

УДК: 616/24-002

[https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-15\(33\)-994-1004](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-15(33)-994-1004)

Багнюк Наталія Анатоліївна аспірантка кафедри мікробіології, вірусології та імунології, Вінницький Національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, вул. Пирогова 56, м. Вінниця, 21018, тел.: (095)-578-15-39, <https://orcid.org/0000-0003-4224-4356>

Бобир Наталія Анатоліївна асистент кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, проспект Берестейський, 34, м. Київ, 01601, тел.: (093) 551-70-11, <https://orcid.org/0000-0003-0469-2449>

Назарчук Олександр Адамович доктор медичних наук, професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології, Вінницький Національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, вул. Пирогова 56, м. Вінниця, 21018, тел.: (097)-729-37-61, <https://orcid.org/0000-0001-7581-0938>

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ СПРЯМОВАНОГО ІНГАЛЯЦІЙНОГО ЗАСТОСУВАННЯ АНТИСЕПТИКА ДЕКАМЕТОКСИНУ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ РЕСПІРАТОРНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ У МИШЕЙ

Анотація. Останнім часом серед лікарняних штамів мікроорганізмів, які викликають інфекційні ускладнення органів дихання, реєструють зростання випадків резистентності до найбільш вживаних в медичній практиці антибактеріальних препаратів, що суттєво позначається на ефективності їх використання. В розрізі даної проблеми актуальним залишається дослідження протимікробної ефективності альтернативних антисептичних препаратів для обґрунтування їх застосування в комплексному раціональному лікуванні інфекційно-запальних процесів організму людини органів, зокрема органів дихання.

В роботі шляхом експериментального моделювання респіраторних бактеріальних інфекцій у білих мишей досліджено протимікробну ефективність лікарського антисептичного засобу декаметоксину та показано, що інгаляційне застосування даного препарату супроводжується вираженою протимікробною активністю.

Експериментально доведено, що при моделюванні ацинетобактерної та стафілококової інфекцій у тварин, яким інгаляційно вводили антисептик декаметоксин спостерігались значно менші показники летальності. Крім того, показано, що у групах тварин, які інгаляційно отримували декаметоксин рівень бактеріального навантаження у легенях був статистично нижчим.

Таким чином, інгаляційне застосування препарату на основі декаметоксину відкриває широкі перспективи його застосування в лікуванні інфекційних ускладнень органів дихання.

Зроблене аргументоване припущення, що інгаляційне застосування антисептика декаметоксину при експериментальних моделях респіраторних бактеріальних інфекцій у мишей вказує на його високу протимікробну ефективність та відкриває широкі перспективи застосування даних препаратів в профілактиці та лікуванні інфекційних ускладнень органів дихання, спричинених антибіотикорезистентними штамми ацинетобактерій та стафілококів.

Ключові слова: антисептики, декаметоксин, антибіотики, резистентність, пневмонія, моделювання, умовно патогенні мікроорганізми, госпітальні інфекції.

Bahniuk Nataliia Anatoliyivna National Pirogov Memorial Medical University, Department of Microbiology, PhD student, Pirogov St., 56, Vinnytsya, 21018, tel.: (095)-578-15-39, <https://orcid.org/0000-0003-4224-4356>

Bobyр Nataliia Anatoliyivna Assistant, Bogomolets National Medical University, microbiology, departments of microbiology and parasitology with basics, Beresteisky Ave., 34, Kyiv, 01601, tel.: (093) 551-70-12, <https://orcid.org/0000-0003-0469-2449>

Nazarchuk Oleksandr Adamovych Doctor of Science, Professor, National Pirogov Memorial Medical University, Department of Microbiology, Professor, Pirogov St., 56, Vinnytsya, 21018, tel.: (097)-729-37-61, <https://orcid.org/0000-0001-7581-0938>.

STUDY OF THE EFFICIENCY OF DIRECTED INHALATION APPLICATION OF THE ANTISEPTIC DECAMETOXIN IN THE MODELING OF RESPIRATORY BACTERIAL INFECTIONS IN MICE

Abstract. Recently, among the hospital strains of microorganisms which cause infectious complications of the respiratory system, there has been an increase in cases of resistance to the antibacterial drugs most commonly used in medical practice, that significantly influences on the effectiveness of their use. In the context of this problem, the study of the antimicrobial effectiveness of alternative antiseptic drugs to justify their use in the complex rational treatment of infectious and inflammatory processes of the human body remains relevant, particularly the respiratory organs.

In the study, the antimicrobial effectiveness of the medicinal antiseptic decamethoxine was investigated by means of experimental modelling of respiratory

bacterial infections in white mice. There was shown that inhalation use of this drug is accompanied by pronounced antimicrobial activity.

There has been experimentally proven the significantly lower mortality rates among animals with simulated respiratory acinetobacter and staphylococcal infections, which were administered inhalation of decamethoxine antiseptic. In addition, it was shown that the bacterial load in the lungs was statistically lower in groups of animals that received inhaled decamethoxine.

Thus, the inhalation use of the drug based on decamethoxine opens wide prospects for its use in the management of infectious complications of the respiratory organs.

A well-argued assumption is made that the inhalation use of decamethoxin antiseptic in experimental models of respiratory bacterial infections in mice indicates its high antimicrobial efficiency and opens up broad prospects for the use of these drugs in the prevention and treatment of infectious complications of the respiratory organs caused by antibiotic-resistant strains of acinetobacter and staphylococci.

Keywords: antiseptics, decamethoxine, antibiotics, resistance, pneumonia, modeling, conditionally pathogenic microorganisms, hospital infections.

Постановка проблеми. В сучасних умовах інфекційні ускладнення органів дихання пацієнтів часто пов'язані з умовно-патогенними мікроорганізмами, які набули резистентності до широкого спектру протимікробних засобів [1].

Однією із важливих особливостей збудників інфекційних ускладнень органів дихання є формування у них резистентності до хіміотерапевтичних препаратів. З кожним роком зростає адаптаційна здатність збудників інфекцій до виживання в умовах лікарні, а широке та інколи безконтрольне застосування антибіотиків призвело до зниження ефективності антибіотикотерапії і відповідно суттєвого звузило можливості в боротьбі з резистентними ізолятами мікроорганізмів [2-4].

В таких умовах сьогодні перспективним вважають застосування антисептичних засобів, які володіють широким спектром протимікробної дії. Серед відомого переліку зареєстрованих в Україні антисептичних лікарських препаратів для профілактики та лікуванні інфекційних процесів, ґрунтовно дослідженими та детально вивченими є антисептики на основі основної діючої речовини декаметоксину [5].

Разом з тим, не зважаючи на доведену високу протимікробну активність антисептичних препаратів, питання протимікробної активності даних препаратів по відношенню до провідних збудників інфекцій органів дихання залишається відкритим. Дослідження в даному напрямку є вкрай важливими, вони можуть сприяти науковому обґрунтуванню вибору раціональної антисептикотерапії в клінічній практиці [6-7].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Моделюванням респіраторних бактеріальних інфекцій у білих мишей шляхом інтраназальної інокуляції та

інтратрахеальної інстиляції викликаної клінічними ізолятами MDR *A. baumannii* займалися італійські науковці Gabriella Bergamini, Maria Elisa Perico, Stefano Di Palma [8]. Однак, проблема залишається не вивченою до кінця.

Мета статті. Експериментально дослідити протимікробну ефективність інгаляційного введення лікарського антисептичного засобу декаметоксину шляхом моделювання респіраторних бактеріальних інфекцій у лабораторних тварин, спричинених збудниками інфекцій, пов'язаними з наданням медичної допомоги.

Матеріали і методи. Експериментальною моделлю слугували білі миші лінії BALB/c, вагою 18-29 г, розведені у віварії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Тварин утримували в умовах, що відповідали «Санітарним правилам щодо устрою, обладнання та утримання експериментально-біологічних клінік (віваріїв)», на раціоні, що включав гранульований комбікорм для лабораторних тварин (рец. ПКп 1-24).

Тварини утримували в полікарбонатних клітках з кришками із оцинкованої сталі і скляними поїлками для води, в кожній клітці утримували по 10 тварин. Клітки з тваринами знаходились в боксованих приміщеннях, в яких підтримувались наступні умови: температура 20-24°C, вологість – 30-60%, 12-годинний світловий день. Для дослідження дії антисептика на організм лабораторних тварини, клітки поміщали в спеціальні камери інгаляційного впливу – затравочні камери, які дозволяють задати чітко визначені параметри (концентрацію препарату та експозицію) (рис. 1). Для їх знезараження використовували ультрафіолетові бактерицидні лампи. В якості антисептика використовували антисептик Декасан (містить 0,02 % декаметоксину). Тривалість експозиції антисептика становила 15 хв, концентрація 0,2 мг/мл.



Рис. 1. Камера інгаляційного впливу.

В досліджах використовували культури *Staphylococcus aureus* (DXA-90) та *Acinetobacter baumannii* OXA 72 (DXR-30), одержані з музею живих культур клінічних штамів мікроорганізмів бактеріологічної лабораторії кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. *S. aureus* володів метицилінрезистентністю та водночас був стійким до антибіотиків, які застосовують у лікуванні інфекційних ускладнень органів дихання. Грамнегативні представники потенційних збудників інфекцій органів дихання, пов'язаних з наданням медичної допомоги, *A. baumannii* OXA 72, які володіли поліантибіотикорезистентністю, у т.ч. були стійкими до карбапенемів.

Інфікування тварин даними мікроорганізмами здійснювали інтраназально, для цього мишей попередньо поміщали у камери інгаляційного впливу, в яку подавався 100% севофлуран, змішаний з киснем.

Для моделювання кожної інфекції використано по 90 тварин, які були поділені на 5 груп (4 дослідні по 20 осіб та 1 контрольна, яка включала 10 мишей): 1 група – тварини, інтраназально інфіковані клінічним штамом *S. aureus*; 2 група – тварини, інтраназально інфіковані *A. baumannii*; 3 група – тварини, інтраназально інфіковані *S. aureus*, які отримували інгаляційно декаметоксин; 4 група – тварин інтраназально інфіковані *A. baumannii*, які отримували інгаляційно декаметоксин; 5 група – контроль, інтактні тварини. Всього у досліді було використано 190 тварин.

Після появи у тварин ознак впливу наркозу, бактеріальні суспензії (50 мкл) *A. baumannii* або *S. aureus* поступово випускали в ніздрі за допомогою мікропіпетки. Для *A. baumannii* інфікуюча доза становила 3×10^8 (розрахунок інфікуючої дози не проводили, а спирались на дані, отримані іншими дослідниками [8]). Для *S. aureus* цей показник становив 2×10^9 . Швидкість вивільнення регулювали так, щоб миша могла вдихнути посів. Щоб забезпечити послідовні інфікування, мишей тримали вертикально під час процедури і ще пару хвилин, поки дихання поступово не нормалізувалося.

Протягом усього періоду експерименту спостерігали за дослідними та контрольними тваринами та визначали масу тіла, спостерігали за споживанням корму і води, за загальним станом, зміною координації, станом шерсті, фіксували зменшення поголів'я у дослідних групах за рахунок смерті, реєстрували інші клінічні ознаки.

Результати досліджень були оброблені статистично з використанням програмного забезпечення для статистичного аналізу Microsoft Excel 2016 та «Statistica 5.5». Аналіз вірогідності проводили за t-критерієм Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично значимою при ймовірності нульової гіпотези менше 5% ($p < 0,05$).

Виклад основного матеріалу. Результати експериментальних досліджень дозволили показати можливість моделювання ацинетобактерної та стафілокової інфекцій у мишей шляхом інтраназального введення даних мікроорганізмів тваринам, які знаходяться під дією інгаляційного наркозу.

Встановлено, що інтраназальне введення антисептику декаметоксину сприяє зниженню летальності при моделюванні у тварин ацинетобактерної і стафілококової інфекцій. Так, при використанні декаметоксину в процесі моделювання стафілококової інфекції летальність тварин зменшилась з 57% до 27%, натомість при моделюванні ацинетобактерної інфекції ці показники становили 42% та 25% відповідно (табл. 1).

Крім того, при оцінці результатів моделювання ацинетобактерної інфекції були враховані такі показники як зниження ваги, зниження активності, відсутність апетиту, скуповдженість шерсті тварин, діарея. Слід відмітити, що частота реєстрації зазначених показників в цілому знижується у тварин, які в процесі моделювання як ацинетобактерної, так і стафілококової інфекції отримували декаметоксин.

Важливо зауважити, що при використанні антисептику при моделюванні стафілококової інфекції найбільша кількість тварин гинула на 7-9 добу, разом з тим – у дослідній групі, яка не отримувала декаметоксин, найбільша кількість загиблих тварин реєструвалась на 3-6 добу. Подібна закономірність відмічалась і в групі тварин зі змодельованою ацинетобактерною інфекцією, у цьому випадку найвищі показники летальності серед мишей дослідної групи тварин, яка отримувала декаметоксин, спостерігались на 6-7 добу, проте в дослідній групі тварин інфікованих ацинетобактер, які не отримували декаметоксин, цей термін скорочувався на 2-3 доби, найвища летальність у даному випадку спостерігалась на 4-5 добу.

Таблиця 1.

Загальні (остаточні) показники ефективності використання Декасану при моделюванні стафілококової та ацинетобактерної інфекції у мишей

		Група тварин, інфікованих <i>S. aureus</i> (n=80)		Група тварин, інфікованих <i>A. baumannii</i> (n=80)	
		Тварини, які отримували Декасан (n=40)	Тварини, які не отримували Декасан (n=40)	Тварини, які отримували Декасан (n=40)	Тварини, які не отримували Декасан (n=40)
Прояв хвороби	Діарея	5 (n=1)	12,5 (n=5)	5 (n=2)	15 (n=6)
	Відсутність апетиту	45 (n=18)	75 (n=30)	47,5 (n=19)	80 (n=32)
	Зниження активності	65 (n=26)	95 (n=38)	52,5 (n=21)	82,5 (n=33)
	Зниження ваги	52,5 (n=21)	82,5 (n=33)	60 (n=24)	85 (n=34)
	Скуповдженість шерсті	50 (n=20)	70 (n=28)	55 (n=22)	77,5 (n=31)
Летальність		27,5 (n=11)	57,5 (n=23)	25,0% (n=10)	42,5% (n=17)

Примітка. Цифрами у таблиці позначено середню частоту виявлення ознаки, %.

В процесі досліджень встановлено, що моделювання вказаних вище інфекційних процесів супроводжується зниженням ваги тварин. Так, при моделюванні у мишей інфекції, викликаній *A. baumannii* найнижчі середні показники ваги в цій групі тварин спостерігались на 7 добу і становили 14,1 г (в контрольній групі 20,6 г) (рис. 2), хоча у деяких тварин інфекція супроводжувалась різким зниженням ваги аж до 12,8 г. Водночас, у групах тварин які отримували декаметоксин показники втрати ваги були не такі виражені, на 7 добу після інфікування середні показники ваги даної групи тварин становили 15,8 г, а найменша вага складала 15,5 г.

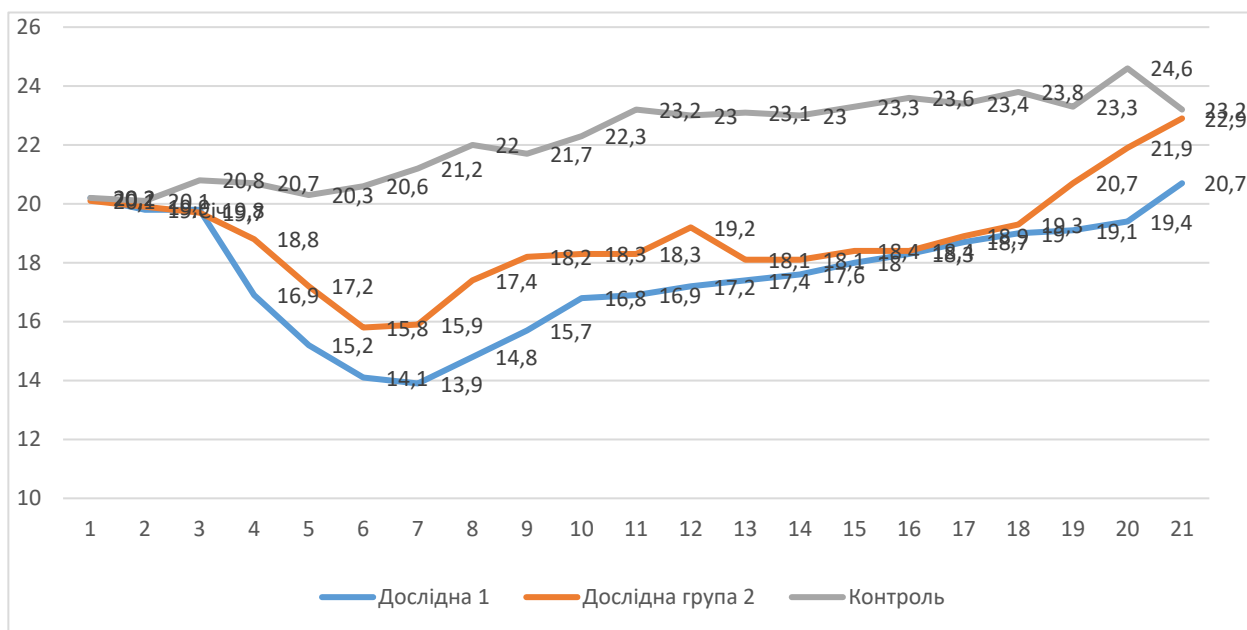


Рис. 2. Динаміка зміни ваги в групах тварин, інфікованих *A. baumannii*

Примітка: Дослідна група 1 – тварини, інтраназально інфіковані *A. baumannii*; дослідна група 2 – тварини, інтраназально інфіковані *A. baumannii*, які отримували інгаляційно антисептик Декасан; дослідна група 3 - контрольна, інтактні тварини.

Близькими до попередніх є результати досліджень динаміки втрати ваги у дослідних групах тварин, інфікованих *S. aureus*. В даному випадку слід відмітити, що моделювання стафілококової інфекції у тварин теж супроводжується зниженням їх ваги, при цьому найбільш вражені показники зниження ваги в цій групі тварин відмічались на 8 добу від початку моделювання. В цей період середній показник ваги тварин в дослідній групі становив 14,1 гр. (в інтактній групі - 21,2 г) (рис. 3). Разом з тим, в цей період в дослідній групі тварин, які профілактично отримували декаметоксин, показники зниження ваги були не такі виражені, середня вага становила 15,3г.

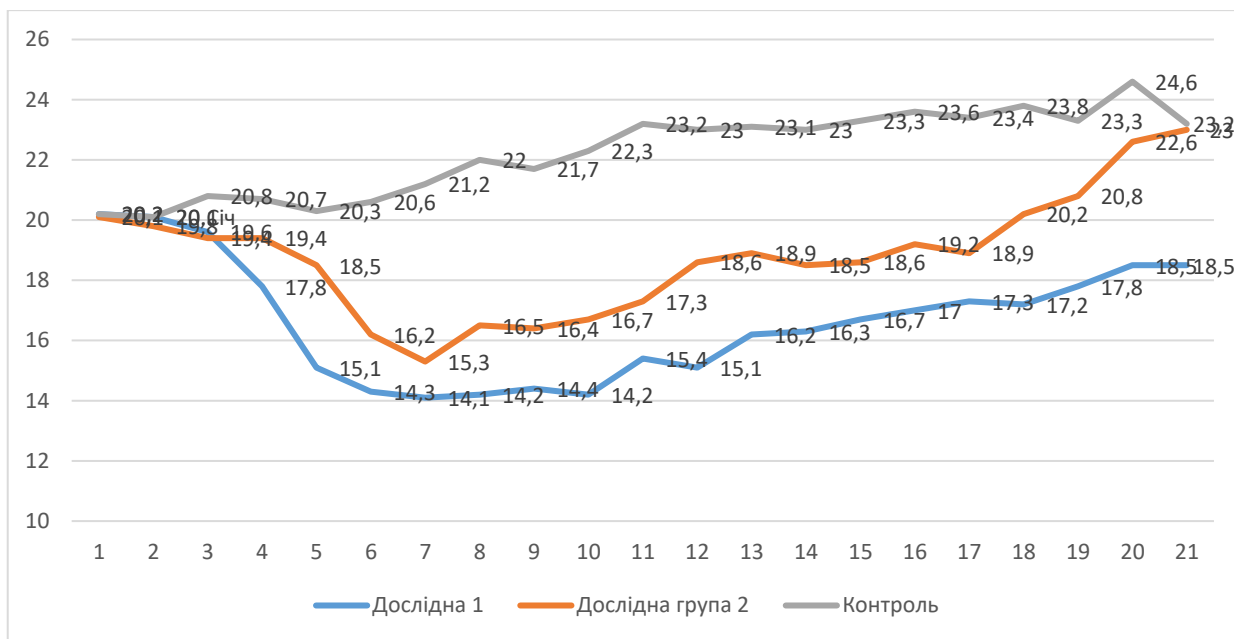


Рис. 3. Динаміка зміни ваги в групах тварин, інфікованих *S. aureus*

Примітка: Дослідна група 1 – тварини, інтраназально інфіковані *S. aureus*; дослідна група 2 – тварини, інтраназально інфіковані *S. aureus*, які отримували інгаляційно антисептик Декасан; дослідна група 3 -контрольна, інтактні тварини.

В контексті вивчення даної проблеми, важливо, на наш погляд, було визначити як профілактичне інгаляційне використання антисептику впливає на рівень мікробного навантаження у внутрішніх органах тварин. Ці цією метою на 5 добу після зараження мишей вище зазначеними мікроорганізмами проводили визначення бактеріального навантаження їх внутрішніх органів (легень та печінки). Для цього по 4 тварини з кожної групи виводили з дослідження. Легені та печінку видаляли асептично. Легені поміщали в попередньо зважені пробірки, що містять 4 мл стерильного фізіологічного розчину, а потім подрібнювали за допомогою спеціального гомогенізатора. Десятикратні розведення гомогенатів, висівали на ЖСА або МПА (залежно від збудника, який використовувався для моделювання інфекційного процесу у групі тварин) та інкубували протягом ночі при 37°C.

Як показано в табл. 2, на другу добу інфікування тварин *A. baumannii* збудник виділявся з легень в концентрації $1,2 \pm 0,4 \times 10^2$, водночас з легень тварин дослідної групи №2 – тварин які попередньо отримували антисептик декаметоксин в інгаляційній формі, даного збудника виділено не було. Слід відмітити, що в цей період *S. aureus* нам не вдалось виділити з легене тварин обох дослідних груп. Разом з тим, в зразках внутрішніх органів легень, одержаних на 5 добу відмічалась присутність як *A. baumannii*, так і *S. aureus*, проте титри збудників у зразках, отриманих від тварин, які попередньо отримували декаметоксин були значно нижчими.

Водночас слід відмітити, що не дивлячись на те, що очевидно моделювання як ацинетобактерної, так і стафілококової інфекції супроводжується

змiнами з боку печiнки, видiлити як одного, так i iншого збудника з даного органу нам не вдалось нi на другу, нi на 5 добу пiсля iнфiкування.

Таблиця 2

Вплив антисептика декаметоксину рiвень бактерiального навантаження в легенях

Доба	Рiвень бактерiального навантаження в легенях (КУО/Г)			
	Iнфiкованi <i>S. aureus</i>		Iнфiкованi <i>A. baumannii</i>	
	дослiдна група №1 (n=4)	дослiдна група №2 (n=4)	дослiдна група №1 (n=4)	дослiдна група №2 (n=4)
2	0	0	$1,2 \pm 0,4 \times 10^2$	0
5	$2,0 \pm 0,4 \times 10^4$	$1,0 \pm 0,2 \times 10^2$	$1,8 \pm 0,4 \times 10^4$	$2,4 \pm 0,2 \times 10^2$
Серед загиблих	$1,0 \pm 0,2 \times 10^5$	$1,0 \pm 0,2 \times 10^5$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^5$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^4$

Примiтка: дослiдна група №1 – iнфiкованi тварини; дослiдна група №2 – iнфiкованi тварини, якi отримували антисептик Декасан.

Висновки. За умов iнгаляцiйного введення антисептика декаметоксину у лабораторних тварин зi змодельованою ацинетобактерною та стафiлоковою iнфекцiєю органiв дихання спостерiгаються достовiрно зниження показникiв летальностi. При ацинетобактернiй iнфекцiї показник летальностi зменшувався на 17%, а при стафiлококової iнфекцiї показник летальностi був на 30% меншим у порiвняннi з контролем, що також супроводжувалося закономірним зменшенням рiвня бактерiального навантаження у легенях тварин, якi отримували антисептик. Крім того, слiд вiдмитити, що моделювання вказаних вище iнфекцiйних процесiв супроводжується достовiрно нижчими показниками зниження ваги, дiареї, вiдсутностi апетиту, зниження активностi та скуйовдженостi шерстi пiддослiдних тварин.

Таким чином, можна зробити аргументоване припущення, що iнгаляцiйне застосування антисептика декаметоксину при експериментальних моделях респiраторних бактерiальних iнфекцiй у мишей вказує на його високу протимiкробну ефективностi та вiдкриває широкi перспективи застосування даних препаратiв в профiлактицi та лiкуваннi iнфекцiйних ускладнень органiв дихання, спричинених антибиотикорезистентними штамми ацинетобактерiй та стафiлококив.

Лiтература:

1. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva, Switzerland, 2014.

2. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrugresistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definition for acquired resistance. *Clinical Microbiology Infection*. 2012; 18(3): 268-81.
3. Ayisi L.A, Adu-Sarkodie Y. Extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) production among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Kumasi, Ghana. *J Nat Sci Res*. 2015; 5:81- 6.
4. Nazarchuk O.A. Microbiological and molecular research of the resistance in gram-negative pathogens of infectious complications to carbapenem antibiotics, approaches to its combating. *Moldovan Journal of Health Sciences*. 2017; 13 (3) : 22-32.
5. Палій Г.К, Ковальчук В.П, Фоміна Н.С. Характеристика сучасного арсеналу дезінфекційних засобів та проблеми дезінфектології. *Biomedical and Biosocial Anthropology*. 2014; 22 : 82-85.
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of surgical site infections in Europe 2010–2011. Stockholm: ECDC. 2013 Oct[cited 2018 Aug30]. Available from: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/SSI-in-europe-2010-2011.pdf>
7. World Health Organization. Global Guidelines for the Prevention of Surgical Site Infection [Internet]. Geneva, Switzerland: WHO. 2016. San Francisco: Matthew Holt. 2003 Oct [cited 2018 Aug 30]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250680/9789241549882-eng.pdf;jsessionid=1F8A9546C46F1803027E22A3F82DBEE4?sequence=1>
8. Gabriella Bergamini, Maria Elisa Perico, Stefano Di Palma, Mouse pneumonia model by *Acinetobacter baumannii* multidrug resistant strains: Comparison between intranasal inoculation, intratracheal instillation and oropharyngeal aspiration techniques. Published: December 2, 2021 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260627>

References:

1. World Health Organization (WHO). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva, Switzerland [in English].
2. Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C, et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrugresistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definition for acquired resistance. *Clinical Microbiology Infection*, 18(3), 268-81 [in English].
3. Ayisi, L.A, Adu-Sarkodie, Y. (2015). Extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) production among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Kumasi, Ghana. *J Nat Sci Res.*, 5,81- 6 [in English].
4. Nazarchuk, O.A. (2017). Microbiological and molecular research of the resistance in gram-negative pathogens of infectious complications to carbapenem antibiotics, approaches to its combating. *Moldovan Journal of Health Sciences*, 13 (3), 22-32 [in English].
5. Palij, G.K, Koval'chuk, V.P, Fomina, N.S. (2014). Charakteristika suchasnogo arsenalu dezinfekcijnih zasobiv ta problemi dezinfektologii. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, 22, 82-85 [in Ukrainian].
6. European Centre for Disease Prevention and Control. *Surveillance of surgical site infections in Europe 2010–2011*. Stockholm: ECDC. 2013 Oct[cited 2018 Aug30]. Retrieved from <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/SSI-in-europe-2010-2011.pdf> [in English].
7. World Health Organization. *Global Guidelines for the Prevention of Surgical Site Infection [Internet]*. Geneva, Switzerland: WHO. 2016. San Francisco: Matthew Holt. 2003 Oct [cited 2018 Aug 30]. Retrieved from <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250680/9789241549882-eng.pdf;jsessionid=1F8A9546C46F1803027E22A3F82DBEE4?sequence=1> [in English].

8. Gabriella, Bergamini, Maria, Elisa Perico, Stefano, Di Palma (2021). *Mouse pneumonia model by Acinetobacter baumannii multidrug resistant strains: Comparison between intranasal inoculation, intratracheal instillation and oropharyngeal aspiration techniques*. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260627> [in English].