у штамів, які не мають відомих детермінант стійкості до цих антибіотиків.



**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Габисония Т. Г. Некоторые особенности неферментирующих бактерий (*Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*) и их роль в инфекционной патологии человека и животных: автореф. дис. на соискание учен. степени доктора биологич. наук : 16.00.03 / Габисония Тараси Гигиевич. – Тбилиси, 1994. – 35 с.
2. Ширококов В. П. Микробы в биогеохимических процессах, эволюции биосферы и существовании человечества / В. П. Ширококов, Д. С. Янковский, Г. С. Дымент. – Киев: ФОП Верес О. И., 2014. – 464 с.
3. Патика В. П., Пасічник Л. А. / Фітопатогенні бактерії: фундаментальні і прикладні аспекти // Вісник уманського національного університету садівництва, № 2, 2014. – С. 7-11.
4. Whistler, T.; Sangwichian, O.; Jorakate, P.; Sawatwong, P.; Surin, U.; Piralam, B.; Thamthitiwat, S.; Promkong, C.; Peruski, L. Identification of Gramnegative non-fermentativebacteria: How hard can it be? PLoS Negl Trop Dis. 2019 Sep 30;13(9):e0007729. doi: 10.1371/journal.pntd.0007729. eCollection 2019 Sep.
5. De Britto, S.; Gajbar, T.D.; Satapute, P.; Sundaram, L.; Lakshmikantha, R.Y.; Jogaiah, S.; Ito, S.-I. Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. Sci Rep. 2020; 10: 1542. Published online 2020 Jan 31. doi: 10.1038/s41598-020-58335-6.
6. Шевченко Л. В., Строкань А. М., Азімцева О. А. / Динаміка грамнегативних неферментуючих бактерій у структурі бактеріальних збудників інфекцій // Актуальні проблеми клінічної та профілактичної медицини, 2016. - Т. 4, № 1. - С. 50-53.
7. Н. П. Волянська / Загальнобіологічна роль бактерій роду *Pseudomonas* в природі, їх клінічна значущість та чутливість до антибіотиків // Annals of Mechnikov Institute. - № 3, 2009. - С. 5-8.
8. SilvaFilhoL.V.R.F., FerreiraF.D.A., ReisF.J.C., BrittoM.C.A.D., LevyC.E.,

Clark O., et al. / *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment // J. Bras. Pneumol. 2013 Jun-Aug; 39(4): 495–512. doi: 10.1590/S1806-37132013000400015.

9. Oluyombo, O.; Penfold, C. N.; Diggle, S. P. Competition in Biofilms between Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Is Shaped by R-Pyocins. *mBio*, January/February 2019 Volume 10 Issue 1 e01828-18.

10. Салманов А. Г., Вернер О. М. / Антибіотикорезистентність нозокоміальних штамів *Pseudomonas aeruginosa* в хірургічних стаціонарах України: результати багатоцентрового дослідження (2011-2015 рр.) // Міжнародний журнал антибіотики та пробіотики, 2017, № 1 (1). - С. 49-63.

11. Попов М. М., Перетятко О. Г., Ягнюк Ю. А. / Антибіотикорезистентність бактерій: причини, механізми розвитку, наслідки // Південноукраїнський медичний науковий журнал, 2018, № 20. - С. 55-58.

12. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009 Jan;48(1):1–12.

13. Sekyere, J.O.; Sephofane, A.K.; Mbelle, N.M. Comparative Evaluation of CHROMagar COL-APSE, MicroScan Walkaway, ComASP Colistin, and Colistin MAC Test in Detecting Colistin-resistant Gram-Negative Bacteria. *Sci Rep*. 2020 Apr 10;10(1):6221. doi: 10.1038/s41598-020-63267-2.

14. Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B.R.; Lin, T.J.; Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv*. Jan-Feb. 2019; 37(1):177-192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013. Epub 2018 Nov 27.

15. Yang, L.; Hu, Y.; Liu, Y.; Zhang, J.; Ulstrup, J.; Molin, S. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environ. Microbiol*. 2011 Jul;13(7):1705-17. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02503.x. Epub 2011 May 23.

16. Rasamiravaka, T.; Labtani, Q.; Duez, P.; El Jaziri, M. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic

Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Res. Int.* 2015, 2015, 759348.

17. Meng, X.; Ahator, S.D.; Zhang, L.-H. Molecular Mechanisms of Phosphate Stress Activation of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems. *mSphere* 2020, 5, 119–120.

18. Бевз А. О., Коваленко К. Г. / Дослідження впливу екологічних факторів на розповсюдження інфекційних захворювань // Наукові записки КНТУ, Вип.11, Ч. 3, 2011. - С. 227-229.

19. Янковський Д. С., Широбоков В. П., Димент Г.С. / Мікробіом у фізіології людини // Інфекційні хвороби, Т.3, Вип. 93, 2018. – С. 5-17.

20. Walker H. I., Mason A. D. Jr, Raulston G. I. Surface Infection with *Pseudomonas aeruginosa* // *Ann. Surg.* - 2003. - Vol. 160. - P. 297-305.

21. Федюкіна Д. В. Аналіз чинників, які впливають на мікробіологічну біодеструкцію вуглеводнів нафти / Д. В. Федюкіна, Г. Г. Трохименко / Вісник Національного університету кораблебудування: електронне видання. – 2010. – № 5. – Режим доступу: <http://evn.nuos.edu.ua/article/view/25096/22520>).

22. Сушко А. Р., Дуган О.М., Журахівська Л. Р., Марінцова Н. Г. / Мікроорганізми як деструктори та індикатори токсичності гетероциклічних сполук. - 2016. - С. 249-257.

23. Шагинян И. А. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические микробиологические и эпидемиологические особенности / И. А. Шагинян, М. Ю. Чернуха // *Клиническая микробиология и антимикробная терапия.* – 2005. – Т. 7, № 3. – С. 271–285.

24. Зубков М. Н. / Неферментирующие бактерии: классификация, общая характеристика, роль в патологии человека. Идентификация *Pseudomonas* spp. и сходных микроорганизмов // *Инфекции и антимикробная терапия.* – Т. 5, № 1, 2003. - С. 1-7.

25. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад / За редакцією В.П. Широбокова / Видання 2-е.

– Вінниця : Нова Книга, 2011. – С. 408-411.

26. Garrity, George M.; Brenner, Don J.; Krieg, Noel R.; Staley, James T. (eds.) (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. New York: Springer. pp. 354–361.

27. Род *Chryseobacterium* (Flavobacterium): клиническое значение, идентификация, чувствительность к антибиотикам / Л. Г. Боронина, М. П. Кукушкина, К. В. Крутова, С. М. Блинова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2003. - № 3. - Т. 5. – С. 243-250.

28. Боронина Л. Г., Кукушкина М. П., Крутова К. В., Блинова С. М. Род *Chryseobacterium* (Flavobacterium): клиническое значение, идентификация, чувствительность к антибиотикам / Л. Г. Боронина, М. П. Кукушкина, К. В. Крутова, С. М. Блинова // «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия». – 2003. – № 3, том 5. – С. 122–128.

29. Зубков М. Н. *Moraxella* (*Bronchamella*) *catarrhalis*: роль в патологии человека, идентификация и антибиотикорезистентность / М. Н. Зубков / Инфекции и антимикробная терапия. – 2001. – Т. 3, № 4. – С. 115–116.

30. Кондратюк В. М., Прокопчук З. М., Буркот В. М., Вовк І. М. / Особливості формування резистентності до антибіотиків у грамнегативних неферментуючих бактерій // Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, 2018, Т. 22, № 2. – С. 253-256.

31. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. The World Health Organization. Взято з URL: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>(Publication date: 27 February 2017).

32. Polk H.C. Jr, Borden S., Aldrete J.A. / Prevention of *Pseudomonas* respiratory infection in a surgical intensive care unit // *Ann Surg.* - 2001. - Vol. 177., № 5. - P. 607-615).

33. Mellor J. A. / Vaccines and antisera against gram-negative bacilli // *J. Hosp.*

Infect. - 2003. - Vol. 3, № 4. - P. 397-398.

34. Ананьева М. М., Лобань Г. А., Фаустова М. О. / Мікробіологічна діагностика захворювань, викликаних грамнегативними неферментуючими бактеріями (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp.) // Навчальний посібник, Полтава 2017. – 128 с.

35. Arivett B. A., Ream D. C., Fiester S. E., Kidane D., Actis L. A. / Draft genome sequences of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from wounded military personnel // *Genome Announc*, 2016Jul-Aug; 4(4): e00829-16.

36. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции: федеральные клинические (методические) рекомендации. – Москва: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2014. – 82 с.  
[http://nasci.ru/\\_resources/directory/199/common/FKR\\_Ps.aerug.pdf](http://nasci.ru/_resources/directory/199/common/FKR_Ps.aerug.pdf).

37. Харченко Л.А. / Синегнойная палочка: современные реальности антибактериальной терапии // *Медицина неотложных состояний*. - № 1 (64), 2015. - С. 164-168.

38. Гаркавенко Т. О., Неволько О. М., Ординська Д. О., Меженська Н. А., Козицька Т. Г. / Антибіотикорезистентність мікроорганізмів // *Ветеринарна медицина України* 2015. - С. 13-16.

39. Новгородова О. Ю., Ушкалов В. О., Мазур Т. В. Особливості епідемічної та епізоотичної ситуації щодо *Pseudomonas aeruginosa*: [електронний ресурс]. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2017. № 3 (67). Режим доступу до статті: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/issue/view/348>).

40. Условно-патогенные микроорганизмы рода *Moraxella* / О. Ю. Николенко, Л. З. Гриценко, Н. В. Жадинский [и др.] // *Медико-социальные проблемы семьи*. – 2011. – Т. 16, № 1. – С. 116–121.

41. CrayJA, BellANW, BhagannaP, MswakaAY., TimsonDJ., HallsworthJE. Thebiologyofhabitatdominance; canmicrobesbehaveasweeds? *Microb. Biotechnol.* 2013;6: 453492. 10.1111/1751-7915.12027.

42. DoughariHJ., NdakidemiPA, HumanIS, BenadeS. Theecology,

biologyandpathogenesisof*Acinetobacterspp.*: anoverview. *MicrobesEnviron.* 2011; 26, 101–112.10.1264/jsme2.ME10179.

43. JH vander Kolk, EndimianiAcinetobacterin Veterinary Medicine, Withan Emphasison *Acinetobacter baumannii* // *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019; 16: 59-71.

44. Шмакова М. А., Штернис Т. А., Желнина Т. П., Брусина Е. Б. Распространенность бактерий рода *Acinetobacter* в медицинских организациях Кемеровской области. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2018; 17 (3). - С. 27-31.

45. Гриценко Л. З., Колоколова Е. В., Колесникова А. Г., Мишин В. В., Ананьева М. Н. / Роль ацинетобактерий в возникновении проблемных инфекций // *Медико-соціальні проблеми сім'ї*, ISSN 1608-876X. - Т. 19, № 1, 2014. - С. 122-127.

46. Коротяев А. И. Энтеробактерии // *Медицинская микробиология, иммунология и вирусология* / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. - СПб.: Специальная литература, 2008. - С. 347-348.

47. Environmental biodiversity, human microbiota, and allergyare interrelated / I. Hanski., L. von Hertzen, N. Fyhrquist[et al.] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* — 2012. — Vol. 109. —№ 21. — P. 8334-8339.

48. The allergy-protective properties of *Acinetobacter lwoffii*F78 are imparted by its lipopolysaccharide / J. Debarry,A. Hanuszkiewicz, K. Stein [et al.] // *Allergy.* — 2010. —Vol. 65, № 6. — P. 690-697.

49. SeifertH., DijkshoornL., Gerner-SmidtP., PelzerN., TjernbergI., VaneechoutteM. / Distributionof*Acinetobacterspecies*onhumanskin: comparisonofphenotypicandgenotypicidentificationmethods // *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 2819–2825.

50. Шагинян И. А. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические микробиологические и эпидемиологические особенности / И. А. Шагинян, М. Ю. Чернуха // *Клиническая микробиология и антимикробная терапия.* – 2005. – Т. 7, № 3. – С. 271–285.

51. *Bergey'sManualofSystematicBacteriology.* 2nd Edition. URL:

<http://www.bergeys.org/outlines.html> (available: 31.07.2014).

52. И. В. Чеботарь, А. В. Лазарева, Я. К. Масалов, В. М. Михайлович, Н. А. Маянский / *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства // Вестник РАМН, 2014. - № 9–10. - С. 39-50.

53. Kovalchuk V. P., Prokopchuk Z. M., Burkot V. M. / Characteristics of adaptive properties of nonfermenting bacteria // III International Scientific Conference «Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century». Abstracts book. April 19-20, 2018, Kyiv.

54. Леонтьева А. В., Воронкова О. С., Вінніков А. І. / Чутливість до антибіотиків грамнегативних бактерій – збудників ускладнень ранових поверхонь // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 1, Том 2 (127). - С. 163-167.

55. Шашнян И. А., Чернуха М. Ю. / Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемические особенности / И. А. Шашнян, Чернуха М. Ю. // «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия». – 2005. – № 7, Т. 3. – С. 271–285.

56. Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штамов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования / М. В. Сухорукова, М. В. Эйдельштейн [и др.] // «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия», 2014. – № 16, Том 4. – С. 273–279.

57. Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штамов *Acinetobacter baumannii* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн [и др.] // «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия». – 2014. – № 16, Том 4. – С. 266–272.

58. Лазарева А. В., Чеботарь И. В., Крыжановская О. А., Чеботарь В. И., Маянский Н. А. / *Pseudomonasaeruginosa*: патогенность, патогенез и патология // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер., 2015, Т. 17, № 3. - С. 170-186.

59. KungV. L., OzerE. A., HauserA. R. /

The accessory genome of *Pseudomonasaeruginosa* // Microbiology and molecular biology reviews, 2010; Вип. 74, № 4. – P. 621-41.

60. Turner J. M., Messenger A. J. / Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production // Advances in microbial physiology, 1986; № 27. – P. 211-75.

61. Wahba A. H. Pyrorubrin-producing *Pseudomonasaeruginosa*. Applied microbiology 1965; Вип. 13, № 2. – P. 291-192.

62. В. В. Клочко / Біосинтез антибіотиків як таксономічний маркер деяких видів *Pseudomonas* // Наукові вісті НТУУ "КПІ", 2017, № 3. - С. 29-33.

63. Гадзевич О. В. / Фактори патогенності збудника псевдомонозу (огляд літератури) // Ветеринарна медицина, 2016, Вип. 102. - С. 75-77.

64. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции: федеральные клинические (методические) рекомендации. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2014 – 82 с.

65. Леженко Г. О., Пашкова О. Є., Пантюшенко Л. І. / Рациональна антибактеріальна терапія захворювань органів дихання в дітей // Здоровье ребенка. - 2013. - № 8. - С. 33-36. - Режим доступа: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zd\\_2013\\_8\\_8](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zd_2013_8_8).

66. Нестерук К. М., Соколова І. Є., Братусь О. В. / Розповсюдженість карбапенемрезистентних штамів *Pseudomonasaeruginosa*– продуцентів метало-β-лактамаз // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина. – 2011. – Вип. 2, Т. 1. – С. 95–100.

67. Склеенова Е. Ю., Азизов И. С., Шек Е. А., Эйдельштейн М. В., Козлов Р. С., Дехнич А. В. / *Pseudomonas aeruginosa* в РФ: история одного из наиболее успешных нозокомиальных патогенов // КМАХ, 2018. - Т. 20, № 3. – С. 164-171.

68. Стоєва Т. В., Федін М. В. / Профілактика рецидивної інфекції сечової системи у дітей із застосуванням імуномодуляторів мікробного походження / Современная педиатрия. - 2019. - № 3. - С. 56-60. - Режим доступа: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Sped\\_2019\\_3\\_11](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Sped_2019_3_11)).

69. Римша О. В. / Мікробіологічне вивчення інфікованості урологічних хворих з гострою затримкою сечі // Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології.



Зб. наукових праць щорічної науково-практ. конф. з міжнародною участю «Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу»: мат. наук.-практ. конф., Львів, 2015. – С. 119-121.

70. Римша О. В. / До сучасної оцінки нозокоміальної інфекції (огляд літератури) // *Biomedical and Biosocial Anthropology*, 2015. - № 25. – С. 225-232.

71. Krein SL, Fowler KE, Ratz D, Meddings J, Saint S. Preventing device-associated infections in US hospitals: national surveys from 2005 to 2013. *BMJ Qual Saf.*, 2015. - 24(6). P. 385-392.

72. Tandogdu, Z., Kakariadis, E., Naber, K., Wagenlehner, F., Bjerklund Johansen, T. E. / Appropriate empiric antibiotic choices in health care associated urinary tract infections in urology departments in Europe from 2006 to 2015: A Bayesian analytical approach applied in a surveillance study // *PloS one*, 2019, 14(4), P. 1-18. - Режим доступу: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214710>.

73. Жилина С. В., Миронов А. Ю., Поликарпова С. В., Пивкина Н. В. / *Pseudomonas aeruginosa* при гнойно-воспалительных заболеваниях кожи и мягких тканей // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2008, № 2. – С. 89-97.

74. Нагайчук В. І., Назарчук О. А., Палій В. Г., Макац Є. Ф., Буркот В. М. / Вивчення властивостей мікрофлори опікової поверхні у пацієнтів з опіками // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. – 2014. – № 22. – С. 194-199.

75. Чернякова Г. М., Мінухін В. В. / Етіологічна структура та чутливість до антибіотиків основних збудників інфекційних ускладнень у пацієнтів з опіками // *Експериментальна і клінічна медицина*, 2016. № 3 (72). - С. 44-47.

76. Чернякова Г. М., Мінухін В. В., Воронін Є. П. / Сучасний погляд на місцеве лікування опіків з інфекційною складовою (огляд літератури). // *Вісник біології та медицини*, 2016. - Т. 1, № 133. - С. 68-72.

77. Mansoor T., Musani M. A., Khalid G., Kamal M. / *Pseudomonas aeruginosa* in chronic suppurative otitis media: sensitivity spectrum against various antibiotics in Karachi // *J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad*, 2009; 21(2). – С. 120-123.

78. Бойцов А. Г., Васильев О. Д. / Неферментирующие бактерии

// Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство. – Под ред. В. В. Долгова, В. В. Меньшикова. – Москва: «ГЭОТАР-Медиа», 2013. – С. 380-381.

79. Вовк І. М., Кривецька Н. В., Буркот В. М., Дудар А. О., Кулик А. В. / Мікробіологічне обґрунтування антимікробного лікування експериментального псевдомонадного кератиту // Вісник ВНМУ, 2020, Т. 24, № 1. – С. 114-117.

80. HazlettLD. / Bacterialinfectionsofthecornea (*Pseudomonasaeruginosa*) // Chem. Immunol. Allergy 2007; 92. – P. 185-194.

81. Леженко Г. О., Пашкова О. Є. / Інфекції, викликані паличкою синьо-зеленого гною, – стара проблема, що потребує нових рішень // Дитячий лікар, 2013, № 3 (24). – С. 20-25.

82. Ковальчук В. П., Прокопчук З. М., Вовк І.М., Фоміна Н. С., Коваленко І. М., Буркот В. М. / Порівняльне вивчення антимікробної активності сучасних дезінфектантів // Науково-практична конференція «Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського» 12 лютого 2020 року, м. Харків. – С. 62-63.

83. Леженко Г. О., Пашкова О.Є. / Інфекції, викликані паличкою синьо-зеленого гною, – стара проблема, що потребує нових рішень // Дитячий лікар, 2013, № 5 (26). – С. 9-18.

84. ChuangC. H., WangY. H., ChangH. J., ChenH. L., HuangY.C., LinT.Y., etal. / Shanghai fever: adistinct*Pseudomonasaeruginosa*aentericdisease // Gut 2014; 63(5). – С. 736-743.

85. Руднов В. А. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa* // Рус. мед. журнал. - 2005. - Т. 13, № 7. - С. 485-490.

86. Фоміна Н. С., Арцибасова І. А., Прокопчук З. М., Трофіменко Ю. Ю. / Проблема ефективності антибіотикопрофілактики вентилятор-асоційованих пневмоній у новонароджених // Вісник ВНМУ, 2018, Т. 22, № 2. – С. 338-342.

87. Трофіменко Ю. Ю., Жорняк О. І., Фоміна Н. С., Буркот В. М., Кулик А. В., Жорняк П. В. / Дослідження ефективності використання антисептичних композицій на основі декаметоксину для обробки ендотрахеальних

трубок з метою попередження розвитку вентилятор-асоційованої пневмонії у пацієнтів відділення інтенсивної терапії // Вісник ВНМУ, 2020, Т. 24, № 1. – С. 17-19.

88. Харченко Л. А. / Синегнойная палочка: современные реальности антибактериальной терапии // Медицина неотложных состояний. - № 1 (64), 2015. - С. 164-168.

89. Тодосійчук Т. С., Стрелець Т. І., Конопацька С. В. / Підвищення стійкості мікробних патогенів як фактор розробки нових антисептиків // Наукові вісті НТУУ "КПІ", 2011. - № 3. - С. 90-97.

90. Трофіменко Ю. Ю., Буркот В. М. / Чутливість до антибіотиків грамнегативних неферментуючих бактерій, які спричиняють розвиток вентилятор-асоційованої пневмонії // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» 29 січня 2018 р. – Чернівці, 2018. – С. 54-55.

91. Швидкість формування антибіотикорезистентності грамнегативними неферментуючими бактеріями / В. М. Буркот, Н. С. Фоміна, О. А. Назарчук, Ю. Ю. Трофіменко // Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека: мат. наук.-прак. конф. ім. Л.В. Громашевського НАМН України. Київ, 2018. – С. 40-41.

92. Епідеміологічні аспекти внутрішньолікарняних інфекцій // Л. С. Некрасова, В. М. Свита, М. А. Ємець // Инфекционный контроль, 2010. – № 2. - С. 56.

93. Phua J, Ngerng WJ, See KC, et al. / Characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive severe sepsis // Crit. Care, 2013;17(5). – P. R202.

94. Vitkauskienė A., Skrodenienė E., Dambrauskienė A., Macas A., Sakalauskas R. / Pseudomonas aeruginosa bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality // Medicina (Kaunas), 2010; 46(7). – P. 490-495.

95. Custovic A., Smajlovic J., Hadzic S., Ahmetagic S., Tihic N., Hadzagic H. / Epidemiological surveillance of bacterial nosocomial infections in the surgical

intensivecare unit // *Materia socio-medica*, 2014; 26(1). – P. 7-11.

96. Kollef M.H. / Ventilator-associated tracheobronchitis and ventilator-associated pneumonia: truth vs myth // *Chest*. – 2013. – № 144(1). - P. 3-5.

97. Киреев С. С., Умарова Д. И. / Вентилятор-ассоциированная пневмония: диагностика, профилактика, лечение (литературный обзор). // *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание*, 2017; 2 (Публикация 8-4). URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2017-2/8-4.pdf>.

98. Bouglé A., Bombled C., Margetis D., Lebreton G., Vidal C., Coroir M., Hajage D., Amour J. / Ventilator-associated pneumonia in patients assisted by venoarterial extracorporeal membrane oxygenation support: Epidemiology and risk factors of treatment failure // *PLoS One*, April 13, 2018. – P. 1-12. - Режим доступа: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194976>.

99. Hospital-acquired pneumonia Guideline Committee of American Thoracic Society and Infection Disease Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired? Ventilator - associated and healthcare-associated pneumonia [Электронный ресурс] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2005. - Vol. 171. – P. 388-416. - Режим доступа до журналу : <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=206558>.

100. Alp E. Ventilator associated pneumonia and infection control [Электронный ресурс] / E. Alp, A. Voss // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. – 2006. - № 5(7). – P. 5-7. – Режим доступа до журналу: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/5/1/7>.

101. Мікробіологічне обґрунтування розробки антимікробних матеріалів на основі декаметоксину, мірамістину та хлоргексидину : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Олександр Адамович Назарчук, ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України". – Харків : [б.в.], 2013. – 24 с.

102. До характеристики сучасних інфекційних ускладнень у хворих з опіками / Назарчук О. А., Нагайчук В. І., Палій І. Г., Буркот В. М., Гончар О. О. // *Український медичний часопис*. – 2014. – № 5 (103). – С. 123 – 126.

103. Етіологічна структура, властивості збудників ускладнень у хворих з

опіками / О. А. Назарчук, В. І. Нагайчук, В. Г. Палій // Профілактична медицина. – 2016. – № 1–2 (26). – С. 68 – 72.

104. Cherniakova G. M., Minukhin V. V., Minukhin D. V. / The role of *P. aeruginosa* in the etiological structure of infected wounds in burn patients. abstr. 58th // Annual Meeting of the Austrian Society of Surgery (Vienna, June 28-30, 2017). Vienna. 2017. – P. 106.

105. Andrea C. Issler-Fisher, Richard MFakin, Oliver MFisher, Genevieve McKew, Ann-Kathrin Rauch, Thomas Gottlieb, Peter Haertsch, Merlin Guggenheim, Pietro Giovanoli, Peter K.M. Maitz // Microbiological findings in burn patients treated in a general versus a designated intensive care unit: Effect on length of stay, 2016. *Burns*, Vol. 42, № 8. - P. 1805-1818. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.06.019>.

106. Воробьева О. Н., Денисенко Л. И., Штанова Т. Н., Соседова Л. М. / Микробиологический мониторинг возбудителей внутрибольничных инфекций в отделении экстренной хирургии // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2009, № 4 (68). – С. 61-67.

107. Жилина С. В., Миронов А. Ю., Поликарпова С. В. / Ацинетобактерии при инфекциях кожи и мягких тканей // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2007, № 4. – С. 45-56.

108. Ковальчук В. П., Кондратюк В. М., Прокопчук З. М., Буркот В. М. / Плівкоутворення акінетобактерій в присутності антибіотиків // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» 29 січня 2018 р. – Чернівці, 2018. – С. 95-96.

109. Nahaichuk V. I., Nazarchuk O. A., Osadchuk N. I., Palyi D. V., Nazarchuk H. H., Kcenig E., Sorokoumova L. K., Honchar O. O. / The research of the susceptibility to antimicrobial medicines of *Acinetobacter baumannii* as pathogens of infectious complications in patients with hard burns // Вісник ВНМУ, 2018, Т. 22, № 2. – С. 306-310.

110. Tomaras A. P., Dorsey C. W., Edelmann R. E., Actis L. A. / Attach-

ment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system // *Microbiol*, 2003; 149. – P. 3473–3484.

111. Smani Y., Mc Connell M. J., Pachon J. / Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells // *PLoS One*, 2012; 7 (4). – P. 1-7. – Режим доступу до журналу: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0033073&type=printable>.

112. Cerqueira G. M., Peleg A. Y. / Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity // *IUBMB Life*, 2011; 63 (12). – P. 1055–1060.

113. Mihara K., Tanabe T., Yamakawa Y., Funahashi T., Nakao H., Narimatsu S., Yamamoto S. / Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T // *Microbiol.*, 2004; 150. – P. 2587–2597.

114. Bergogne-Berezin E., Friedman H., Bendinelli M. / *Acinetobacter: Biology and Pathogenesis* // New York: Springer., 2008, 229 p.

115. King L. B., Pangburn M. K., Mc Daniel L. S. / Serine protease PKF of *Acinetobacter baumannii* results in serum resistance and suppression of biofilm formation. // *J. Infect. Dis.* 2013; 207 (7). – P. 1128–1134.

116. Kwon S. O., Ghoo Y. S., Lee J. C., Kim S. I. / Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate // *FEMS Microbiol. Lett.* 2009; 297 (2). – P. 150–156.

117. Чеботарь И. В., Лазарева А. В., Масалов Я. К., Михайлович В. М., Маянский Н. А. / *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства // *Вестник РАМН*, 2014. - № 9-10. - С. 39-50.

118. Kovalchuk V., Kondratiuk V., Patrick Mc Gann, Kovalenko I., Erik Snestrud / The epidemiology and antibiotic resistance in *A. baumannii* isolates from military health care facilities // *Вісник ВНМУ*, 2018, Т. 22, № 2. – С. 248-252.

119. Microflora of combat wounds at modern military conflicts / V. P. Kovalchuk, V. M. Kondratiuk, I. M. Vovk, N. S. Fomina. *Význam*

interdisciplinárneho pristupu v prevencii chorôb III. Budapest, Expharma. 2019. – P. 27–45.

120. Chen C. H., Wu S. S., Huang C. C. / Two case reports of gastroendoscopy associated *Acinetobacter baumannii* bacteremia // *World J. Gastroenterol.* 2013; 19 (18). – P. 2835–2840.

121. Мартынович А. А. / Динамика антибиотикорезистентности инфекций, вызванных *Acinetobacter spp.* в России // «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия». – 2010. – № 2, Т. 12. – С. 236–239.

122. Кондратюк В. М., Ковальчук В. П., Кондратюк О. П. / Епідеміологічні особливості розповсюдження мікрофлори бойових поранень у сучасній системі лікування поранених, встановлені методи мультилокусного сіквенс типування // Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека: мат. наук.-прак. конф. ім. Л. В. Громашевського НАМН України. Київ, 2018. – С. 85-87.

123. Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В. / Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacterbaumanniiv* стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования // «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия». – 2014. – № 16, Т. 4. – С. 266-272.

124. Фоміна Н. С., Вовк І. М., Прокопчук З. М. / Ефективність використання антибіотиків у випадку вентилятор-асоційованих пневмоній новонароджених // І Міжнародний конгрес «Раціональне використання антибіотиків», 15-16 листопада 2018. – Україна. Київ, 2018. – С. 1-2.

125. Гриценко Л. З., Колоколова Е. В., Колесникова А. Г., Мишин В. В., Ананьева М. Н. / Роль ацинетобактерий в возникновении проблемных инфекций // Медико-соціальні проблеми сім'ї, ISSN 1608-876X, Том 19, № 1, 2014. - С. 122-127.

126. Adibhesami H, Douraghi M, Zeraati H, Bazmi F, Rahbar M, Pourmand MR et al. / Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) recovered from burn patients // *J. Pharm. Sci.* 2016; 19 (3). – P. 339348.

127. Воробьева О. Н., Денисенко Л. И., Жилина Н. М. / Этиология гнойно-септических процессов у ожоговых больных // Бюллетень СО РАМН. 2010; 6. – Р. 5763.
128. Шмакова М. А., Штернис Т. А., Желнина Т. П., Брусина Е. Б. / Распространенность бактерий рода *Acinetobacter* в медицинских организациях Кемеровской области // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2018; 17(3). - С. 27-31.
129. Дослідження видового складу та властивостей збудників ранової інфекції у важкохворих з опіками / О. А. Назарчук, В. І. Нагайчук, Палій В. Г., Макац Є. Ф. // Матеріали 11-ої науково-практичної щорічної конференції з міжнародною участю приуроченої до дня науки «Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу»: тези доп. 15-16 травня 2014. – Львів, 2014. – С. 69 – 72.
130. Водяник А. А. / Механізми розвитку та шляхи подолання стійкості до протимікробних речовин у бактеріальних біоплівках // Міжнародний журнал педіатрії, акушерства та гінекології, 2018. - Т. 12, №2. – С. 18-22.
131. Мокієнко А. В. / Біоплівки шпитальних екосистем: від антагонізму до синергізму // Вісник НАН України, 2014, № 7. - С. 34-44.
132. Галкін М. Б., Іваниця В. О. / Синтез піоціаніну *Pseudomonasaeruginosa* за впливу вісмутових металокомплексів порфіринів та ауто індукторів системи Quorum sensing // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 1(21). – С. 29–33.
133. Недашківська В. В., Дронова М. Л., Вринчану Н. О. / Біоплівки та їх роль в інфекційних захворюваннях // Український науково-медичний молодіжний журнал, 2016, № 4 (98). - С.10-19.
134. Балко О. І., Зелена Л. Б., Хархота М. А., Балко О. Б., Авдеєва / Система Quorum Sensing у регуляції бактеріоциногенії *P. aeruginosa* // Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека: мат. наук.-прак. конф. ім. Л.В. Громашевського НАМН України. Київ, 2018. – С. 26-28.
135. Є. С. Воробей, О. С. Воронкова, А. І. Вінніков / Бактеріальні біоплівки.



QuorumSensing – «відчуття кворуму» у бактерій в біоплівках. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2012. – Вип. 20, Т. 1. – С. 13–22.

136. Хмель И. А., Метлицкая А. З. / Quorum Sensing регуляція експресии генів – перспективна мишень для создания лекарств против патогенности бактерий // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40. – С. 195–210.

137. The multiplesignaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa* / P. Nadal Jimenez, G. Koch, J. A. Thompson et al. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2012. – Vol. 76, № 1. – P. 46–65.

138. Галкін М. Б., Семенець А. С., Фіногенова М. О., Галкін Б. М., Філіпова Т. О. / Утворення біоплівки та рухливість бактерій *Pseudomonasaeruginosa* з різними рівнями вмісту циклічного дигуанозинмонофосфату // Мікробіологія і біотехнологія, 2017. - № 2. - С 40–50.

139. Нечипоренко Н. М. / Мікробні біоплівки в патогенезі резистентності та хронізації інфекцій уrogenітального тракту // Дерматовенерологія. Косметологія. Сексопатологія, 2016. – № 1-2(3). – С. 43-52.

140. Кіцера ОЛ.ОМ, Кіцера ОЛ.ОЛ. / Бактерійні біоплівки в оториноларингології (огляд літератури) // Журнал вушних, носових і горлових хвороб, 2011, № 4. - С. 75-81.

141. Окулич В. К., Плотников Ф. В., Кабанов А. А. / Роль микробных биопенок в патогенезе инфекционных процессов на современном этапе. Иммунология, аллергология, инфектология, 2012. - № 4. – С. 70–82.

142. Маянский А. Н., Чеботарь И. В., Руднева Е. И. [и др.] / *Pseudomonas aeruginosa*: характеристика биопленочного процесса // Молекулярная генетика, микробиология, и вирусология. - 2012. - Т. 27, № 1. - С. 3-6.

143. Назарчук О. А., Нагайчук В. І., Римша О. В., Палій В. Г., Вовк І. М., Бобир Н. А., Прокопчук З. М., Стукан О. К. / Дослідження протимікробної ефективності композиції з пролонгованою антисептичною дією щодо планктонної та плівкової форми клінічних штамів неферментуючих грамнегативних бактерій // Вісник ВНМУ, 2020, Т. 24, № 1. – С. 64-68.

144. Сідашенко О. І., Воронкова О. С., Сірокваша О. А., Вінніков А. І. / Біоплівка як особлива форма організації бактерій та її роль в інфекційних процесах // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип. 3, Том. 2. – С. 36-41.

145. Оксененко Ю. Р., Кочнева О. В. / Біоплівки мікроорганізмів та їх роль у розвитку гнійно-запальних захворювань // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченої 90-річчю А. Я. Циганенко «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», 24-26 червня 2019 року, Харків. – С. 68-71.

146. Галкін М. Б., Іваниця В. О., Галкін Б. М., Філіпова Т. О. / Матрикс біоплівки – хімічний склад, структура, властивості // Мікробіологія і біотехнологія. – 2016. - №4. - С. 6-27.

147. Мішина М. М., Марченко І. А., Маланчук С. Г., Макєєва Н. І., Головачова В. О., Мозгова Ю. А., Мішин Ю. М. / Формування біоплівок грамнегативними бактеріями, збудниками пієлонефритів у дітей // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченої 90-річчю А. Я. Циганенко «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», 24-26 червня 2019 року, Харків. – С. 64-65.

148. Byrd M. S. Sadovskaya I., Vinogradov E., Lu H. / Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production // Mol. Microbiol. – 2009. – V. 73. – P. 622–638.

149. Hans-Curt Flemming, Jost Wingender / The biofilm matrix // Nat. rev. microbial. – 2010. – V. 8. – P. 623–633.

150. Широбоков В. П., Майданник В. Г., Мітюряєва І. О., Понятовський В. А., Гнилокурченко Г. В., Водяник А. А. / Сучасні уявлення про значення біоплівок у розвитку інфекцій сечових шляхів у дітей // Міжнародний журнал педіатрії, акушерства та гінекології, березень-квітень 2016, Т. 9, № 2. – С. 13-18.

151. Добрик О. О., Секунда М. О., Деркач І. М., Горгота І. М., Халанія М.

Є., Добрик Д. С. / Сучасні підходи до лікування інфекції сечових шляхів у дітей з урахуванням утворення бактеріальних біоплівки // Здоров'я дитини, 2017, Т. 12, № 4. - С. 27-37.

152. Цимбаліста О. Л. Проблема резистентності мікроорганізмів до антибіотиків (лекція) / О. Л. Цимбаліста // Современная педиатрия. - 2017. - № 2. - С. 52-57. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Sped\\_2017\\_2\\_10](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Sped_2017_2_10).)

153. Покас О. В., Лоскутова М. М., Поліщук О. І., Яновська В. В. / Поширення штамів продуцентів метало-бета-лактамаз серед множиннорезистентних до антибіотиків грамнегативних неферментуючих бактерій // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. - 2013. - Т. 8, № 2. - С. 150-154. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ujkl\\_2013\\_8\\_2\\_39](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ujkl_2013_8_2_39).

154. Покришко О. В., Красій Н. І. / Аналіз даних мікробіологічного моніторингу щодо формування резистентності бактерій до антибіотиків // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченої 90-річчю А. Я. Циганенко «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології» (24-26 червня 2019 року, Харків). – С. 80-81.

155. Превар А. П., Крижановська А. В., Радіонов В. О., Мруг В. М. / Аналіз моніторингового дослідження антибіотикорезистентності збудників гнійно-запальних процесів м'яких тканин // Вісник ВНМУ, 2018, Т. 22, № 2. – С. 285-288.

156. Самарін Д. В., Юхименко О. О. / Антибіотикорезистентність у хірургії: механізми формування та підходи до визначення // Хірургія дитячого віку. -№ 2. – 2012. - С. 79-83.

157. Попов М. М., Перетятко О. Г., Ягнюк Ю. А. / Антибіотикорезистентність бактерій: причини, механізми розвитку, наслідки // Південноукраїнський медичний науковий журнал. - 2018, № 20. - С. 55-58.

158. Бондар М. В., Пилипенко М. М., Свінтуковський М. Ю., Харченко Л. А., Превисла О. М., Цвих І. М. / Антибіотикорезистентність мікроорганізмів: механізми розвитку і шляхи подолання // Медицина неотложных состояний, 2016, № 3(74). - С. 11-17.

159. Деркач С. А., Куцай Н. М., Габишева Л. С. / Антибіотикорезистентність нозокоміальних та позалікарняних штамів *P. aeruginosa*, вилучених із різних біотопів хворих // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченої 90-річчю А. Я. Циганенко «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», 24-26 червня 2019 року, Харків. – С. 25-27.

160. Марієвський В. Ф., Толстанов О. К., Бойко В. В., Салманов А. Г., Іоффе І. В., Тарабан І. А. / Проблема антибіотикорезистентності у хірургії. Чи є вихід? // Науковий журнал МОЗ України, 2012, № 1(1). – С. 100-113.

161. Виноградова К. А., Булгакова В. Г., Полин В. Н., Кожевин П. А. / Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистенция ее объём, разнообразие и развитие // Антибиотики и химиотерапия. - 2013. - Т. 58, № 5-6. - С. 38-50.

162. Дуда О. К., Горбаль Н. Б., Масалітіна О. В. / Роль бета-лактамаз у формуванні антибіотикорезистентності // Ліки України, 2015, № 5 (191). - С. 4-8.

163. Коцюба К. Р., Воронкова О. С., Вінніков А. І., Шевченко Т. М. / Механізми стійкості до антибіотиківпредставників родини *Enterobacteriaceae* // Вісник Дніпропетровського університету. Серія : Біологія. Медицина. - 2014. - Вип. 5(1). - С. 33-38. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/vdubm\\_2014\\_5\(1\)\\_9](http://nbuv.gov.ua/UJRN/vdubm_2014_5(1)_9).

164. Ковальчук В. П., Кондратюк В. М., Кондратюк О. П. / Генетичні маркери антибіотикорезистентності грампозитивних бактерій, що спричиняють інфекційні ускладнення бойових поранень // I Міжнародний конгрес «Рациональне використання антибіотиків». 15-16 листопада 2018. Україна. Київ, 2018. – С. 18-20.

165. Чуловська У. Б., Толох О. С. / Правильні рішення у застосуванні антибактеріальної терапії загострень хронічного обструктивного захворювання легень // Український пульмонологічний журнал. - 2011. - № 2. - С. 55-59.

166. Яковлев С. В. / Рациональная антимикробная терапия [Электронный ресурс] : руководство для практикующих врачей / под ред. С. В. Яковлева. - 2-е изд., перераб. и доп. - М. : Литтерра, 2015. - 1040 с. (Серия "Рациональная

фармакотерапия".) - ISBN 978-5-4235-0171-6 - Режим доступа: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785423501716.html>.

167. Фещенко Ю. І., Гуменюк М. І., Денисов О. С. / Антибіотикорезистентність мікроорганізмів. Стан та шляхи їх вирішення // Український хімотерапевтичний журнал. - 2010. - № 1-2. - С. 4-8.

168. Березин А. Г., Ромашов О. М., Яковлев С. В., Сидоренко С. В. / Характеристика и клиническое значение бета-лактамаз расширенного спектра // Антибиотики и химиотерапия. - 2003. - Т. 48, № 7. - С. 5-11.

169. Gutierrez A., Zaureti Z., Crussand S. [et al.] /  $\beta$ -lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity // Nature Communications. - 2013. - № 4. - P. 1610-1623. - Режим доступа: <https://doi.org/10.1038/ncomms2607>).

170. Митрофанов В. Н., Гординская Н. А., Сабирова Е. В., Абрамова Н. В., Карасева Г. Н. / Значение микробиологического мониторинга и определения молекулярно-генетических характеристик госпитальной микрофлоры в отделении гнойной остеологии // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. - 2016. - Т. 24.- №3. - С. 44-52.

171. Нестерук К. М., Соколова І. Є., Братусь О. В. / Розповсюдженість карбапенемрезистентних штамів *Pseudomonas aeruginosa* – продуцентів метало- $\beta$ -лактамаз // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина, 2011. – Вип. 2, Т. 1. – С. 95–100.

172. Бильченко А. В., Чуб О. И. / Плазмид-индуцированная резистентность возбудителей инфекций мочевой системы // Український журнал нефрології та діалізу. - № 2 (42). – 2014. – С. 45-50.

173. Эйдельштейн М. В., Склеенова Е. Ю., Шевченко О. В., Тапальский Д. В., Азизов И. С., Д'соуза Дж. В., Тимохова А. В., Сухорукова М. В., Козырева В. К., Сафронова Е. В., Астахова М. В., Карпов И. А., Шамаева С. Х., Абрамова Н. В., Гординская Н. А., Козлов Р. С., исследовательская группа «МЕТАЛЛ»\* / Распространенность и молекулярная эпидемиология грамотрицательных бактерий, продуцирующих метало- $\beta$ -лактамазы, в России,

Беларуси и Казахстане // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. - 2012, Т. 14, № 2. – С. 132-152.

174. Салманов А. Г., Вернер О. М. / Антибіотикорезистентність нозокоміальних штамів *Pseudomonas aeruginosa* в хірургічних стаціонарах України: результати багатоцентрового дослідження (2011-2015 рр.) // Міжнародний журнал антибіотики та пробіотики, 2017, № 1 (1). - С. 49-63.

175. Осипов В. А., Тапальский Д. В., Склеенова Е. Ю., Романов А. В., Жаворонок С. В. / Клональное распространение штаммов *Pseudomonas aeruginosa* – продуцентов метало-бета-лактамаз на территории Беларуси // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2012, № 4. – С. 92-97.

176. Бондар М. В., Пилипенко М. М., Свінтуковський М. Ю., Харченко Л. А., Превисла О. М., Цвих І. М. / Антибіотикорезистентність мікроорганізмів: механізми розвитку і шляхи подолання // Медицина неотложных состояний, 2016, № 3(74). - С. 11-17.

177. Волянский Ю. Л., Колотова Т. Ю., Кучма И. Ю. / Механизмы изменения генома прокариот [и др.] - Харьков: НТМТ, 2012. - 320 с.

178. High throughput screening for RecA inhibitors using a transcreener adenosine 5'-0-diphosphate assay / E. J. Reterson, W. P. Zanzen, D. Kireev, S. F Singleton // Assay Drug. Dev. Technol. - 2012. - № 10. - P. 260-268. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.0409>; PMID:22192312 PMCID:PMC3374383).

179. Березняков И. Г. / Клиническое значение выработки  $\beta$ -лактамаз и подходы к решению проблемы // Болезни и антибиотики. – 2012. – № 1. – С. 31–46.

180. Агеевец В. А., Партина И. В., Лисицына Е. С. та ін. / Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. – № 3. – С. 10–13.

181. Рижкова Т. А. / Проблема антибіотикорезистентності грамнегативних бактерій // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. - 2012, Т. 7, № 3. - С. 11-18.

182. Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В., Склеенова Е. Ю., Иванчик Н.

В., Шек Е. А., Дехнич А. В., Козлов Р. С. и исследовательская группа МАРАФОН / Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФО 2013-2014 // КМАХ, 2017. – Т. 19. - № 1. - С. 42-48.

183. Мікробіологічне обґрунтування деяких способів профілактики гнійно-запальних ускладнень, пов'язаних з використанням катетерів : автореф. дис ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Вячеслав Миколайович Кондратюк; В.о. АМН України. Ін-т мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова.– Харків : [б.в.], 2009.– 17 с.

184. Дронова М. Л., Вринчану Н. О., Дудікова Д. М. / Нові антибіотики хінолонового ряду: перспективи застосування в клінічній практиці / Фармакологія та лікарська токсикологія. - № 1 (42). - 2015. – С. 3-12.

185. Резников А. П., Шевчук Т. В. / Динаміка антибіотикорезистентності мікроорганізмів за п'ятирічний період // Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека: мат. наук.-прак. конф. ім. Л. В. Громашевського НАМН України. Київ, 2018. – С. 150-152.

186. Мальцев С. В., Мансурова Г. Ш. Что такое биопленка? // Medical Nature. - 2013. - № 1. - С. 86-89.

187. Нечипоренко Н. М. / Мікробні біоплівки в патогенезі резистентності та хронізації інфекцій уrogenітального тракту // Дерматовенерологія. Косметологія. Сексопатологія, 2016, № 1-2(3). - С. 43-52.

188. Ковальчук В. П., Буркот В. М., Сідько І. Ю., Трофіменко Ю. Ю. / Вплив чинників оточуючого середовища на плівкоутворюючу активність бактерій // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченої 90-річчю А. Я. Циганенко «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології» (24-26 червня 2019 року, Харків). – С. 40-42.

189. Недашківська В. В., Дронова М. Л., Вринчану Н. О. / Біоплівки та їх роль в інфекційних захворюваннях // Український науково-медичний молодіжний журнал, 2016, № 4 (98). - С.10-19.

190. Деркач С. А., Городницька Н. І., Куцай Н. М., Габишева Л. С.,

Коцар О. В. / Антибіотикорезистентність та фагочутливість регіональних штамів-збудників гнійно-запальних захворювань (*S. aureus* та *P. aeruginosa*) // Вісник ВНМУ, 2020, Т. 24, № 1. – С. 6-11.

191. Попов М. М., Перетятко О. Г., Ягнюк Ю. А. / Антибіотикорезистентність бактерій: причини, механізми розвитку, наслідки // Південноукраїнський медичний науковий журнал, 2018, № 20. - С. 55-58.

192. Бактеріологічний контроль поживних середовищ : інформаційний лист МОЗ України № 05.4.1/1670. – Київ, 2000.

193. Review of sequencing platforms and their applications in pheochromocytoma and paragangliomas / Suja Pillai, Vinod Gopalan, Alfred King-Yin Lam // Critical Reviews in Oncology Hematology, (2017), 116. – P. 58–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.05.005>.

194. Назарчук О. А. / Характеристика етіологічної структури та генотипово детермінованої фенотипової резистентності до карбапенемів провідних збудників інфекційних ускладнень у хворих із критичними станами // Запорозький медичний журнал, 2018, Т. 20, № 3(108). - С. 344–348.

195. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices / G. D. Christensen, W. A. Simpson, J. J. Younger [et al.] // J Clin Microbiol. – 1985. – Vol. 22 (6). – P. 996–1006.

196. Чеботарь И. В. Биопленки *Staphylococcus aureus*: структурно-функциональные характеристики и взаимоотношения с нейтрофилами: дисс. ...доктора мед. наук : 03.02.03 / И. В. Чеботарь. – Нижний Новгород, 2014. – 239 с.

197. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci / S. Stepanovic, G.D. Bonaventura, D. Vukovic, et al. // APMIS. – 2007. – Vol.9. – P. 891–899.

198. Lakade L. S. Comparison of antimicrobial efficacy of chlorhexidine and combination mouth rinse in reducing the Mutans streptococcus count in plaque / L. S. Lakade, P. Shah, D. Shirol // J Indian Soc Pedod Prev Dent. – 2014. – Vol. 32 (2).



– Р. 91–96.

199. И. В. Чеботарь, О. А. Крыжановская, Н. М. Алябьева, Т. А. Савинова, Ю. А. Бочарова, А. В. Лазарева, С. В. Поликарпова, О. В. Карасева, Н. А. Маянский / Генотипы иносительство генов бета-лактамаз у карбапенеморезистентных штаммов *Acinetobacterbaumannii*, выделенных в г. Москве // Антибиотики и химиотерапия, 2017, 62; 11-12. – С. 29-34.

200. Антибиотикорезистентность: роль карбапенемаз / Лазарева И. В., Агеевец В. А., Сидоренко С. В. // Медицина экстремальных ситуаций 2018, 20(3). - С. 320-328.

201. Антибіотикорезистентність умовно-патогенних мікроорганізмів: актуальність, умови виникнення, шляхи подолання / Л. Б. Романюк, Н. Я. Кравець, С. І. Климнюк, В. С. Копча, О. Й. Дронова // Інфекційні хвороби, 4 (98) 2019. - С. 63-71.

202. Ngo Q.D., Vickery K. And Deva A.K: The effect of topical negativ epressure on wound biofilm susingan in vitro wound model. Wound Repair Regen 20: 83 90, 2012.

203. Гейдеріх, Ольга Григорівна. Піоціанін як антибактеріальний та імуногенний субстрат синьогнійної палички: Автореф. дис. канд. мед. наук : 03.00.07 / Ольга Григорівна Гейдеріх; В.о. АМН України. Наук.-дослід. ін-т мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова. – Харків : Штрих, 2002.– 20 с.

204. Rollet, C.; Gal, L.; Guzzo, J. Biofilm-detached cells, a transition from sessile to planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 2009, 290, 135–142.

205. Crespo, A.; Blanco-Cabra, N.; Torrents, E. Aerobic Vitamin B12 Biosynthesis Is Essential for *Pseudomonas aeruginosa* Class II Ribonucleotide Reductase Activity During Planktonic and Biofilm Growth. Front. Microbiol. 2018, 9, 986.

206. Koo, H.; Yamada, K.M. Dynamic cell-matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3D microenvironments. Curr. Opin. Cell Biol. 2016, 42, 102–112.

207. Белокопытова Е. Ю., Федосеев В. И., Плешков В. А. Лечение острого воспаления наружного и среднего уха. Вестник оториноларингологии. 2014; (3): 54-

58.

208. Гуров А.В., Юшкина М.А. Особенности клинического течения и этиотропной терапии наружного отита Регулярные выпуски «РМЖ» №21 от 09.12.2016. – С. 1426-1431.  
[https://www.rmj.ru/articles/otorinolaringologiya/Osobennosti\\_klinicheskogo\\_techeniya\\_i\\_etiotropnoy\\_terapii\\_narughnogo\\_otita/#ixzz70UqlyQvN](https://www.rmj.ru/articles/otorinolaringologiya/Osobennosti_klinicheskogo_techeniya_i_etiotropnoy_terapii_narughnogo_otita/#ixzz70UqlyQvN)

## ДОДАТКИ

Додаток А

### НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Протимікробна дія антисептичних препаратів, антибіотиків на збудники запальних захворювань / В. Г. Палій, В. В. Сухляк, Д. В. Палій, О. О. Гончар, А. В. Крижановська, Б. М. Береза, В. М. Буркот, П. О. Кравчук, Н. В. Задерей // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. – 2014. – № 22. – С. 44-47.

2. Вивчення властивостей мікрофлори опікової поверхні у пацієнтів з опіками / В. І. Нагайчук, О. А. Назарчук, В. Г. Палій, Є. Ф. Мацац, В. М. Буркот // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. – Вінниця, 2014. – № 22. – С. 194-199.

3. До характеристики сучасних інфекційних ускладнень у хворих з опіками / В. І. Нагайчук, О. А. Назарчук, І. Г. Палій, В. М. Буркот, О. О. Гончар // *Український медичний часопис*. – № 5 (103). - 2014. – С. 123-126.

4. Оцінка антибактеріальних та протигрибкових властивостей сучасних антисептиків / Г. К. Палій, О. А. Назарчук, В. В. Бобир, О. О. Гончар, Т. Л. Гридін, Д. В. Палій, І. В. Коваленко, В. М. Буркот // *Мікробіологія і біотехнологія*. – Одеса, 2015. – № 4(32). – С. 67-74

5. Дослідження дії декаметоксину та його лікарських форм на адгезію бактерій / О. О. Гончар, О. А. Назарчук, Д. В. Палій, І. В. Коваленко, О. В. Яцула, В. М. Буркот // *Світ медицини та біології*. – № 4(54). – Полтава, 2015. – С. 109-112.

6. Динаміка утворення біоплівки на поверхні ендотрахеальних інтубаційних трубок *Pseudomonasaeruginosa* та *Acinetobacterbaumannii* / Ю. Ю. Трофіменко, В. М. Буркот, Є. Ф. Мацац // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. – Вінниця, 2016. – № 26. – С. 23-26.

7. Аналітичне прогнозування чутливості до фторхінолонів *Pseudomonasaeruginosa*, збудників інфекційних ускладнень / О. А. Назарчук, Д. В.

Палій, Н. І. Осадчук, І. В. Коваленко, В. М. Буркот // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 1. - Т. 2 (127). – С. 105-109.

8. Ефективність антибактеріальної дії антибіотиків, антисептика декаметоксину та псевдомонадного бактеріофагу на клінічні штами *Pseudomonas aeruginosa* / Г. К. Палій, І. М. Вовк, І. М. Коваленко, О. А. Назарчук, В. М. Буркот // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2016. – № 1, Ч. 1, Т. (20). – С. 16-21.

9. Біологічні властивості збудників ускладнень у хворих з опіками / В. М. Буркот // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 2, Том 3 (130). – С. 210-213.

10. Особливості формування резистентності до антибіотиків у грамнегативних неферментуючих бактерій / В. М. Кондратюк, З. М. Прокопчук, В. М. Буркот, І. М. Вовк // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 253-256.

11. Чутливість біоплівкових та планктонних форм неферментуючих бактерій до дії антисептиків / Ю. Ю. Трофіменко, Є. Ф. Макац, О. К. Стукан, В. М. Буркот // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 293-296.

12. Фенотипові і генотипові детермінанти антибіотикорезистентності грамнегативних бактерій – етіологічних чинників інфекційних ускладнень бойових ран / В. П. Ковальчук, В. М. Кондратюк, І. М. Коваленко, В. М. Буркот // Мікробіологічний журнал, 2019. - Т. 81. - № 1. – С. 61-71.

13. Дослідження ефективності використання антисептичних композицій на основі декаметоксину для обробки ендотрахеальних трубок з метою попередження розвитку вентилятор-асоційованої пневмонії у пацієнтів відділення інтенсивної терапії / Ю. Ю. Трофіменко, О. І. Жорняк, Н. С. Фоміна, В. М. Буркот, А. В. Кулик, П. В. Жорняк // Вісник ВНМУ, 2020. - Т. 24. - № 1. – С. 17-19.

14. Мікробіологічне обґрунтування антимікробного лікування експериментального псевдомонадного кератиту / І. М. Вовк, Н. В. Кривецька,

В. М. Буркот, А. О. Дудар, А. В. Кулик // Вісник ВНМУ, 2020. - Т. 24. - № 1. – С. 114-117.

15. Biofilm forming activity of non-fermenting gram-negative bacteria / Valentyn P. Kovalchuk, Oleksandr A. Nazarchuk, Vita M. Burkot, Nadiia S. Fomina, Zoia M. Prokopchuk, Oleksandr Dobrovanov // Wiadomości Lekarskie, Volume LXXIV, Issue 2, February 2021. – P. 252-256.

### **НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ**

16. Характеристика мікробіоценозу ран у хворих з опіками / В. І. Нагайчук, О. А. Назарчук, В. Г. Палій, Є. Ф. Макац, В. М. Буркот // Довкілля і здоров'я: мат. наук.-практ. конф., 25 квітня 2014 р. – Тернопіль, 2014. – С. 93-95.

17. Дослідження ефективності антисептичних засобів щодо збудників інфекційних ускладнень в хворих з критичними станами / О. А. Назарчук, Д. В. Палій, В. М. Буркот // Матеріали XIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених “Перший крок в науку-2016”. - 7-8 квітня 2016. - Вінниця. – С. 44.

18. The research of the qualities in non – enzymatic bacteria, isolated from patients with infectious complications / О. А. Nazarchuk, V. I. Nahaichuk, Yu. J. Saldan, I. V. Kovalenko, V. M. Burkot // II International Scientific Conference Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21<sup>st</sup> century. - April 14 – 15, 2016, Kyiv. - P. 79 – 80.

19. Чутливість до антибіотиків грамнегативних неферментуючих бактерій, які спричиняють розвиток вентилятор-асоційованої пневмонії / Ю. Ю. Трофіменко, В. М. Буркот // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» 29 січня 2018 р. – Чернівці, 2018. – С. 54-55.

20. Плівкоутворення акінетобактерій в присутності антибіотиків / В. П. Ковальчук, В. М. Кондратюк, З. М. Прокопчук, В. М. Буркот //

Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» 29 січня 2018 р. – Чернівці, 2018. – С. 95-96.

21. Characteristics of adaptive properties of nonfermenting bacteria / V. P. Kovalchuk, Z. M. Prokopchuk, V. M. Burkot // III International Scientific Conference «Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21<sup>st</sup> century». Abstractsbook. April 19-20, 2018, Kyiv. – P. 60-61.

22. Швидкість формування антибіотикорезистентності грамнегативними неферментуючими бактеріями / В. М. Буркот, Н. С. Фоміна, О. А. Назарчук, Ю. Ю. Трофіменко // Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека: конференція присвяченої пам'яті академіка Л. В. Громашевського та 25-річчю Національної академії медичних наук України, 11-12 жовтня 2018 р., м. Київ. – С. 40-41.

23. Вплив чинників оточуючого середовища на плівкоутворюючу активність бактерій / В. П. Ковальчук, В. М. Буркот, І. Ю. Сідько, Ю. Ю. Трофіменко // Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю присвячена 90-річчю А. Я. Циганенка «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології» (Харків, 2019). – С. 40-42.

24. Порівняльне вивчення антимікробної активності сучасних дезінфектантів / В. П. Ковальчук, З. М. Прокопчук, І. М. Вовк, Н. С. Фоміна, І. М. Коваленко, В. М. Буркот // Науково-практична конференція «Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського», 12 лютого 2020 року, м. Харків. – С. 62-63.

25. Антибіотикорезистентність клінічних штамів грамнегативних неферментуючих бактерій / Буркот В. М., Багнюк Н. А., Левченко Б. І., Грицун Я. П. // Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині», 26 березня 2021 року, Харків, 2021. – С. 57-59.

**ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. XIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2016» (Вінниця, 7-8 квітня 2016). – усна доповідь, публікація тез.

2. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання стратегії, тактики застосування та дослідження антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів присвяченої 150-річчю з дня народження Д. К. Заболотного» (Вінниця, 15-16 вересня 2016 р.) – усна доповідь, публікація статті.

3. Науково-практична конференція «Довкілля і здоров'я» (Тернопіль, 27-28 квітня 2017 р.). – публікація тез.

4. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності», присвяченої 50-річчю професійної діяльності професора І. Й. Сидорчука (Чернівці, 29 січня 2018 р.). – публікація тез.

5. Науково-практична конференція «Довкілля і здоров'я» (Тернопіль, 27–28 квітня 2018 р.). – публікація тез.

6. III International Scientific Conference «Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21<sup>st</sup> century». Abstracts book. (Kyiv, 19-20 April, 2018). – усна доповідь, публікація тез.

7. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання стратегії, тактики застосування антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів» (Вінниця, 20-21 вересня 2018 р.). – усна доповідь, публікація статті.

8. Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека: конференція присвяченої пам'яті академіка Л. В. Громашевського та 25-річчю Національної академії медичних наук України. (Київ, 11-12 жовтня 2018 р.). – усна доповідь, публікація тез.

9. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», присвяченої 90-річчю

акад. А.Я. Циганенка (Харків, 24-26 червня 2019 р.). – публікація тез.

10. Науково-практична конференція «Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського» (Харків, 12 лютого 2020 року). – публікація тез.

11. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання стратегії, тактики застосування антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів», присвячена пам'яті Заслуженого діяча науки і техніки України, доктора мед.наук, професора Палія Г.К. (Вінниця, 24-25 вересня 2020 р. ) - усна доповідь, публікація статті.

12. Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині», (Харків, 26 березня 2021 року). – усна (онлайн) доповідь, публікація тез.





«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи  
Харківського національного  
медичного університету  
В.В.М'ясоєдов  
2021 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Назва пропозиції:** «Характеристика впливу чинників оточуючого середовища на біологічну активність грамнегативних неферментуючих бактерій».
- 2. Установа-розробник:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України; 21018 м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.
- 3. Розробник:** Буркот Віта Михайлівна.
- 4. Джерело інформації:**
1. Біологічні властивості збудників ускладнень у хворих з опіками / **В. М. Буркот** // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 2, Том 3 (130). – С. 210-213.
  2. Особливості формування резистентності до антибіотиків у грамнегативних неферментуючих бактерій / В. М. Кондратюк, З. М. Прокопчук, **В. М. Буркот**, І. М. Вовк // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 253-256.
  3. Чутливість біоплівкових та планктонних форм неферментуючих бактерій до дії антисептиків / Ю. Ю. Трофіменко, Є. Ф. Макац, О. К. Стукан, **В. М. Буркот** // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 293-296.
  4. Фенотипові і генотипові детермінанти антибіотикорезистентності грамнегативних бактерій – етіологічних чинників інфекційних ускладнень бойових ран / В. П. Ковальчук, В. М. Кондратюк, І. М. Коваленко, **В. М. Буркот** // Мікробіологічний журнал, 2019. - Т. 81. - № 1. – С. 61-71.
  5. Biofilm forming activity of non-fermenting gram-negative bacteria / Valentyn P. Kovalchuk, Oleksandr A. Nazarchuk, **Vita M. Burkot**, Nadiia S. Fomina, Zoia M. Prokopchuk, Oleksandr Dobrovanov // Wiadomości Lekarskie, Volume LXXIV, Issue 2, February 2021. – P. 252-256.
- 5. Впроваджено:** у навчальний процес на кафедрі мікробіології вірусології та імунології ім. проф. Д.П. Гриньова Харківського національного медичного університету МОЗ України (протокол засідання № 7 від 27.09.2021 р.).
- 6. Ефективність впровадження:** актуалізація, практичне використання знань, щодо антибіотикорезистентності, впливу фізичних і хімічних факторів на біологічні властивості грамнегативних неферментуючих бактерій, які мають медичне значення.

Відповідальний за впровадження:  
завідувачка кафедри мікробіології,  
вірусології та імунології  
ім. проф. Д.П. Гриньова  
Харківського національного  
медичного університету,  
д.мед.н., професор

М.М. Мішина



**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**

Проректор  
з наукової роботи

Дніпровського державного  
медичного університету

професор *О.О. Гудар'ян*

« 31 » травня 2021р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

### Результатів наукових досліджень

**1. Назва пропозиції:** «Характеристика впливу чинників оточуючого середовища на біологічну активність грамнегативних неферментуючих бактерій».

**2. Установа-розробник:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України; 21018 м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

**3. Розробник:** Буркот Віта Михайлівна.

**4. Джерело інформації:**

1. Біологічні властивості збудників ускладнень у хворих з опіками / **В. М. Буркот** // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 2, Том 3 (130). – С. 210-213.

2. Особливості формування резистентності до антибіотиків у грамнегативних неферментуючих бактерій / В. М. Кондратюк, З. М. Прокопчук, **В. М. Буркот**, І. М. Вовк // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 253-256.

3. Чутливість біоплівкових та планктонних форм неферментуючих бактерій до дії антисептиків / Ю. Ю. Трофіменко, Є. Ф. Мацац, О. К. Стукан, **В. М. Буркот** // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 293-296.

4. Фенотипові і генотипові детермінанти антибіотикорезистентності грамнегативних бактерій – етіологічних чинників інфекційних ускладнень бойових ран / В. П. Ковальчук, В. М. Кондратюк, І. М. Коваленко, **В. М. Буркот** // Мікробіологічний журнал, 2019. - Т. 81. - № 1. – С. 61-71.

5. Biofilm forming activity of non-fermenting gram-negative bacteria / Valentyn P. Kovalchuk, Oleksandr A. Nazarchuk, **Vita M. Burkot**, Nadiia S. Fomina, Zoia M. Prokopchuk, Oleksandr Dobrovanov // Wiadomości Lekarskie, Volume LXXIV, Issue 2, February 2021. – P. 252-256.

**5. Де впроваджено.** Впроваджено в навчальний процес на лекціях, практичних заняттях на кафедрі мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології Дніпровського державного медичного університету (протокол засідання № 13 від 28.05 2021 р.).

**6. Ефективність впровадження:** актуалізація, практичне використання знань, щодо антибіотикорезистентності, впливу фізичних і хімічних факторів на біологічні властивості грамнегативних неферментуючих бактерій, які мають медичне значення.

**Зауваження та пропозиції:** немає.

Голова комісії:

*Степанський Д.О.*  
проф. Степанський Д.О.

Члени комісії:

*Кременчуцький Г.М.*  
проф. Кременчуцький Г.М.

*Шарун О.В.*  
доц. Шарун О.В.

протокол № 13 від 28.05 2021 р.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи  
 Буковинського державного медичного університету МОЗ України  
 к.мед.н., доцент В. Геруш

« 2 » 2021 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**  
**результатів наукових досліджень**

**1. Назва пропозиції:** «Характеристика впливу чинників оточуючого середовища на біологічну активність грамнегативних неферментуючих бактерій».

**2. Установа-розробник:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України; 21018 м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

**3. Розробник:** Буркот Віта Михайлівна.

**4. Джерело інформації:**

1. Біологічні властивості збудників ускладнень у хворих з опіками / В. М. Буркот // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 2, Том 3 (130). – С. 210-213.

2. Особливості формування резистентності до антибіотиків у грамнегативних неферментуючих бактерій / В. М. Кондратюк, З. М. Прокопчук, В. М. Буркот, І. М. Вовк // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 253-256.

3. Чутливість біоплівкових та планктонних форм неферментуючих бактерій до дії антисептиків / Ю. Ю. Трофіменко, Є. Ф. Макац, О. К. Стукан, В. М. Буркот // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 293-296.

4. Фенотипові і генотипові детермінанти антибіотикорезистентності грамнегативних бактерій – етіологічних чинників інфекційних ускладнень бойових ран / В. П. Ковальчук, В. М. Кондратюк, І. М. Коваленко, В. М. Буркот // Мікробіологічний журнал. 2019. - Т. 81. - № 1. – С. 61-71.

5. Biofilm forming activity of non-fermenting gram-negative bacteria / Valentyn P. Kovalchuk, Oleksandr A. Nazarchuk, Vita M. Burkot, Nadiia S. Fomina, Zoia M. Prokopchuk, Oleksandr Dobrovanov // Wiadomości Lekarskie, Volume LXXIV, Issue 2, February 2021. – P. 252-256.

**5. Де впроваджено.** Впроваджено в навчальний процес на лекціях, практичних заняттях на кафедрі мікробіології та вірусології Буковинського державного медичного університету (протокол засідання № 42 від 7 червня 2021 р.).

**6. Ефективність впровадження:** актуалізація, практичне використання знань, щодо антибіотикорезистентності, впливу фізичних і хімічних факторів на біологічні властивості грамнегативних неферментуючих бактерій, які мають медичне значення.

Голова комісії  
 завідувач кафедри мікробіології та  
 вірусології Буковинського державного  
 медичного університету МОЗ України,  
 доктор медичних наук, професор

 С. Є. Дейнека

Відповідальний за впровадження  
 професор кафедри мікробіології та вірусології  
 доктор медичних наук, професор

 І. Й. Сидорчук

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України д.мед.н., професор А. Г. Шульгай

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

#### Результатів наукових досліджень

1. Назва пропозиції: «Характеристика впливу чинників оточуючого середовища на біологічну активність грамнегативних неферментуючих бактерій».
2. Установа-розробник: Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України; 21018 м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.
3. Розробник: Буркот Віта Михайлівна.
4. Джерело інформації:
  1. Біологічні властивості збудників ускладнень у хворих з опіками / В. М. Буркот // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 2, Том 3 (130). – С. 210-213.
  2. Особливості формування резистентності до антибіотиків у грамнегативних неферментуючих бактерій / В. М. Кондратюк, З. М. Прокопчук, В. М. Буркот, І. М. Вовк // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 253-256.
  3. Чутливість біоплівкових та планктонних форм неферментуючих бактерій до дії антисептиків / Ю. Ю. Трофіменко, Є. Ф. Макац, О. К. Стукан, В. М. Буркот // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 293-296.
  4. Фенотипові і генотипові детермінанти антибіотикорезистентності грамнегативних бактерій – етіологічних чинників інфекційних ускладнень бойових ран / В. П. Ковальчук, В. М. Кондратюк, І. М. Коваленко, В. М. Буркот // Мікробіологічний журнал, 2019. - Т. 81. - № 1. – С. 61-71.
  5. Biofilm forming activity of non-fermenting gram-negative bacteria / Valentyn P. Kovalchuk, Oleksandr A. Nazarchuk, Vita M. Burkot, Nadiia S. Fomina, Zoia M. Prokopchuk, Oleksandr Dobrovanov // Wiadomości Lekarskie, Volume LXXIV, Issue 2, February 2021. – P. 252-256.
5. Де впроваджено. Впроваджено в навчальний процес на лекціях, практичних заняттях на кафедрі мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України (протокол засідання № 17 від 23 червня 2021 р.).
6. Ефективність впровадження: актуалізація, практичне використання знань, щодо антибіотикорезистентності, впливу фізичних і хімічних факторів на біологічні властивості грамнегативних неферментуючих бактерій, які мають медичне значення.

Відповідальний за впровадження:  
Завідувач кафедри мікробіології, вірусології  
та імунології Тернопільського  
національного медичного університету  
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України  
доктор медичних наук, професор

 С.І. Клиمنيук



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної  
роботи Вінницького національного  
медичного університету  
ім. М. І. Пирогова МОЗ України,  
професор Ю. Й. Гумінський  
25 травня 2021 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**  
Результатів наукових досліджень

**1. Назва пропозиції:** «Характеристика впливу чинників оточуючого середовища на біологічну активність грамнегативних неферментуючих бактерій».

**2. Установа-розробник:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України; 21018 м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

**3. Розробник:** Буркот Віта Михайлівна.

**4. Джерело інформації:**

1. Біологічні властивості збудників ускладнень у хворих з опіками / **В. М. Буркот** // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 2, Том 3 (130). – С. 210-213.

2. Особливості формування резистентності до антибіотиків у грамнегативних неферментуючих бактерій / В. М. Кондратюк, З. М. Прокопчук, **В. М. Буркот**, І. М. Вовк // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 253-256.

3. Чутливість біоплівкових та планктонних форм неферментуючих бактерій до дії антисептиків / Ю. Ю. Трофіменко, Є. Ф. Макац, О. К. Стукан, **В. М. Буркот** // Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. - № 2. - Т. 22. – Вінниця, 2018. – С. 293-296.

4. Фенотипові і генотипові детермінанти антибіотикорезистентності грамнегативних бактерій – етіологічних чинників інфекційних ускладнень бойових ран / В. П. Ковальчук, В. М. Кондратюк, І. М. Коваленко, **В. М. Буркот** // Мікробіологічний журнал, 2019. - Т. 81. - № 1. – С. 61-71.

5. Biofilm forming activity of non-fermenting gram-negative bacteria / Valentyn P. Kovalchuk, Oleksandr A. Nazarchuk, **Vita M. Burkot**, Nadiia S. Fomina, Zoia M. Prokopchuk, Oleksandr Dobrovanov // Wiadomości Lekarskie, Volume LXXIV, Issue 2, February 2021. – P. 252-256.

**5. Де впроваджено.** Впроваджено в навчальний процес на лекціях, практичних заняттях на кафедрі мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України (протокол засідання № 13 від 21.05.2021 р.).

**6. Ефективність впровадження:** актуалізація, практичне використання знань, щодо антибіотикорезистентності, впливу фізичних і хімічних факторів на біологічні властивості грамнегативних неферментуючих бактерій, які мають медичне значення.

Відповідальний за впровадження: к.мед.н., доцент

 **І. М. Вовк**

Голова комісії  
завідувач кафедри мікробіології  
Вінницького національного медичного  
університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України,  
д.мед.н., професор

 **В.П. Ковальчук**