

Маркелова Наталья Николаевна

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

03.02.03. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва, 2016 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Пензенский государственный университет»

Научный руководитель: Семёнова Елена Фёдоровна,
кандидат биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Бибикова Маргарита Васильевна,
доктор биологических наук,
генеральный директор ООО «Виорин»

Садыкова Вера Сергеевна,
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе Российской академии наук», ведущий научный сотрудник лаборатории химического изучения биологически активных соединений микробного происхождения

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук»

Защита состоится 29 марта 2016 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1. Тел. 8 (495) 939-54-83, эл. почта: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.

Пискункова Нина Федоровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В современном мире грамотрицательные бактерии всё чаще становятся возбудителями оппортунистических инфекций. Причиной тому является высокая эффективность в приобретении ими механизмов устойчивости к антибиотикам, особенно под давлением селективного отбора (Weinstein et al., 2005; Woodford, Turton, Livermore, 2011). Наиболее значимыми стали *Acinetobacter* sp., *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и новый эмерджентный микроорганизм *S. maltophilia* с природной устойчивостью ко многим препаратам (D'Agata, 2004, Rice, 2008, Boucher et al., 2009), представленные Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) как объекты, в отношении которых необходима разработка новых антибактериальных средств (Talbot et al., 2006).

В связи с этим актуален поиск альтернативных антибиотикам агентов, в том числе эфирных масел, антимикробные свойства которых известны на протяжении многих столетий и в настоящее время находят своё применение в практической медицине (Fabio et al., 2007, Khan et al., 2009, Brooke, 2012, Thapa et al., 2012). Однако детальное изучение эфирных масел растительного происхождения, их компонентов и комбинаций с современными антибиотиками в отношении полирезистентных грамотрицательных бактерий не проводилось.

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

Задачи:

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

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

Используя комплекс фенотипических и молекулярно-генетических характеристик, впервые показана возможность дифференцирования внутрибольничных изолятов: 3 стабильных морфологических типа определены у *A. baumannii*, несущих ген β -лактамазы типа OXA-40; 2 – у *P. aeruginosa*, один из которых продуцировал металло- β -лактамазу типа VIM.

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

Для исследования воздействия эфирномасличных субстанций в различных концентрациях на бактерии впервые использована модифицированная нами методика с построением кинетических моделей роста. Установлены взаимосвязи ростовых характеристик *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*

с эффектами эфирных масел: между удлинением логарифмической фазы и гибелью бактериальных клеток при уровне значимости $p < 0,05$: *K. pneumoniae* – $R=0,92$; *P. aeruginosa* – $R=0,83$; *S. maltophilia* – $R=0,76$; *A. baumannii* – $R=0,73$; между подавлением роста *S. maltophilia* и *A. baumannii* маслами, содержащими линалоол, от его концентрации в них ($R=1,0$).

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные распространённости, колонизационной специфики *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и их возможных фенотипов антибиотикорезистентности могут быть использованы в организации локального бактериологического мониторинга больничных комплексов, способствующего сдерживанию антибиотикорезистентности и экспериментальному поиску новых антибактериальных средств. На основе сравнительной оценки биологической активности различных эфирных масел и их компонентов выявлены образцы с высокой противобактериальной активностью, что даёт возможность рекомендовать масла розы крымской, эвкалипта и индивидуальное соединение β -фенилэтанол для всех изученных видов условно-патогенных бактерий; мятные масла ментольного сорта Заграва, линалоольного сорта Оксамитовая, лавандовое масло и индивидуальные соединения нерол, линалоол, цитраль – в отношении *A. baumannii* и *S. maltophilia*, мятное масло сорта Прилукская карвонная – в отношении *S. maltophilia*, ментол – в отношении *A. baumannii* в качестве перспективных антибактериальных субстанций. Синергетические комбинации масел розы крымской, розового дерева, мяты сортов Заграва, Бергамотная, Оксамитовая с β -лактамами антибиотиками и аминогликозидами могут быть перспективны для создания комплексных антимикробных средств.

Методология и методы исследования. Сбор и первичное обобщение фактов, описание наблюдаемых и экспериментальных данных, их систематизация и классификация основывались на эмпирическом и теоретическом познании, а также морфологических, физиолого-биохимических, молекулярно-генетических методах. С целью проверки рабочих гипотез в исследовании использовались

методы статистики и теории вероятностей; выявления характера и особенностей связи между элементами и функциями изучаемых объектов – системный подход.

Положения, выносимые на защиту.

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

2. Устойчивость *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* к цефалоспорином, фторхинолонам, карбапенемам составила от 12,8 до 100,0 % в зависимости от видовой принадлежности. Наибольшая резистентность отмечена у *A. baumannii* $\geq 84,5$ % и *P. aeruginosa* $\geq 43,5$ %, их стабильные субпопуляции имели фенотипические и молекулярно-генетические различия, включая детерминанты резистентности, OXA-40 у *A. baumannii* и MBL VIM у *P. aeruginosa*.

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

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

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы и результаты исследования были представлены на IX Международной научно-

практической конференции «Экология и ресурсосберегающие технологии на предприятиях народного хозяйства» (Пенза, 2009); X Международной научно-практической конференции «Окружающая природная среда и экологическое образование и воспитание» (Пенза, 2010); I и II Международных научно-практических конференциях «Современные проблемы отечественной медико-биологической и фармацевтической промышленности. Развитие инновационного и кадрового потенциала Пензенской области» (Пенза, 2011; 2012); на интернет – конференциях: XXX International Research and Practice Conference and the II Stage of the Championship in medical and pharmaceutical sciences «Modern medicine and pharmaceuticals: actual problems and prospects of development» (London, 2012), LXIX International Research and Practice Conference and the III Stage of the Championship in medical and pharmaceutical sciences «Modern medicine and pharmaceuticals: actual problems and prospects of development» (London, 2013); 78-ой итоговой студенческой научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 95-летию со дня рождения профессора Ю. М. Лубенского (Красноярск, 2014).

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. В соответствии с формулой и областями исследований специальности 03.02.03 «Микробиология» представлены закономерности взаимоотношений условно-патогенных грамотрицательных бактерий с окружающей средой, проведены исследования внутрибольничных популяций бактерий и их сообществ. В работе показаны особенности жизнедеятельности бактерий под воздействием биологически активных веществ растительного происхождения – эфирных масел и их индивидуальных компонентов. Отражены теоретические и практические

аспекты перспективного направления современной биологии, медицины и фармацевтики – преодоления бактериальной антибиотикорезистентности.

Личный вклад автора. Планирование и организация микробиологического мониторинга, проведение экспериментов, анализ и систематизация полученных данных, статистическая обработка и оформление результатов исследования осуществлены автором самостоятельно в соответствии с планом, согласованным с научным руководителем. Подтверждение идентификации бактерий масс-спектрометрией, молекулярно-генетический анализ детерминант резистентности и определение минимальных подавляющих концентраций антибиотиков методом серийных разведений выполнен на базе микробиологической лаборатории НИИАХ ГБОУ ВПО СГМУ МЗ РФ при участии к.м.н., с.н.с. Сухоруковой М.В. ГЖХ-анализ образцов эфирных масел выполнен совместно с с.н.с. ИСХК Даниловой И.Л. и Марченко М.П. Вклад автора в совместные публикации составляет 50 – 90 %.

Публикация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 17 научных статей, в том числе 5 – в журналах перечня ВАК и 2 – в зарубежных изданиях.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 194 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, 4 приложений. Она включает 53 таблицы, 80 рисунков. Список использованной литературы представлен 213 источниками, в том числе 194 – иностранными.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Сравнительная характеристика нозокомиальных условно-патогенных грамотрицательных бактерий

На основании анализа литературных источников обсуждается важность таксономической классификации условно-патогенных грамотрицательных бактерий (УПГБ), являющихся нозокомиальными агентами, определения их морфологических и физиологических особенностей, которые могли бы использоваться как маркеры патогенности и антибиотикорезистентности (Boye,

2003; Lee et al., 2006; Martínez et al., 2010; Adamek et al., 2012; Hennequin et al., 2012; Svensson-Stadler et al., 2012; Sahl et al., 2013; Hazen et al., 2014; Russo et al., 2014; Gherardi et al., 2015). Описываются современные технологии идентификации бактерий и определения их чувствительности к антибактериальным препаратам (Mellmann et al., 2008; Veen et al., 2010; Cloud et al., 2010; Croxatto et al., 2012). Охарактеризованы основные механизмы резистентности грамотрицательных видов *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и формирование ими множественной лекарственной устойчивости (Bradford, 2001; Jacoby, 2005, 2009; Bonomo, Szabo, 2006; Souli M. et al., 2008; Miriagou et al., 2010; Rodríguez-Martínez et al., 2010; Rumbo et al., 2013). Обсуждаются возможные способы преодоления антибиотикорезистентности бактерий и вещества различного происхождения, способные оказывать на них антимикробное действие (Brogden, 2005; Fabio et al., 2007; Lorenzi et al., 2009; Silva et al., 2012; Williams, 2012; Rai et al., 2012; Thapa et al., 2012).

Глава 2. Объекты и методы исследования

Объектами бактериологического мониторинга являлись грамположительные ($n=512$) и грамотрицательные ($n=889$) бактерии, выделенные от пациентов городского лечебно-профилактического учреждения за период 03.2012 – 03.2015 гг.

В отношении *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* исследовали антибактериальную активность 12 образцов эфирных масел, различающихся по компонентному составу: мяты *Mentha piperita* L. сортов Заграва, Украинская перечная, Прилукская карвонная, Оксамитовая, Бергамотная; розы крымской *Rosa gallica* L., розы болгарской *Rosa damascene* Mill.; пихты *Abies sibirica* Ledeb.; 2 образцов эвкалипта: 1 – *Eucalyptus viminalis* Labill., 2 – *Eucalyptus globulus* Labill.; лаванды *Lavandula angustifolia* Mill.; розового дерева *Aniba rosaeodora*; 5 химически чистых компонентов изучаемых масел: β -фенилэтилового спирта, линалоола, нерола, ментола, цитраля. Также изучалась сочетанная активность этих масел с современными антибактериальными препаратами: ингибиторзащищёнными β -лактамами – тикарциллин/клавуланатом 85 мкг, цефоперазон/сульбактамом 105 мкг; монобактамом – азтреонамом 30 мкг;

цефалоспорины III поколения – цефтазидимом 10 мкг, IV поколения – цефепимом 30 мкг; карбапенемами – меропенемом 10 мкг, имипенемом 10 мкг, эртапенемом 10 мкг; фторхинолонами – левофлоксацином 5 мкг, ципрофлоксацином 5 мкг; аминогликозидами – амикацином 30 мкг, нетилмицином 10 мкг; глицилциклином – тигециклином 15 мкг, триметоприм/сульфаметоксазолом 25 мкг (Семёнова и др., 2014).

Отбор проб биологического материала и их первичный посев на питательные среды осуществляли в соответствии с правилами, изложенными в методических указаниях (МУ 4.2.2039-05, 2006). Культивирование бактерий проводили при температуре 37,0 °С, в течение 18-24 часов. Биохимическая идентификация проводилась в автоматизированном режиме на тест-системах, включающих до 47 биохимических тестов производства BioMerieux. Подтверждение видовой принадлежности некоторых изолятов проводилось методом матрично-активированной лазерной десорбции-ионизации времяпролётной (MALDI-TOF) масс-спектрометрии (Murray, 2012).

Изучение чувствительности бактерий к антибиотикам и выявление фенотипов бактерий, несущих детерминанты резистентности, осуществлялось методом диффузии в агар (дисков с антибиотиками, E-тестов) и серийных разведений в жидкой среде. Интерпретация полученных зон задержки роста бактерий и минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков проводилась в соответствии с рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2014 года и Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2013 года для каждого вида бактерий. Выявление генов резистентности VIM, IMP, NDM, OXA-48, OXA-23, OXA-40, OXA-58, KPC осуществлялось полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в реальном времени (Кулагина и др., 2015).

Определение активности эфирных масел и их компонентов в отношении изолятов бактерий проводили модифицированной нами методикой анализа кинетики роста бактерий в жидкой среде на базе планшетного фотометра

«Multiscan Ascent» (Финляндия) с помощью программы «Микроб-автомат» (Скала, Лукин, 2009).

Статистический анализ результатов исследования осуществляли с использованием программ Excel (Microsoft, США) и пакета Statistica 6 (Яковлев, 2005; Трухачёва, 2012).

Глава 3. Бактериологический мониторинг клинических материалов

В проведённом исследовании было показано, что грамотрицательные бактерии (ГОб) преобладали (63,5 %) над грамположительными бактериями (ГПБ) при $p < 0,05$, при этом основная часть изолятов ГОб пришлось на реанимационные отделения – 67,7% ($n=602$), что и определило структуру ГОб всего стационара. Среди представителей ГОб преобладали *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli*, *S. maltophilia*, *E. cloacae*, которые составили 88,6 % (788 изолятов) от всех ГОб (рис. 1).

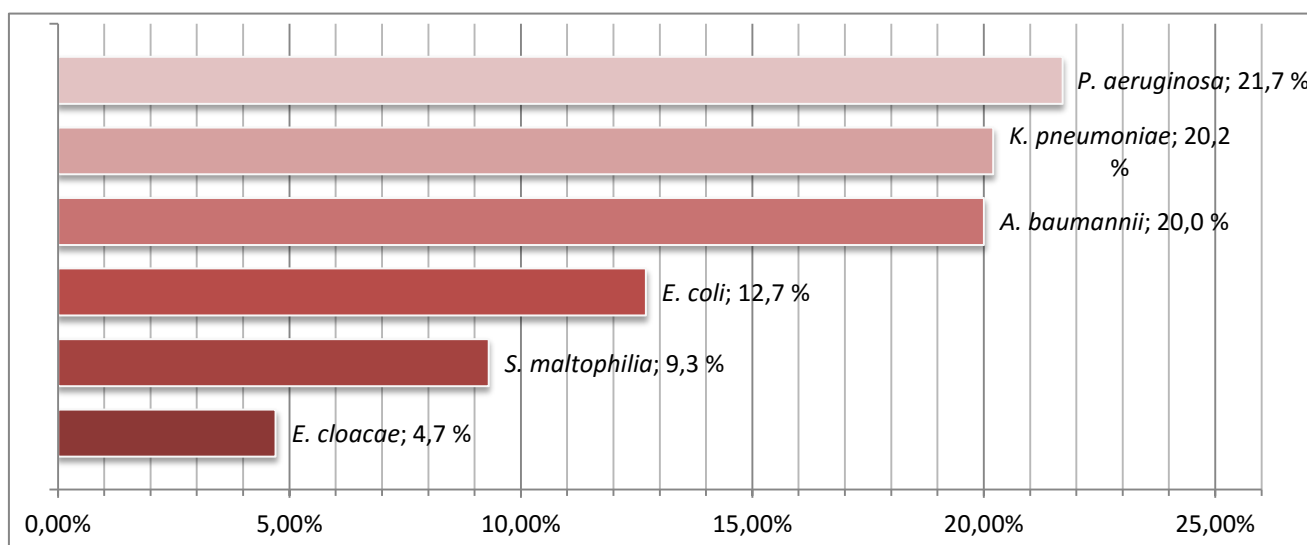


Рисунок 1. Структура видов грамотрицательных бактерий, доминирующих в стационаре.

Значительную часть 71,2 % (633 изолята) составили 4 вида бактерий, которые достоверно чаще выделялись в реанимационных отделениях *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* ($p < 0,05$) и были определены для дальнейшего анализа. Несмотря на незначительное преобладание *E. coli* над *S. maltophilia*, последний был отобран для дальнейшего анализа, как экзогенный патоген с высоким уровнем естественной устойчивости к антибиотикам и потенциалом внутрибольничного возбудителя, в отличие от *E. coli* – комменсала

организма человека. Наши наблюдения показали, что независимо от таксономической принадлежности *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* имели ряд особых характеристик, проявившихся в условиях существования во внутрибольничной среде. Распределение по источникам выделения было соразмерно исследуемому биоматериалу: в реанимации и детской хирургии – секрету нижних дыхательных путей – 70,7 % (1629), взрослой хирургии – раневой поверхности – 79,8 % (1636). Из первого источника выделили 86,8 % (437), из второго источника – 81,3 % (100) данных бактерий ($p < 0,05$).

На этапе идентификация у изолятов бактерий выявляли нетипичные биохимические свойства, частота проявления которых колебалась у различных видов: минимальное количество (8,5 %) определили у *A. baumannii*, а максимальное (23,4 %) – *K. pneumoniae* (рис. 2).

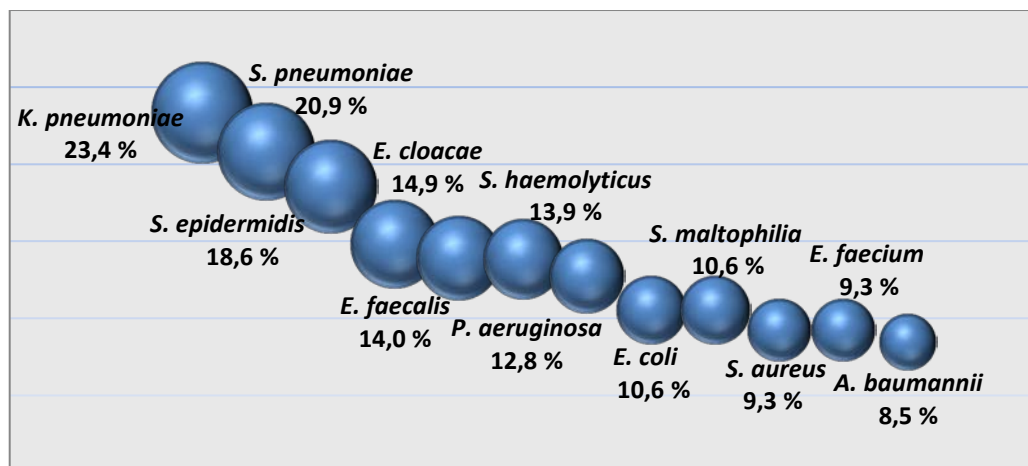


Рисунок 2. Ранжирование основных внутрибольничных видов бактерий по количеству проявленных ими нетипичных биохимических реакций.

По нашему мнению, идентичность этих свойств может характеризовать не только однородность популяции, но и их единое происхождение, в том числе госпитальное. Увеличение выделения грамотрицательных бактерий в отдельные временные интервалы исследования было обусловлено спонтанной колонизацией пациентов *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*. Нами была определена сезонность в распределении бактерий, согласно которой в летне-осенний период доминировали *P. aeruginosa* (август, сентябрь) и *K. pneumoniae* (август, октябрь, ноябрь), весенне-осенний – *A. baumannii* (апрель, май, октябрь) ($p < 0,05$) (рис. 3).

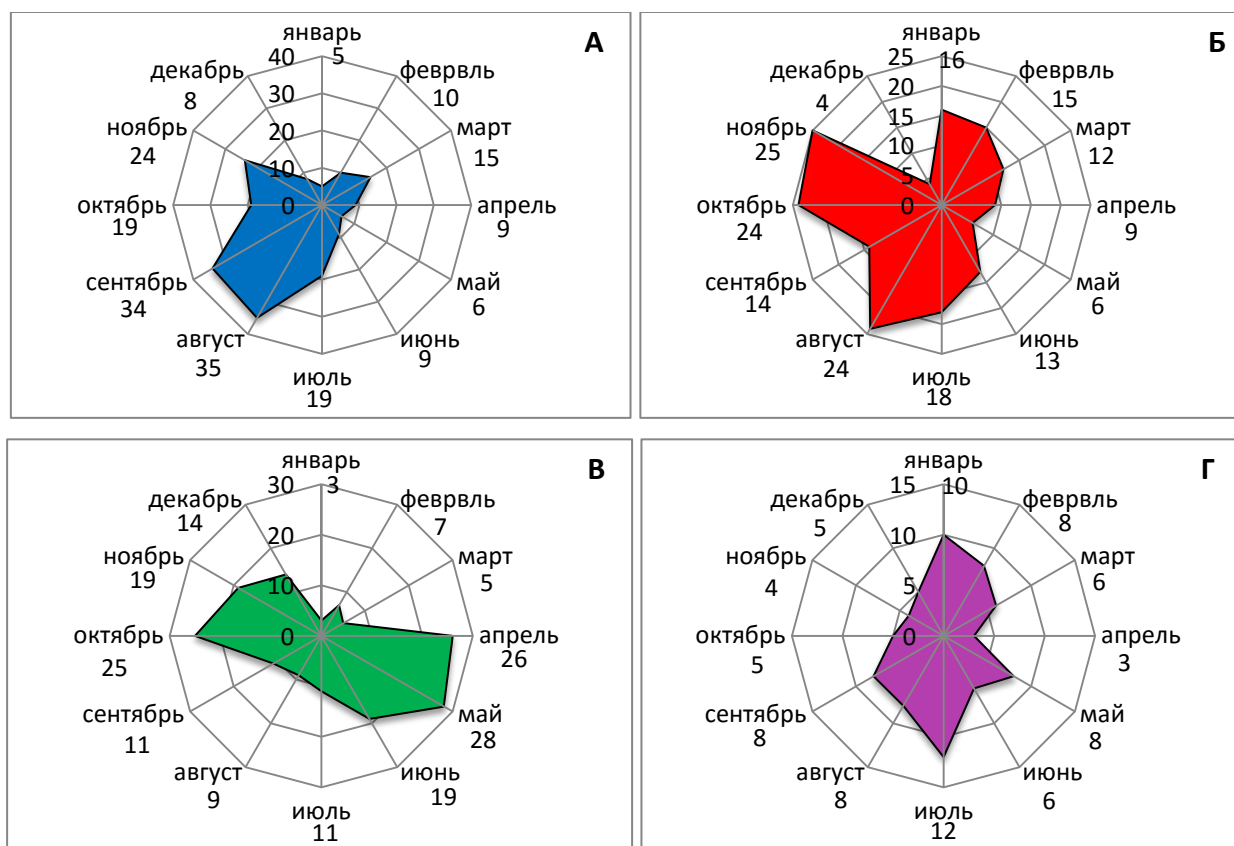


Рисунок 3. Годовая динамика выделения *P. aeruginosa* – А, *K. pneumoniae* – Б, *A. baumannii* – В, *S. maltophilia* – Г в абсолютных числах.

Наибольшая частота встречаемости грамотрицательных бактерий наблюдалась в августе в хирургических отделениях – 24,4 %, октябре и ноябре – в реанимации – 25,2 % ($p < 0,05$).

Кроме сезонной приуроченности распределение *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* оценивалось с точки зрения причастности к возрастной группе и половой принадлежности: *K. pneumoniae* в 2 раза чаще встречалась у детей, *P. aeruginosa* в 3,5 раза чаще – у взрослых ($p < 0,05$); *A. baumannii* в 1,7 раза чаще у женщин, *S. maltophilia* в 1,9 раза – у мужчин ($p < 0,05$).

Основная часть изолятов 76,7 % (148) *P. aeruginosa*, 83,9 % (151) *K. pneumoniae*, 83,6 % (148) *A. baumannii*, 65,1 % (54) *S. maltophilia* ($p < 0,05$), находилась в биоматериалах в виде монокультур, что является показателем самостоятельности этих бактерий как патогенных агентов. В составе 69,0 % их ассоциаций находились грамотрицательные бактерии ($p < 0,5$). В парных и трёхкомпонентных ассоциациях частота встречаемости *P. aeruginosa* составила 51,1 % (23), *K. pneumoniae* – 38,0 % (11), *A. baumannii* – 51,7 % (15), *S. maltophilia* –

79,3 % (23). Между ними выявлены следующие комбинации: *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* (10); *P. aeruginosa*, *A. baumannii* (9); *K. pneumoniae*, *S. maltophilia* (7); *A. baumannii*, *S. maltophilia* (6); *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* (4).

Глава 4. Чувствительность к антибактериальным препаратам выделенных изолятов грамотрицательных бактерий

Сравнительное изучение восприимчивости бактерий к антибиотикам выявило высокую резистентность *A. baumannii*, *S. maltophilia* к карбапенемам, цефалоспорином III, IV поколений, *A. baumannii* – фторхинолонам, которая более чем в 1,5 превышала в первом случае устойчивость *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, во втором – *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. maltophilia* ($p < 0,05$). В отношении *K. pneumoniae* наибольшую активность сохранили карбапенемы, *S. maltophilia* – фторхинолоны; *P. aeruginosa* характеризовался практически одинаковым уровнем резистентности к карбапенемам, цефалоспорином III, IV поколений и фторхинолонам (рис. 4).

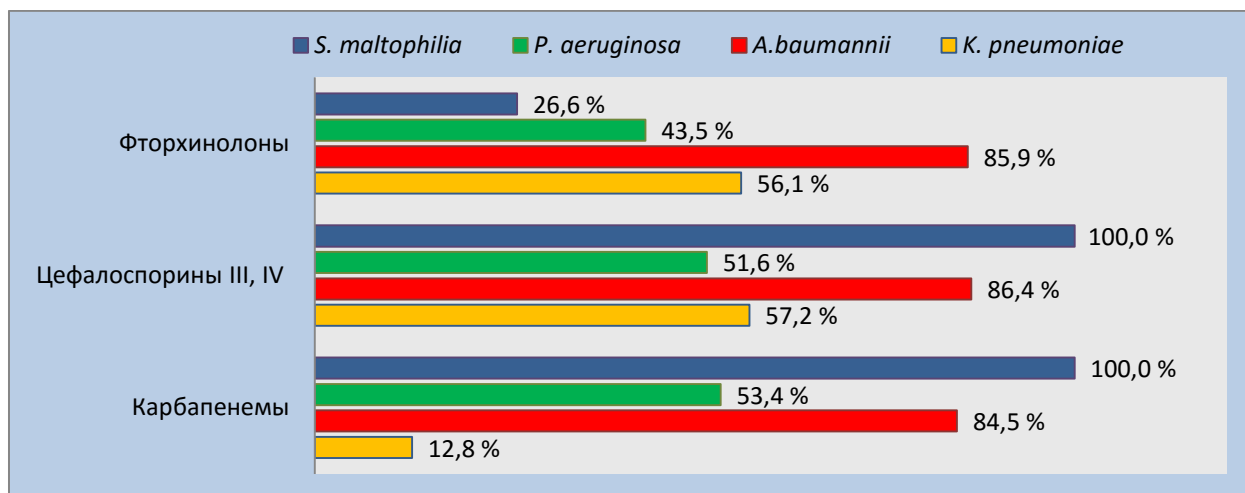


Рисунок 4. Устойчивость ведущих грамотрицательных бактерий к основным группам современных антибактериальных препаратов.

Среди этих бактерий ни к одному из изученных антибактериальных препаратов не выявлено абсолютной чувствительности. Наши наблюдения показали, что за 3 года выросла устойчивость *K. pneumoniae* к амоксициллин/клавуланату на 37,2 %, эртапенему – 29,0 %, тигециклину – 39,5 %; *S. maltophilia* к левофлоксацину – 31,0 %, ципрофлоксацину – 37,9 %, тигециклину – 46,0 %, тикарциллин/клавуланату – 60,1 %; *A. baumannii* к цефалоспорином:

цефтазидиму, цефепиму – 24,7 %, аминогликозидам: нетилмицину – 44,8 %, гентамицину – 24,7 %, тобрамицину – 60,3 %; тигециклину – 38,5 % ($p < 0,05$).

Бактериальные популяции *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* характеризовались гетерогенностью в отношении большинства антибактериальных препаратов. Отличительной чертой их формирования являлось бимодальное распределение минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков, при которых определялись моды устойчивой и чувствительной к антибиотику субпопуляций. Мономодальное распределение МПК некоторых антибактериальных препаратов показало однородность популяций по признаку приобретённой резистентности, что могло свидетельствовать об их внутрибольничном происхождении (рис. 5).

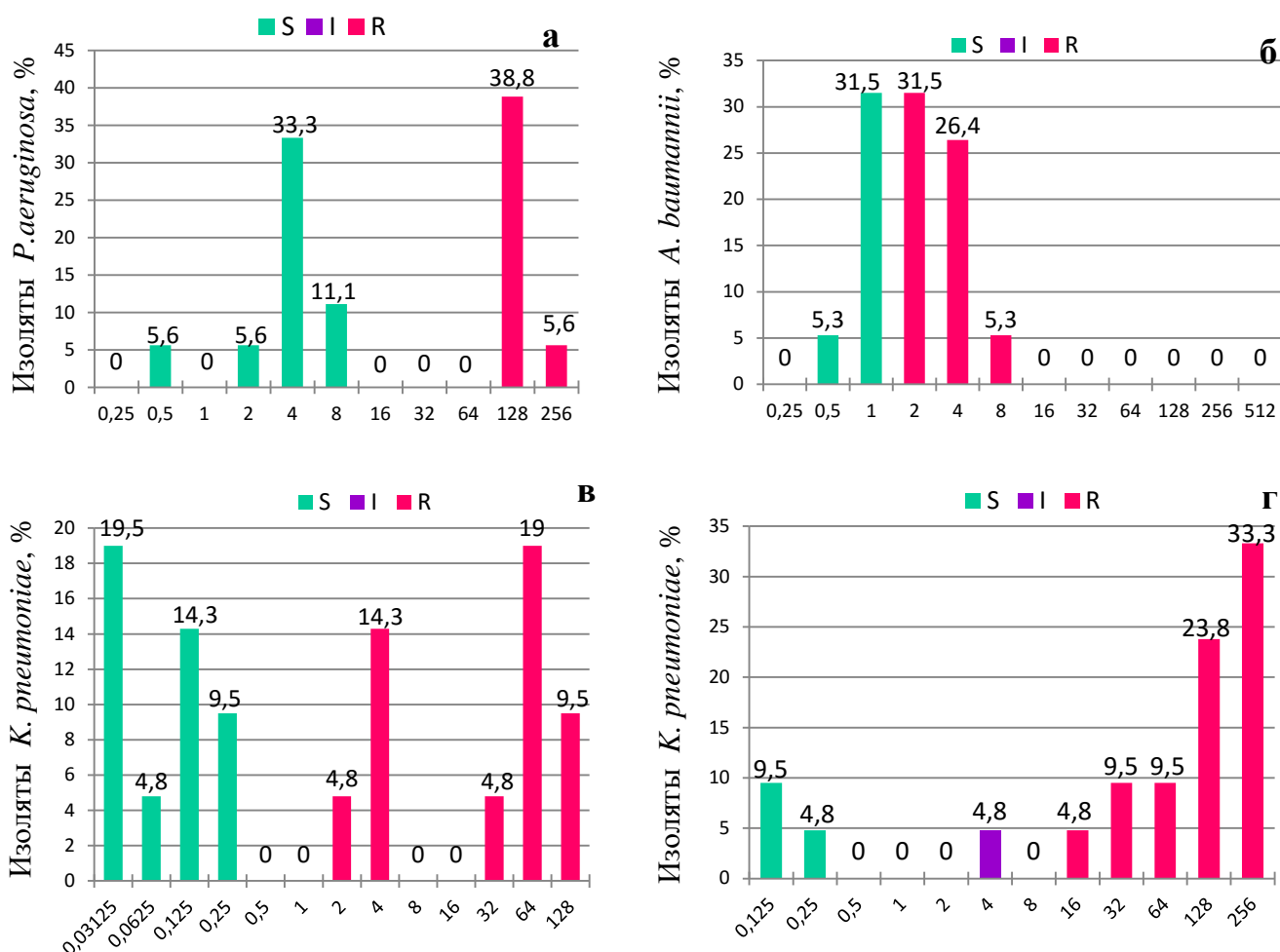


Рисунок 5. Распределение МПК антибиотиков: а – амикацина в отношении изолятов *P. aeruginosa*, б – тигециклина в отношении изолятов *A. baumannii*, в – ципрофлоксацина, г – цефтазидима в отношении изолятов *K. pneumoniae*; S – чувствительные, I – умеренно-резистентные, R – резистентные.

Наибольшая частота встречаемости ассоциированной устойчивости к нескольким группам антибиотиков (карбапенемам, цефалоспорином, аминогликозидам, фторхинолонам) была выявлена у *A. baumannii* – 41,8 % (74). Максимальные значения МПК антибиотиков составили 128 мкг/мл у меропенема, имипенема, цiproфлоксацина, 256 мкг/мл – цефепима, 512 мкг/мл – амикацина. Полирезистентных к цефалоспорином, аминогликозидам, фторхинолонам, ингибиторзащищённым и ингибиторнезащищённым аминопенициллинам *K. pneumoniae* выделено 35,0 % (63). Максимальные значения МПК антибиотиков составили 128 мкг/мл у цiproфлоксацина, 256 мкг/мл – ампициллина, цефепима, цефтазидима, амоксициллин/клавуланата, 512 мкг/мл – амикацина. У 23,8 % (46) *P. aeruginosa* определена устойчивость одновременно к ингибиторзащищённым пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам, аминогликозидам, фторхинолонам. Максимальные значения МПК антибиотиков составили 128 мкг/мл у меропенема, имипенема, цефтазидима, 256 мкг/мл – амикацина, гентамицина, тикарциллин/клавуланата, пиперациллин/тазобактама.

Антибиотикоустойчивость *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* была обусловлена детерминантами резистентности, что с учётом предложенных нами фенотипических характеристик позволило дифференцировать внутрибольничные субпопуляции между собой. Среди полирезистентных *A. baumannii* у 19,8 % (35 изолятов) определили 3 устойчивых морфологических типа, несущих ген β -лактамазы ОХА-40 и имеющих различия в способности вызывать потемнение столбика мясо-пептоного агара (МПА) до коричневого оттенка и чувствительности к нетилмицину, тобрамицину, тигециклину. Устойчивостью ко всем известным группам антибактериальных препаратов, за исключением колистина характеризовались 2 основных фенотипа *P. aeruginosa*, различающихся способностью синтезировать пиоцианин. Беспигментные изоляты (19,7 %, 38) несли ген металло- β -лактамазы типа VIM, а резистентность к карбапенемам продуцентов пигмента была обусловлена иными механизмами, при этом оба фенотипа показали значения МПК карбапенемов > 32 мкг/мл. Присутствие β -лактамаз расширенного спектра (ESBL) выявлено у 78,9 % (142 изолятов) *K. pneumoniae*. Высокий уровень

устойчивости 38,0 % к хлорамфениколу свидетельствовал об эффективности эффлюксного оттока у *S. maltophilia*, что ограничило чувствительность ко многим антибиотикам.

Таким образом, согласно полученным данным, резистентность к антибиотикам у *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* может развиваться в условиях больничного комплекса. Этому способствует селекция антибиотикоустойчивых бактерий, обладающих различными механизмами резистентности. В связи с этим, количество эффективных антибактериальных средств уменьшается и необходимы меры по сдерживанию и преодолению антибиотикорезистентности, в том числе на локальном уровне.

Глава 5. Исследование антибактериальных эффектов эфирных масел различного происхождения и их сочетанного действия с антибиотиками в отношении некоторых грамотрицательных видов

Диско-диффузионный скрининг выявил способность эфирных масел подавлять рост *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*. Средние значения зон ингибирования находились в диапазоне 6,3 – 9,4 мм (рис. 6).

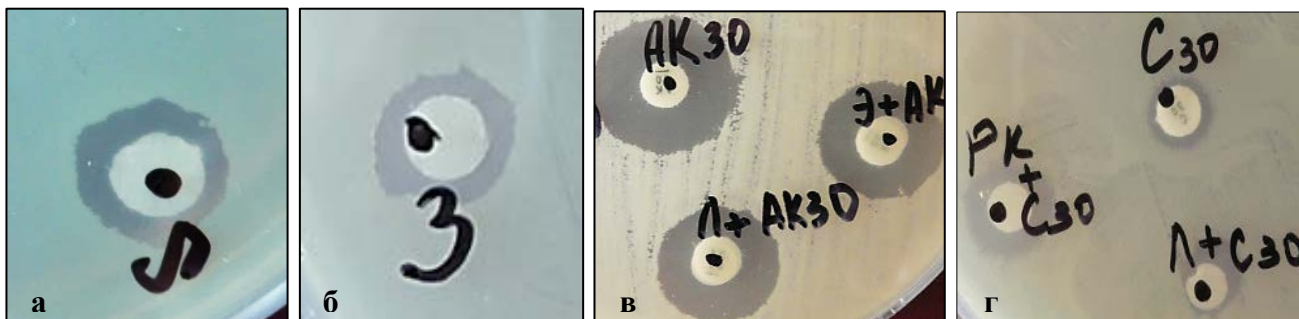


Рисунок 6. Активность субстанций: эфирного масла лаванды (Л) в отношении *A. baumannii* – а; масла мяты сорта Заграва (З) – *S. maltophilia* – б; амикацина (AK30) и его комбинаций с эфирными маслами: лаванды (Л+AK30), эвкалипта (Э+AK30) в отношении *K. pneumoniae* – в; хлорамфеникола (С30) и его комбинаций с эфирными маслами: розы крымской (РК+С30); лаванды (Л+С30) в отношении *S. maltophilia* – г.

Результаты измерений бактерицидных и бактериостатических концентраций эфирных масел методом кинетики роста микроорганизмов выявили различную степень биологического воздействия и избирательности на тест-объекты. Самую высокую активность в отношении *S. maltophilia* показали масла розы крымской и мяты сорта Прилукская карвонная (МПК 1,95 мкл/мл), в отношении *A. baumannii* –

масла эвкалипта (МПК 0,97 мкл/мл), лаванды и розы крымской (МПК 1,95 мкл/мл), которая не менее чем в 2 раза была выше активности большинства эфирных масел (МПК 3,9 мкл/м) ($p < 0,05$). Слабая восприимчивость к эфирным маслам (МПК $\geq 7,8$ мкл/мл) наблюдалась у *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, за исключением масла розы крымской (МПК 1,95 мкл/мл) и масла эвкалипта (МПК 3,9 мкл/мл) в отношении *P. aeruginosa*.

Различный уровень подавления роста тест-культур эфирными маслами наблюдался при бактериостатическом действии. Более 70,0 % клеток погибало в среде с маслом мяты карвонной в отношении *S. maltophilia*, *A. baumannii*, маслом мяты Заграва и эвкалипта – *A. baumannii*, маслом розы крымской – *S. maltophilia* и *P. aeruginosa* (рис. 7А, 7Б). Более 50,0 % гибели вызывали масла мяты Оксамитовой, эвкалипта в отношении *A. baumannii*; масла мяты Заграва, розы крымской – *S. maltophilia*, масло лаванды – *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. Наименьшим антибактериальным действием в отношении *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* характеризовались эфирные масла розы болгарской и пихты, под влиянием которых наступала гибель менее 40,0% клеток. Мятные масла показали слабо выраженное бактериостатическое действие в отношении *P. aeruginosa*, гибель клеток составляла менее 33,0%.

Бактериостатическое действие эфирных масел сопровождалось удлинением продолжительности лаг-фазы ростового цикла относительно её длительности в процессе роста бактерий в свободной от эфирного масла питательной среде, и это приращение времени положительно коррелировало с уровнем их ингибирования эфирными маслами: *S. maltophilia* – $R = 0,76$ ($p = 0,006$), *A. baumannii* – $R = 0,73$ ($p = 0,01$), *P. aeruginosa* $R = 0,83$ ($p = 0,001$). Самое продолжительное удлинение логарифмической фазы роста выявлено у *S. maltophilia* под влиянием эфирного масла эвкалипта в концентрации 1,95 мкл/мл и составило 613,3 минуты. На наш взгляд, отсроченное вступление бактериальных культур в стадию экспоненциального роста под влиянием эфирных масел может быть использовано для их включения в качестве бактериостатиков в состав многокомпонентных лекарственных субстанций с определенным спектром действия.

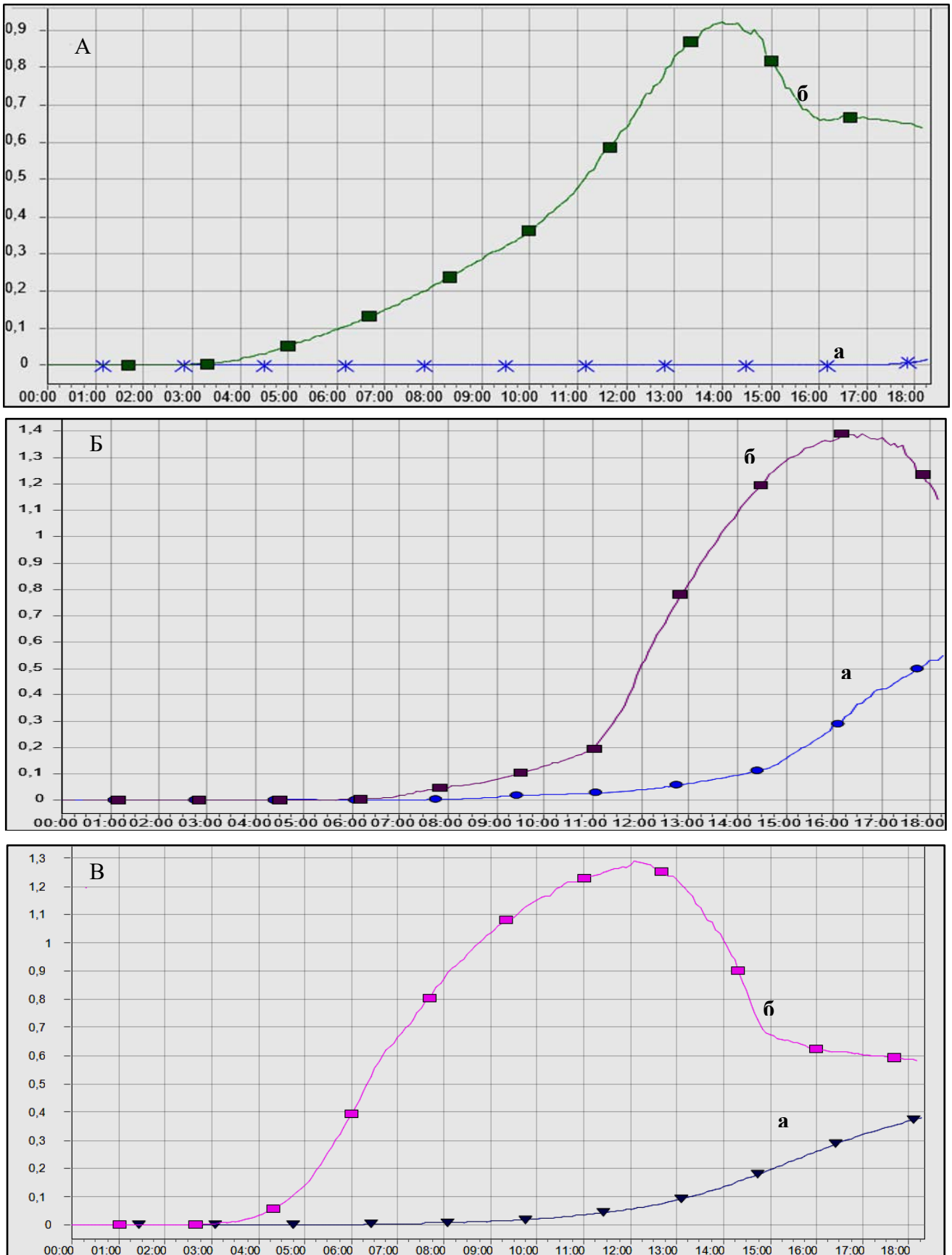


Рисунок 7. Кривые роста: *A. baumannii* в среде с эфирным маслом эвкалипта – А, *P. aeruginosa* в среде с маслом розы крымской – Б в разведении 1:1024 – а, в среде без эфирного масла – б; *K. pneumoniae* в среде с β -фенилэтанола – В в разведении 1:512 – а, в среде без β -фенилэтанола – б. Ось ординат – приращение оптической плотности; ось абсцисс – время в часах.

Индивидуальные соединения эфирных масел оказывали на тест-объекты бактерицидное действие в различных концентрациях (таблица 1).

Таблица 1. Активность некоторых компонентов эфирных масел в отношении *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*

Компонент эфирного масла	МПК компонентов эфирного масла, мкл/мл			
	<i>S. maltophilia</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Ментол	7,8	3,9	> 7,8	> 7,8
β-фенилэтанол	1,95	1,95	3,9	3,9
Нерол	0,97	1,95	7,8	3,9
Линалоол	1,95	1,95	7,8	7,8
Цитраль	0,24	3,9	7,8	3,9

Наиболее активным компонентом, но в то же время специфически направленным на *S. maltophilia* оказался цитраль – монотерпеновый ациклический альдегид, входящий в состав минорных компонентов эфирного масла лаванды и розового дерева (МПК 0,24 мкл/мл). Ментол – главный компонент эфирных масел мяты сортов Заграва и Украинская перечная в концентрации 3,9 мкл/мл бактерицидно воздействовал на *A. baumannii*. Ароматический спирт β-фенилэтанол – основной компонент масла розы крымской воздействовал на все тест-объекты: в концентрации 1,95 мкл/мл 100,0 % подавлял рост *A. baumannii*, *S. maltophilia* и не менее чем на 90,0 % – *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* (рис. 7В). Терпеновые спирты линалоол, входящий в состав масла нементольных сортов мяты Оксамитовой, Бергамотной и лаванды, а также нерол – один из основных компонентов розовых масел в концентрации 1,95 мкл/мл вызывали 100,0 % гибель клеток *A. baumannii*, *S. maltophilia*, в концентрации 3,9 мкл/мл – *K. pneumoniae*.

Для более точного анализа взаимосвязи содержания индивидуального соединения в составе эфирного масла со степенью подавления роста бактерий мы определили корреляцию между этими величинами на примере линалоола. Между подавлением роста *S. maltophilia* и *A. baumannii* маслами розового дерева, мяты сортов Оксамитовой, Бергамотной, содержащими линалоол, и его концентрации в маслах показана функциональная связь ($R = 1,0$; $p < 0,05$), при этом активность линалоола составляла 75,5 % и 52,0 %, соответственно. В отношении *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* эффективность этих масел ограничивалась способностью этого компонента подавлять рост бактерий и не зависела от уровня его содержания в

маслах, а антибактериальная активность линалоола не превышала 22,0 % и 28,0 %, соответственно. При меньшем содержании линалоола в лавандовом масле активность последнего не только не снижалась, но и увеличивалась в отношении всех тест-объектов в сравнении с маслами с высоким содержанием линалоола (рис. 8).

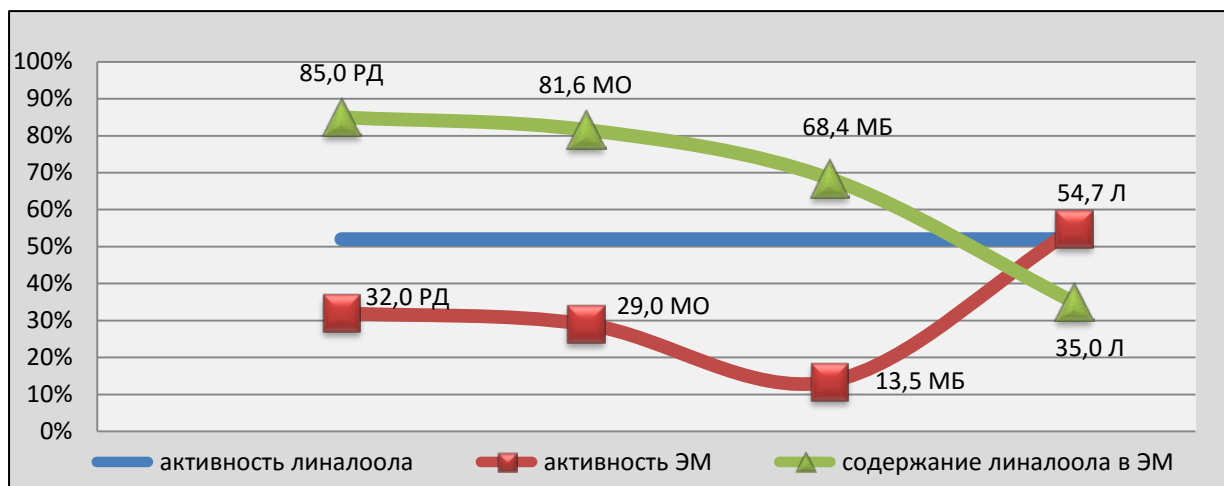


Рисунок 8. Активность эфирных масел в концентрации 0,97 мкл/мл в отношении *A. baumannii* в зависимости от содержания в них линалоола (контроль – активность линалоола).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что концентрация основных антимикробных компонентов в составе эфирных масел и их активность, влияют на функциональную взаимосвязь между количественным содержанием индивидуальных компонентов и степенью подавления роста бактерий эфирными маслами. С другой стороны сложные взаимодействия между отдельными компонентами масел, включая те, которые не представляют собой значительную часть, приводят к суммарной активности, которая может быть более выраженной, чем влияние одного агента.

Характерной особенностью взаимодействия эфирных масел с антибактериальными препаратами *in vitro* являлось усиление антимикробного эффекта одних антибиотиков и ослабление других независимо от вида эфирного масла (рис. бв, бг). Повышение активности под влиянием масел, в основном, отмечено для β -лактамных антибиотиков – 42,9 % случаев, аминогликозидов – 35,7 %, а уменьшение активности тигециклина – в 45,0 % случаев. Можно предположить, что различающиеся индивидуальные биологически активные соединения эфирных масел действуют на одинаковые мишени в бактериальной

клетке, что обуславливает общую тенденцию их взаимодействия с антибиотиками. Синергетические комбинации с антибиотиками выявлены у масел розы крымской, мяты сорта Украинская перечная в отношении *S. maltophilia*, мятного масла сортов Заграва, Бергамотная – *A. baumannii*, сорта Оксамитовая – *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, масла розового дерева – *S. maltophilia* и *P. aeruginosa*. Максимальное усиление антибактериального эффекта на 68,2 % ($p < 0,05$) наблюдалось в комбинации тикарциллин/клавуланат + масло розового дерева, ингибирующей рост *S. maltophilia*. Комбинированные антимикробные субстанции могут обеспечить большую восприимчивость бактерий к антибиотикам. Наибольшая частота синергетических комбинаций антибиотиков и эфирных масел (64,3 %) выявлена в отношении *A. baumannii*, антагонистических взаимодействий (40,0 %) – *P. aeruginosa*. В равной степени мятное масло сортов Заграва и Оксамитовая показали наибольшее количество синергетических взаимодействий с β -лактамами: цефтазидимом и меропенемом, аминогликозидами: нетилмицином и амикацином – 57,1 %, масло лаванды – 25,0 % антагонистических эффектов с антибиотиками тигециклином и триметоприм-сульфаметоксазолом. Антагонизм с антибиотиками выявлен у масел эвкалипта в отношении *S. maltophilia*, *A. baumannii*, мятного масла сорта Бергамотная – *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, масла розы крымской – *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, мяты сорта Украинская перечная – *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, лаванды – *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*. Максимальное ослабление действия антибиотика на 62,3 % ($p < 0,05$) показало сочетание амикацина с маслом лаванды при воздействии на *P. aeruginosa*. Концентрация активных соединений в эфирных маслах может влиять на характер взаимодействия эфирных масел с антибиотиками, о чём свидетельствуют полученные данные. В частности, комбинации антибиотиков с эфирными маслами мяты Оксамитовой и розового дерева, основным компонентом которых является линалоол (81,6 % и 85,0 %, соответственно), показали увеличение чувствительности к антибактериальным препаратам, а масло лаванды, содержащее 54,7 %, линалоола, ее снижение.

Заключение

Мониторинг *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* по возрастной и половой принадлежности пациентов, сезонам года, способности образовывать ассоциации с другими бактериями, показал особенности их распространения во внутрибольничной среде. Изучение антибиотикограмм *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* выявило наличие у каждого из этих видов бактерий субпопуляций, устойчивых к отдельным антибактериальным препаратам, и полиантибиотикорезистентных изолятов. Сравнительная оценка биологической активности эфирных масел в отношении *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* определила, что с различной, но более высокой степенью активности действовали эфирные масла розы крымской и эвкалипта. Значение МПК розы крымской составило 1,95 мкл/мл для всех изученных бактерий, МПК эвкалипта различались: в отношении *A. baumannii* – 0,97 мкл/мл, *S. maltophilia* и *P. aeruginosa* – 3,9 мкл/мл, *K. pneumoniae* – 7,8 мкл/мл. В концентрации 1,95 мкл/мл 100,0 % гибель клеток *S. maltophilia* и *A. baumannii* обеспечили масла мяты сорта Прилукская карвонная и лаванды. Анализ кинетических моделей свидетельствует о наличии положительных корреляционных связей ростовых характеристик бактерий с уровнем бактериостатического действия эфирных масел при $p < 0,05$. Удлинение лаг-фазы ростового цикла сопровождалось увеличением степени подавления бактериального роста: сильно выраженная связь определена для *K. pneumoniae* ($R=0,92$), *P. aeruginosa* ($R=0,83$), *S. maltophilia* ($R=0,76$), *A. baumannii* ($R=0,73$) (табл. 2). При значительной концентрации компонентов, проявляющих самостоятельную высокую антимикробную активность, наблюдается корреляция между содержанием в маслах и ингибированием ими роста бактерий: полная функциональная связь определена для *S. maltophilia* и *A. baumannii* под воздействием на них масел, содержащих линалоол в концентрации выше 68,4 % ($R=1,0$).

Таблица 2. Бактериостатическая активность эфирных масел
(метод анализа кинетики роста в жидкой среде)

Источник эфирного масла	<i>S. maltophilia</i>			<i>A. baumannii</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>K. pneumoniae</i>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Мята Прилукская карвонная	0,48	56,6	125,0	1,95	71,5	126,7	3,9	11,7	48,3	3,9	39,3	16,7
Мята Заграва	1,95	52,3	176,6	1,95	76,0	81,7	3,9	19,3	63,3	3,9	183,	27,0
Мята Бергамотная	1,95	20,3	80,0	1,95	39,3	40,0	3,9	14,7	61,7	3,9	86,7	19,0
Мята Оксамитовая	1,95	41,6	98,3	1,95	53,0	42,5	3,9	10,0	46,7	3,9	65,0	21,0
Мята Украинская перечная	1,95	28,0	140,0	1,95	48,0	63,3	3,9	12,3	73,3	3,9	33,3	19,3
Роза крымская	0,97	83,25	195,6	0,97	50,7	71,7	0,97	82,8	233,	0,9	113,	46,0
Роза болгарская	1,95	26,0	86,7	1,95	32,8	0,0	3,9	0,0	33,3	3,9	0,0	0,0
Эвкалипт	1,95	67,6	613,3	0,48	87,7	457,5	1,95	41,0	333,	3,9	146,	42,0
Лаванда	1,95	38,6	171,25	0,97	54,7	211,7	3,9	57,3	233,	3,9	185,	56,0
Розовое дерево	1,95	39,3	71,7	1,95	45,7	132,5	3,9	10,0	60,0	3,9	0,0	0,0
Пихта	1,95	0,0	38,3	1,95	38,7	57,5	3,9	0,0	61,7	3,9	0,0	0,0

Примечание: 1 – концентрация эфирного масла, мкл/мл; 2 – гибель бактериальных клеток, %; 3 – время удлинения лаг-фазы ростового цикла в периодической культуре, минуты.

ВЫВОДЫ

1. Определены доминирующие в стационаре грамотрицательные бактерии: 21,7 % *Pseudomonas aeruginosa*, 20,2 % *Klebsiella pneumoniae*, 20,0 % *Acinetobacter baumannii*, 9,3 % *Stenotrophomonas maltophilia*, характеризующиеся общими свойствами, существенными для госпитальной среды обитания: способностью к неспецифической колонизации биотопов пациентов, при которой 40,0 % изолятов этих бактерий были выделены из нижних дыхательных путей и 41,0 % – раневой поверхности; формированием в 79,1 % случаев монокультур в очагах колонизации ($p < 0,05$).

2. Впервые на основании сходных фенотипических характеристик и молекулярно-генетического анализа выявлены и дифференцированы между собой антибиотикорезистентные субпопуляции бактерий: 19,8 % изолятов *Acinetobacter baumannii* включали 3 морфологических типа, несущих ген β -лактамазы типа OXA-40, различающихся способностью вызывать потемнение столбика МПА до коричневого оттенка и чувствительностью к нетилмицину, тобрамицину,

тигециклину; 19,7 % изолятов *Pseudomonas aeruginosa* не синтезировали пиоцианин и несли гены металло-β-лактамазы типа VIM.

3. На фоне потенциальной неэффективности 23 антибиотиков в отношении изученных бактерий впервые установлено антибактериальное действие эфирных масел и их компонентов и показано, что *Stenotrophomonas maltophilia* и *Acinetobacter baumannii* проявили чувствительность к эфирным маслам и индивидуальным соединениям в большей степени, чем *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*; минимальные подавляющие концентрации составили 1,95 мкл/мл для эфирного масла розы крымской в отношении всех тест-объектов; 0,97 мкл/мл для эвкалипта – *Acinetobacter baumannii*; 0,24 мкл/мл для цитраля – *Stenotrophomonas maltophilia*.

4. Оценка бактериостатического действия эфирных масел с помощью построения кинетических моделей роста выявила достоверные положительные корреляции между удлинением логарифмической фазы ростового цикла под воздействием различных концентраций эфирных масел от 0,49 мкл/мл до 3,9 мкл/мл и степенью подавления роста бактериальных клеток, $R=0,73$ при $p < 0,05$.

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ И РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предлагаемый алгоритм бактериологической диагностики, включающий определение степени неоднородности бактериальных популяций в стационаре на основании неспецифических видовых биохимических тестов и распределения значений МПК антибиотиков в отношении выделенных изолятов; выявление морфологических типов бактерий по совокупности фенотипических признаков и

антибиотикорезистентности; контроль популяций в сезонной и годовой динамике рекомендован для оптимизации индикации нозокомальных штаммов бактерий.

2. Модифицированная нами методика определения активности эфирных масел и летучих соединений в отношении бактерий, основанная на сравнительном изучении кинетических моделей их роста в контрольных средах и в средах с испытываемыми субстанциями, может быть рекомендована как наиболее информативная вместо традиционных методик диффузии в агаровую среду и серийных разведений в жидкой среде.

3. Эфирные масла розы крымской, эвкалипта, лаванды, мяты сортов Прилукская карвонная, Загравы, Оксамитовая, Бергамотная и их компоненты β -фенилэтанол, цитраль, линалоол, нерол с высокой антимикробной активностью в концентрациях 0,24 – 1,95 мкл/мл, а также синергетические комбинации масел мяты сортов Заграва и Оксамитовая с аминогликозидами и β -лактамами могут служить перспективным дополнением к антибактериальным средствам, целенаправленно воздействуя на антибиотикорезистентные грамотрицательные бактерии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, входящих в «Перечень рецензируемых журналов», рекомендованный ВАК РФ

1. **Маркелова Н.Н.**, Хотько Н.И. Особенности носительства *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* у детей с хроническими заболеваниями верхних дыхательных путей // *Фундаментальные исследования*, 2013. – № 3, часть 1. – С.110-113.
2. **Маркелова Н.Н.**, Семенова Е.Ф., Шпичка А.И., Моисеева И.Я., Родина О.П. Мониторинг чувствительности некоторых возбудителей оппортунистических инфекций к современным препаратам антибиотиков различного происхождения // *Научные ведомости БелГУ: Естественные науки*, 2014. – № 23(194), вып. 29. – С.105-111.
3. **Маркелова Н.Н.**, Семёнова Е.Ф. Сравнительная характеристика некоторых грамотрицательных возбудителей внутрибольничных инфекций и возможные пути преодоления их антибиотикорезистентности // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*, 2016. – № 2.
4. **Маркелова Н.Н.**, Семёнова Е.Ф., Моисеева И.Я., Родина О.П. Мониторинг нозокомиальных патогенов *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* в стационаре // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*, 2016. – № 3.
5. **Маркелова Н.Н.**, Семёнова Е.Ф. Особенности ростового цикла некоторых неферментирующих грамотрицательных бактерий при воздействии эфирных масел различного происхождения // *Микробиология*, 2016 (в печати).

Статьи, опубликованные в зарубежных изданиях на английском языке

1. **Markelova N.N.**, Khotko N.I. Monitoring of microbiological profile among children treated in a cardiosurgical centre as a system of prevention of infectious postoperative complications // *Materials digest of the XXX International Research and Practice Conference and the II Stage of the Championship in medical and pharmaceutical sciences «Modern medicine and pharmaceuticals: actual problems and prospects of development»* London, August 16 – August 23. 2012. P.43-45.

2. **Markelova N.N.**, Khotko N.I., Smolkova Yu.E. Carbapenem therapy as a selective factor of colonisation by carbapenem-resistant microorganisms of biotopes of patient treated in a resuscitation department // Materials digest of the LXIX International Research and Practice Conference and the III Stage of the Championship in medical and pharmaceutical sciences «Modern medicine and pharmaceuticals: actual problems and prospects of development» London, November 14 – November 20. 2013. P.43-46.

Статьи, опубликованные в других научных периодических изданиях

1. **Маркелова Н.Н.**, Хотько Н.И. Микробиологический мониторинг в системе инфекционного контроля в стационаре хирургического профиля // Вестник гематологии, 2012. – Том VIII (№1). – С. 61.
2. **Маркелова Н.Н.**, Семенова Е.Ф., Шпичка А.И., Жученко Е.В. Влияние эфирных масел на микроорганизмы различной таксономической принадлежности в сравнении с современными антибиотиками. Сообщение I: Действие розового эфирного масла и антибиотических субстанций на некоторые грамотрицательные бактерии // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Серия «Естественные науки», 2014. – № 3 (7). – С. 39-48.
3. Семенова Е.Ф., **Маркелова Н.Н.**, Жученко Е.В., Шульга Е.Б., Шпичка А.И. Влияние эфирных масел на микроорганизмы различной таксономической принадлежности в сравнении с современными антибиотиками. Сообщение II: Действие мятного эфирного масла различного компонентного состава на некоторые грамотрицательные бактерии // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Серия «Естественные науки», 2014. – № 4 (8). – С. 5-18.
4. Жученко Е.В., Семенова Е.Ф., **Маркелова Н.Н.**, Шпичка А.И. Влияние эфирных масел на микроорганизмы различной таксономической принадлежности в сравнении с современными антибиотиками. Сообщение III: Действие масел лаванды, розового дерева, эвкалипта, пихты на некоторые грамотрицательные бактерии // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Серия «Естественные науки», 2015. – № 1 (9). – С. 31-42.

Статьи в материалах международных конференций

1. **Маркелова Н.Н.**, Дмитриев А.П., Хотько Н.И. Научно-практические аспекты здоровьесберегающего направления – профилактики внутрибольничных инфекций // Сборник статей IX Международной научно-практической конференции «Экология и ресурсосберегающие технологии на предприятиях народного хозяйства». Пенза: Приволжский Дом знаний, 2009. – С. 71-73.
2. **Маркелова Н.Н.**, Дмитриев А.П., Итяева Л.Н., Хотько Н.И. Автоматизация биологической индикации в лечебно-профилактических учреждениях как способ оптимизации микробиологического мониторинга, профилактики и лечения инфекционных болезней // Сборник статей IX Международной научно-практической конференции «Экология и ресурсосберегающие технологии на предприятиях народного хозяйства». Пенза: Приволжский Дом знаний, 2009. – С. 74-76.
3. **Маркелова Н.Н.**, Хотько Н.И., Дмитриев А.П. Информативность некоторых экологических факторов персистирующей микрофлоры миндалин при диагностике инфекционного заболевания // Сборник статей X Международной научно-практической конференции «Окружающая природная среда и экологическое образование и воспитание». Пенза: Приволжский Дом знаний, 2010 – С. 39-41.
4. **Маркелова Н.Н.**, Дмитриев А.П. К проблеме критериальной оценки степени микробного загрязнения окружающей среды // Материалы Международной научно-практической конференции «Современные проблемы отечественной медико-биологической и фармацевтической промышленности. Развитие инновационного и кадрового потенциала Пензенской области». Пенза: Изд-во ПГУ, 2011. – С. 602-604.
5. **Маркелова Н.Н.**, Хотько Н.И., Еремин В.И. Вопросы частоты выделения и чувствительности к антибиотикам грамотрицательной микрофлоры у гематологических больных // Материалы Международной научно-практической конференции «Современные проблемы отечественной медико-биологической и фармацевтической промышленности. Развитие инновационного и кадрового потенциала Пензенской области». Пенза: Изд-во ПГУ, 2012. – С. 478-483.

Статья в материалах всероссийской конференции

1. **Маркелова Н.Н.**, Семенова Е.Ф. Микробиологический мониторинг *Pseudomonas aeruginosa* в отделениях реанимации и интенсивной терапии // Материалы 78-й итоговой студенческой научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 95-летию со дня рождения профессора Ю.М. Лубенского. 22 – 25 апреля 2014 года. Красноярск: Тип. КрасГМУ, Версо, 2014. – С. 391-393.