

## МІКРОБІОЛОГІЧНА, ЕЛЕКТРОННОМІКРОСКОПІЧНА ОЦІНКА ДІЇ ДЕКАСАНУ®, ГОРОСТЕНУ® НА БАКТЕРІЇ

**В.В. Бобир<sup>1</sup>, О.А. Назарчук<sup>2</sup>, Д.В. Палій<sup>2</sup>, О.В. Яцула<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Кафедра мікробіології, вірусології та імунології (зав. - проф. В.П. Широбоков)

<sup>2</sup> Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова

Кафедра мікробіології, вірусології та імунології (зав. - проф. Г.К. Палій)

### Реферат

**Мета.** Дослідити дії декасану®, горостену® на ультраструктуру стафілококів, сальмонел.

**Матеріал і методи.** Дослідження проводили на референс-штамах *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium* 03270 та клінічних штамів *S. aureus* (n 53), *S. typhimurium* (n 15). Визначали чутливість стафілококів, сальмонел до декасану® (ДС®), горостену® (ГС®) стандартним методом двократних серійних розведень. Вплив ДС®, ГС® на ультраструктуру бактерій проводили за допомогою електронної мікроскопії з використанням електронного мікроскопу Jeol JEM 100 CX II (Японія). Статистичне опрацювання проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2007.

**Результати й обговорення.** Визначали мінімальні бактеріостатичні концентрації ДС®, ГС® щодо штамів *S. aureus* в присутності МБсК, що не перевищували 0, 12 та 0,19 мкг/мл, відповідно. Бактерицидну дію на *S. aureus* визначали в присутності 2,68±0,29 мкг/мл. Штам *S. typhimurium* 03270 виявився більш витривалим до дії ДС®, ГС® бактерицидні концентрації не перевищували 35,94±7,29 мкг/мл. Відмінностей чутливості штамів *S. aureus* та *S. typhimurium* до ДС®, ГС® встановлено не було ( $p > 0,05$ ). Контрольні зразки *S. aureus* мали типову ультраструктурну організацію. Електронномікроскопічні дослідження двогодинного впливу бактеріостатичних концентрацій ДС®, ГС® на бактерії засвідчили глибокі пошкодження морфології останніх. Зміни ультраструктури *S. aureus* та *S. typhimurium* супроводжувались поліморфізмом клітин, пошкодженням їх оболонки, втратою типової структури, відшарування клітинної стінки з наступним виходом вмісту протоплазми, пригніченням поділу клітин, появою лізису клітин.

**Висновок.** Антисептичні лікарські засоби ДС®, ГС®, виявляють високі протимікробні властивості щодо штамів *S. aureus*, *S. typhimurium*, не відрізняючись за ефективними бактеріостатичними, бактерицидними властивостями ( $p > 0,05$ ); в бактеріостатичних концентраціях чинять глибокі зміни ультраструктури бактерій.

**Ключові слова:** декасан®, горостен®, електронна мікроскопія, бактерії, стафілокок, сальмонела

### Abstract

MICROBIOLOGICAL, ELECTRONIC MICROSCOPY EVALUATION OF THE ACTION OF DECASAN® AND HOROSTEN® ON BACTERIA

V.V. BOBYR<sup>1</sup>, O.A. NAZARCHUK<sup>1</sup>, D.V. PALIY<sup>2</sup>, O.V. YATSULA

<sup>1</sup>The O.O. Bohomolets National Medical University in Kyiv

<sup>2</sup>The M.I. Pyrohov National Medical University in Vinnytsya

**Aim.** The research was to study the action of Decasan® and Horosten® on ultra structure of Staphylococci and Salmonellas.

**Material and Methods.** The research was carried out on reference strains of *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium* 03270 and clinical isolates of *S. aureus* (n 53), *S. typhimurium* (n 15). The sensitivity of Staphylococci and Salmonellas to Decasan® (DC) and Horosten® (HR) was studied by means of standard serial dilution method. The influence of DC and HR on the ultra structure of bacteria was studied by means of electronic microscopy, using electronic microscope Jeol JEM 100 CX II (Japan). Statistical analysis was carried out using Microsoft Excel 2007.

**Results and Discussion.** Minimal inhibitory concentrations of DC and HR against strains of *S. aureus* were found to be lower than 0,12 ma 0,19 mkg/ml, respectively. Bactericidal action against *S. aureus* was found when 2,68±0,29 mkg/ml of antiseptics were used. *S. typhimurium* 03270 was found to be more resistant to DC and HR as their bactericidal concentrations were lower than 35,94±7,29 mkg/ml. No difference was found between sensitivity of *S. aureus* and *S. typhimurium* to DC and HR ( $p > 0,05$ ). Control samples of *S. aureus* obtained their typical ultra structure. The electronic research after two hour exposure to minimal inhibitory concentrations of DC and HR demonstrated huge morphological damage in bacteria. Changes of ultra structure in *S. aureus* and *S. typhimurium* were accompanied by cell polymorphism; loss of their typical structure; damage of their cell wall and its detachment with further protoplasmic efflux; depression of cell division; appearance of cells' lysis.

**Conclusion.** Antiseptic remedies DC and HR demonstrate high antimicrobial qualities against strains of *S. aureus*, *S. typhimurium*, with no difference in their effective inhibitory and bactericidal qualities ( $p > 0,05$ ); their inhibitory concentrations cause pronounced changes in ultra structure of bacteria.

**Key words:** Decasan®, Horosten®, electronic microscopy, bacteria, Staphylococci, Salmonella

### Вступ

Сучасні антисептики мають високу протимікробну дію на бактерії, віруси, гриби та інші групи мікроорганізмів. Проте, їх механізм антимікробної ефективності потребує подальшого вивчення. Накопичений значний досвід успішного

застосування лікарських форм декаметоксину® для профілактики, лікування інфекційних захворювань потребує дослідження суті цих ефектів. В сучасній медичній практиці широко застосовують антисептичні лікарські препарати декасан®, горостен®, які мають свій оригінальний склад [1].

Дослідниками наведено дані ефективних мікробостатичних, мікробоцидних концентрацій щодо збудників захворювань, встановлено високі знезаражуючі властивості декасану®, горостену®, їх біологічну безпечність. Відомо, що механізм дії декаметоксину®, який належить до поверхнево активних четвертинних амонієвих сполук, реалізується за рахунок взаємодії препарату з фосфатидними групами ліпідів цитоплазматичної мембрани різних видів мікроорганізмів, порушуючи її проникність. Необхідно зазначити, що актуальним залишається розширення уявлень про механізм дії лікарських антисептичних препаратів з діючою речовиною декаметоксином® [2].

Важливий науковий інтерес представляє дослідження впливу декасану® (ДС®), горостену® (ГС®) на ультраструктуру клітин грам-позитивних, грамнегативних мікроорганізмів. Накопичені дані, які висвітлюють особливості протимікробної активності антисептика декаметоксину® щодо бактерій, очевидно можуть поширюватись на ширшу популяцію бактерій. Відомо, що мікробна клітина представляє собою складну динамічну систему, компоненти якої постійно взаємодіють з оточуючим середовищем. Водночас із дослідженням бактеріостатичних, бактерицидних властивостей антисептичних засобів на мікроорганізми стандартними мікробіологічними методами, важливо було визначити морфологічні зміни у бактерій. Дослідження впливу антисептичних лікарських засобів на клітину може допомогти розкрити нові дані механізмів антимікробної дії на бактерії, ультраструктурні зміни їх морфології, доповнюючи таким чином уявлення про дію препарату. Сучасним, високоінформативним методом, який дозволяє визначити ультраструктурні зміни морфології бактерій є електронна мікроскопія. [3, 4]. В наш час доцільно поглиблювати уявлення щодо дії ДС®, ГС® на клітини грам-позитивних та грамнегативних бактерій. З цих позицій ціка-

вим було дослідити за допомогою електронної мікроскопії ультраструктурні зміни у *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, які виникають в результаті дії на них ДС®, ГС®.

Мета - дослідження дії декасану®, горостену® на ультраструктуру стафілококів, сальмонел.

### Матеріал і методи

Дослідження проводили на референс-штамах *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium* 03270, одержаних з музею живих культур бактеріологічної лабораторії кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України та клінічних штамах *S. aureus* (n 53), *S. typhimurium* (n 15). В дослідженні застосовували антисептичні лікарські препарати декасан® (Decasanum; реєстраційне посвідчення UA/5364/01/01, терміном дії до 03.01.2017 р., Наказ №2 МОЗ України від 03.01.2012 р.), горостен® (Horostenum; реєстраційне посвідчення UA/2048/01/01, терміном дії до 19.05.2019 р., Наказ №11 МОЗ України від 15.01.2015 р.).

Дослідження чутливості стафілококів, сальмонел проводили згідно стандартного методу двократних серійних розведень, визначаючи мінімальну бактеріостатичні концентрації (МБСК) препаратів в мкг/мл. Бактерицидні концентрації (МБЦК) ДС®, ГС® визначали шляхом висіву на щільні поживні середовища [5].

Вивчення впливу антисептичних препаратів на ультраструктуру бактерій проводили за допомогою електронної мікроскопії. Попередньо культури *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium* 03270 культивували протягом 24 год при температурі 37 С на м'ясо-пептонному агарі. Після завершення експозиції готували зависі бактерій в 10 мл 0,9 % розчині натрію хлориду відповідно до стандарту мутності (108 КУО/мл). До одержаних зависів мікроорганізмів додавали мінімальні бактеріостатичні концентрації ДС®, ГС®. Так, до кожного зразка завису *S. aureus* ATCC 25923 і *S. typhimurium* 03270 додавали МБСК концентрації ДС®, ГС®. Через дві години експозиції проводили фіксацію, зневоднення та виготовлення зразків *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium* 03270 для електронної мікроскопії. Досліджувані зразки піддавали негативному контрастуванню, в якості контрастерів використовували 1-2% розчини фосфорно-вольфрамової

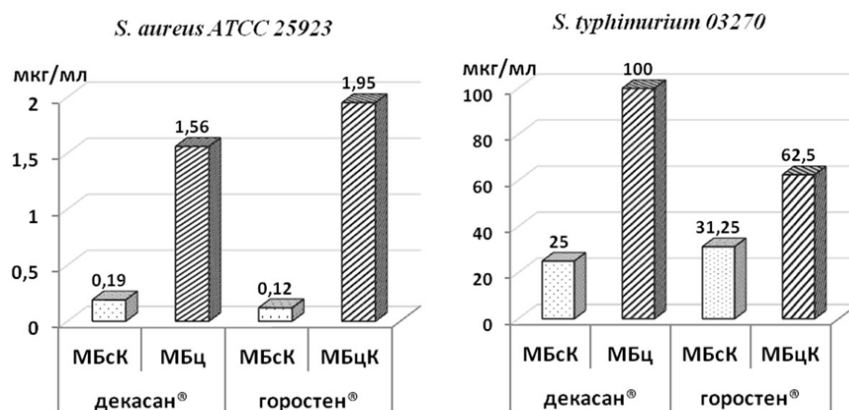


Рис. 1

Протимікробна дія декасану®, горостену® на *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium* 03270

кислоти. При цьому об'єкти наносили на плівку-підложку крапельним способом. Для проведення просвічуючої електронної мікроскопії плівки-підложки готували із формвару, їх зміцнювали шляхом напилювання вуглецю в вакуумі. Для зменшення гідрофобності плівок - підложок, опорні сітки з підложками піддавали ультрафіолетовому опромінюванню. Як правило, використовували опорні сітки 200-300 mesh [6, 7].

Дослідження проводили з використанням електронного мікроскопу Jeol JEM 100 CX II (Японія) з переведенням зображення у цифровий формат та комп'ютерним аналізом отриманих знімків. На усіх електронограмах вказано збільшення, при якому проводилась фотозйомка.

Визначення ультраструктурних змін проводили в порівнянні з контрольними зразками *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium* 03270, які не піддавали дії лікарських антисептичних препаратів. Для об'єктивної оцінки ступеня достовірності отриманих результатів дослідження використано варіаційно-статистичний метод аналізу із застосуванням пакету статистичних програм "Microsoft Excel - 2013" і "Statistica-6.0". Статистичну обробку одержаних числових даних проводили, обчислюючи середні арифметичні значення (M), середню похибку середньої арифметичної (m), середню похибку (t), достовірність різниці результатів (p) [8].

**Результати й обговорення**

Дослідженням встановлено високу чутливість музейних та клінічних штамів золотистого стафілококу, сальмонел до лікарських засобів ДС®, ГС® (рис. 1).

Так, визначали бактеріостатичну дію ДС®, ГС® на *S. aureus* ATCC 25923 в присутності МБсК, що не перевищували 0, 12 та 0,19 мкг/мл, відповідно. Бактерицидна дія досліджуваних препаратів на *S. aureus* ATCC 25923 не перевищувала 1,95 мкг/мл. Штам *S. typhimurium* 03270 виявився більш витривалим до дії ДС®, ГС®. На підставі дослідів доведено високу чутливість клінічних штамів золотистого стафілококу до цих антисептиків. Відмінності чутливості клінічних ізолятів *S. aureus* до ДС®, ГС® не встановлено (табл. 1; p >0,05). Клінічні штами *S. typhimurium* проявляли однакову чутливість до ДС®, ГС® (p>0,05).

В результаті електронномікробічного дослідження морфології бактерій встановлено, що контрольні зразки *S. aureus* мали типову ультраструктурну організацію, притаманну даному виду. На електронограмах визначали кокоподібну форму бактерій, притаманну потовщену тришарову клітинну стінку. У полі зору визначали від 5-10 бактерій, які знаходились в стадії поділу (рис. 2, а).

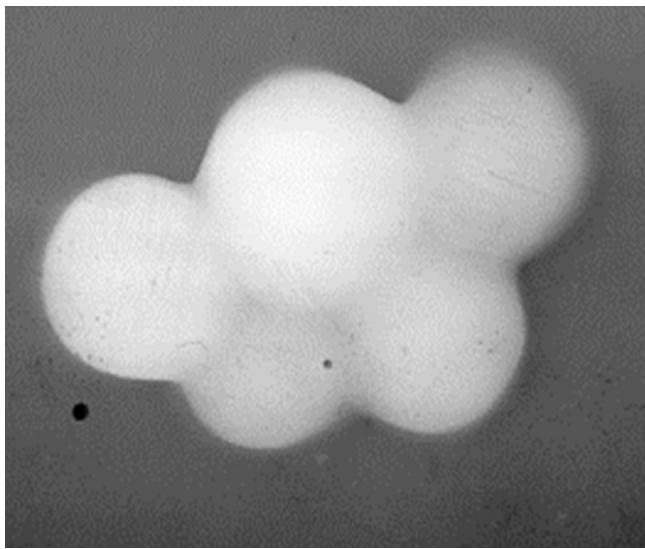
Дослідженням впливу антисептиків на

Таблиця 1

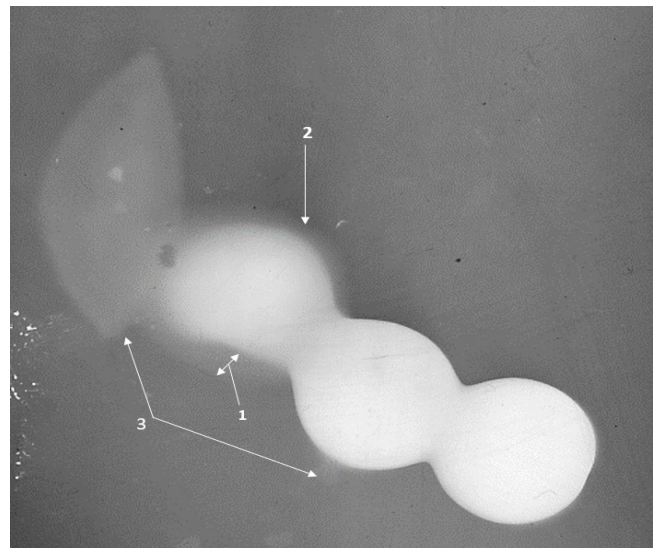
Чутливість клінічних штамів *S. aureus* ATCC 25923; *S. typhimurium* 03270 до декасану® та горостену®

Мікроорганізми	Кількість штамів	Декасан®		Горостен®	
		МБсК мкг/мл	МБцК мкг/мл	МБсК мкг/мл	МБцК мкг/мл
<i>S. aureus</i>	53	1,31±0,14	2,68±0,29	1,01±0,1*	2,44±0,33*
<i>S. typhimurium</i>	16	18,75±3,52	35,94±7,29	13,66±1,95*	25,87±4,26*

\* - p > 0,05 у порівнянні із декасаном®



а



б

Рис. 2

Електронна мікроскопія. Вплив декасану® на ультраструктуру *S. aureus*;

а) контрольна культура *S. aureus* ATCC 25923;

б) *S. aureus* ATCC 25923 після дії МБсК декасану® протягом 2 год: 1 - вихід цитоплазми з клітини; 2 - клітина зі зміненою формою; 3 - збільшення периплазматичного простору

ультраструктуру *S. aureus* ATCC 25923 зафіксували втрапу типової будови бактерійної клітини. В полі зору відмічали лише до трьох клітин, вони знаходились на стадії незавершеного поділу, що свідчило про зниження репродукції золотистого стафілокока в присутності бактеріостатичних концентрацій декасану®. За рахунок декаметоксину®, що міститься в ДС®, виникала певна дезагрегація екзополісахаридного матриксу, що сприяло відокремленню клітин та їх реорганізації на дрібніші кластери (рис. 2, б).

В окремих випадках визначали антимікробну дію ДС® у вигляді порушення цілості клітинної стінки бактерій з виходом цитоплазми разом із генетичним матеріалом, що в ній містився, з клітини стафілокока в оточуюче середовище. В результаті дії бактеріостатичних концентрацій ДС® відмічали появу клітин кокоподібної форми, які втрачали типову кулясту форму. Реєстрували морфологічні зміни клітини у вигляді стоншення оболонки. Клітинна оболонка бактерій погано контурувалась, в порівнянні з вихідною культурою. В проекції клітин бактерій реєстрували вогнища просвіту, які мали овальну форму, були подібними до зон лізису. Визначали ознаки підвищення електронної щільності і часткову гомогенізацію цитоплазми, її відходження від клітинної стінки бактерійної клітини (рис. 2, б).

У результаті дії ГС® на клітини стафіло-

кока встановлено різке зменшення кількості клітин, здатних до поділу, деяке збільшення електронної щільності в ділянці нуклеоїда електронно-щільного матеріалу (агломерату), нечіткість клітинної стінки. Такі зміни притаманні для бактерій, які знаходились в стані спокою (рис. 3, а).

У результаті дії МБсК ГС®, так зване "зморщення" бактерійної клітини. Свідченням цього була поява дрібних ендцитолітичних везикул, що вказувало на виражені порушення периплазматичного простору. Такі зміни виникали в результаті відходження цитоплазми від клітинної стінки стафілокока під дією ГС®. На електроннограмі чітко візуалізували нерівну поверхню клітинної стінки бактерій, що мала хвилясту форму (рис. 3, б).

На пошкодження бактерій вказували ознаки втрати класичної кокоподібної форми *S. aureus* ATCC 25923. Визначали деформацію окремих клітин, які набували овальної, з тенденцією до видовження одного з полюсів, форми. Переважна більшість клітин втрачали свою цілісність, про що свідчили ознаки виходу цитоплазми з клітини у вигляді нечітких, розповсюджених слабоеклектроннощільних аморфних мас в полі зору. Зростання шорсткості поверхні окремих клітин стафілокока, поява аморфних мас можуть бути пов'язані з перфорацією клітинної стінки і послідовним вивільненням інтрацелюлярного вмісту в результаті деформації, стон-

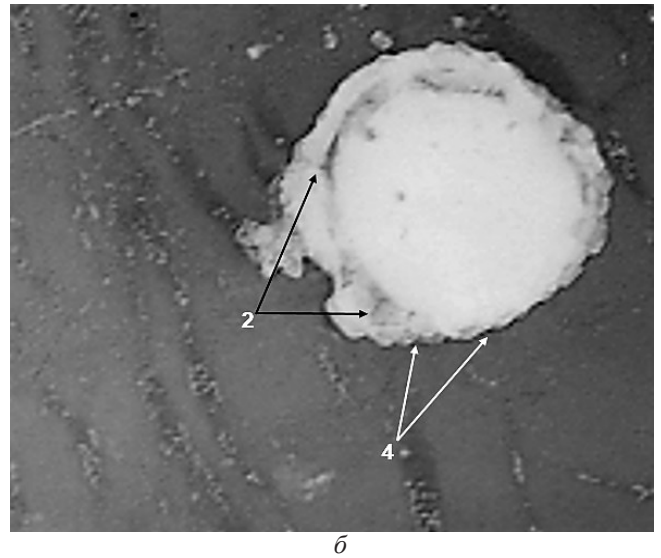
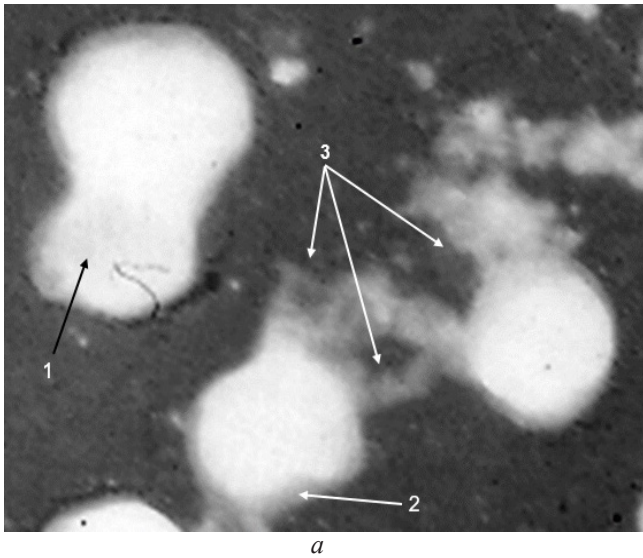


Рис. 3

Електронна мікроскопія. *S. aureus* ATCC 25923 після дії МБСК горостену® протягом 2 год (а, б).

1 - ущільнення нуклеоїду; 2 - відходження цитоплазми від клітинної стінки; 3 - вивільнення інтрацелюлярного вмісту клітини; 4 - порушення гладкої поверхні бактерійної клітини

шення клітинної стінки (рис. 3, а).

У результаті дії бактеріостатичних концентрацій ДС®, ГС® виникало порушення фізичної цілісності бактерійної клітини. Антисептики спричиняли зміни оболонки стафілокока, викликали дестабілізацію мембрани, підвищували її проникність для рідин, в результаті чого відбувалась пасивна втрата клітиною життєво важливих внутрішньоклітинних компонентів (іони, АТФ, нуклеїнові кислоти, цукру, ферменти, амінокислоти). Вивчення за допомогою електронної мікроскопії морфології *S. typhimurium* показало типове для даних мікроорганізмів ультраструк-

турну будову контрольних зразків *S. typhimurium* 03270. В частини клітин визначали розширення периплазматичного простору на полюсах з наявністю в ньому аморфної речовини, що було свідченням екскреції вторинних метаболітів (рис. 4, а).

У сальмонел в присутності бактеріостатичної концентрації ДС® спостерігали часті зміни в оболонці у вигляді випинів, з підвищеною електронною щільністю внутрішнього шару в порівнянні із сальмонелами, які не піддавали дії антисептиків. В окремих випадках визначали клітини з характерними сегментарними змінами

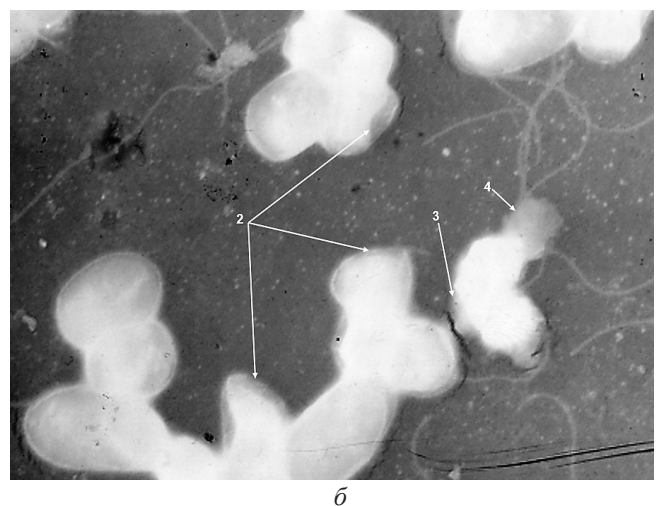
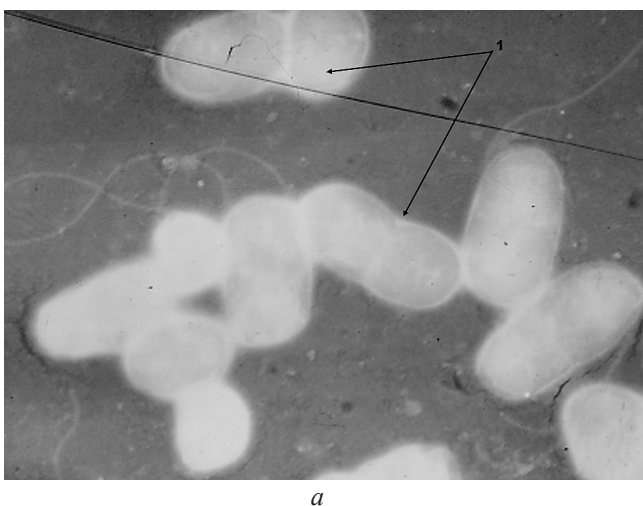


Рис. 4

Електронна мікроскопія. Вплив декасану® на ультраструктуру *S. typhimurium* 03270.

а) контрольна культура;

б) після дії МБСК декасану® протягом 2 год : 1 - активний поділ клітин; 2 - зміна форми клітини, зміни оболонки з відшаруванням від цитоплазми; 3 - нечіткість країв бактерій; 4 - екстрацелюлярний вихід цитоплазми

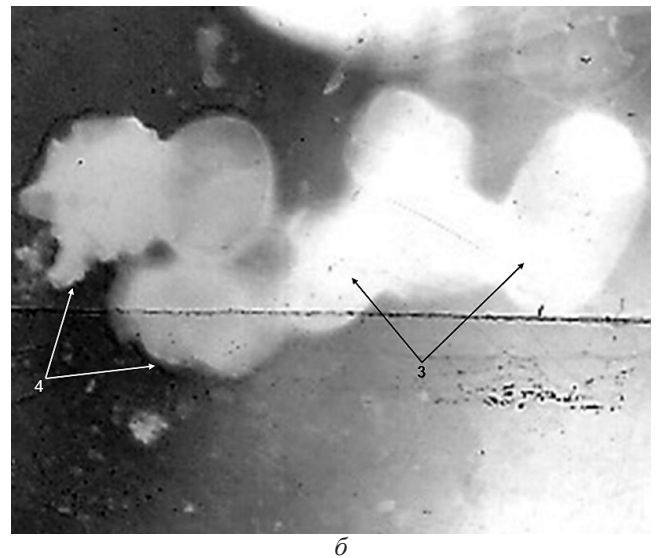
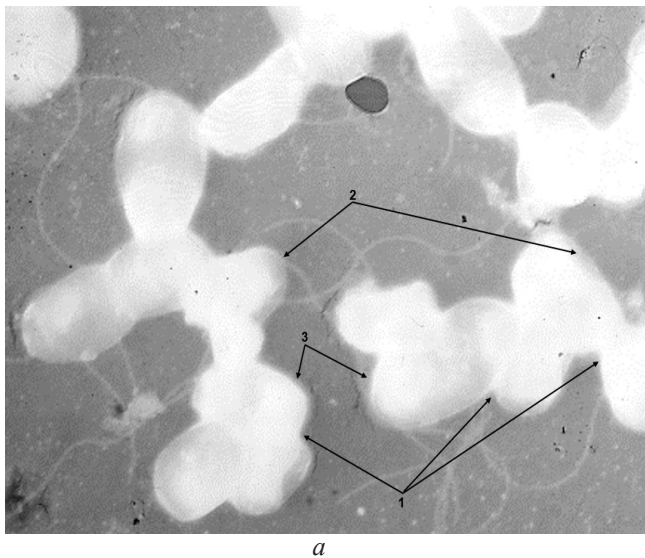


Рис. 5

Електронна мікроскопія. *S. typhimurium* 03270 після дії МБСК горостену® протягом 2 год.

1 - поліморфізм, гальмування бінарного поділу; 2 - збільшення периплазматичного простору; 3 - вогнищевий лізис; 4 - пошкодження цілісності клітинної оболонки

оболонки, з втратою типової для неї чіткої структури. В результаті дії антисептичного лікарського препарату ДС® на *S. typhimurium* 03270 протягом двох годин встановлено електронномікроскопічні ознаки вираженої зміни форми, розмірів клітин та особливі зміни оболонки, яка в деяких клітин мала хвилясту форму і дещо відшарувувалась від цитоплазми. Реєстрували нечіткість країв бактерій, екстрацелюлярний вихід цитоплазми в результаті порушення цілісності бактерійних клітин (рис. 4, б).

У присутності 31,25 мкг/мл ГС®, що відповідало МБСК препарату, реєстрували чіткі зміни ультраструктури бактерій. В окремих клітин визначали ознаки лізису. Встановлено поліморфізм розмірів бактерій, зустрічали овоїдні, подовжені паличкоподібні форми. В останніх можна було розрізнити початкові ознаки формування перетинок, але типового бінарного поділу не відмічали, що вказувало на різке гальмування процесу розмноження сальмонел (рис. 5).

Спостерігали суттєві зміни клітинної стінки на значних ділянках у вигляді нечіткої будови, відшарування від цитоплазматичної мембрани. Після дії вказаної концентрації ГС® спостерігали зміни субмікроскопічної структури цитоплазми у вигляді збільшення периплазматичного простору, появи хвилястої поверхні бактерійних клітин. Такі зміни спостерігали одночасно в різних ділянках бактерійної клітини, багатьох клітинах, що вказувало на їх чутливість

до препарату ГС®. Цитоплазма на цьому тлі мала виражений строкатий малюнок за рахунок нерівномірного розподілу органел. Зона нуклеоїду в більшості сальмонел була слабо візуалізована. В багатьох клітинах спостерігали вогнищевий лізис з утворенням овальних ділянок просвітлення цитоплазми. В окремих клітинах бактерій визначали крупновогнищевий лізис. Клітини сальмонел втрачали електронну щільність, набуваючи форми "тіней" клітин. У частини бактерійних клітин реєстрували електронно-щільні агрегати (рис. 5).

Результати електронномікроскопічних досліджень засвідчили глибокі пошкодження структурно-функціональних комплексів *S. typhimurium* в результаті вираженої бактеріостатичної дії ГС® (31,25 мкг/мл). Зареєстровано пошкодження цілісності клітинної оболонки, яка мала нерівномірний вигляд з ділянками розривів та виходом цитоплазми назовні (рис. 5, б).

## Висновки

1. Антисептичні лікарські засоби декасан®, горостен® проявляють високі протимікробні властивості щодо музейних та клінічних штамів *S. aureus*, *S. typhimurium*, не відрізняючись за ефективними бактеріостатичними, бактерицидними властивостями ( $p > 0,05$ ).

2. Декасан®, горостен® в бактеріостатичній концентрації чинять глибокі зміни ультраструктури бактерійних клітин стафілококів, сальмонел. Змі-

ни ультраструктури *S. aureus* ATCC 25923 та *S. typhimurium* 03270, що виникають в результаті дії декасану<sup>®</sup>, горостену<sup>®</sup> приводять до поліморфізму клітин, пошкодження їх оболонки, втрати типової структури, до відшарування клітинної стінки, пригнічення поділу клітин, появи лізису клітин.

3. Відмінності у дії препарату на стафілокок, сальмонелу бактерії полягає в тому, що в стафілокока попередні морфологічні зміни оболонки менш виражені. Проте, частіше відбувається розрив оболонки з наступним виходом вмісту протоплазми у стафілокока ультраструктурні зміни мають більш альтернативний характер. У сальмонел розширення периплазматичного простору передуює відшаруванню оболонки, відбувається сегментарна втрата типової структури. Дія декасану<sup>®</sup>, горостену<sup>®</sup> на сальмонели, супроводжується градуїтованим ефектом, оскільки в чистій культурі окремі клітини перебувають на різних фазах розвитку.

### Література

1. Paliy G.K., Koget T.O., Paliy V.G. et. al. Antiseptics in prophylaxis and treatment of infection. K.: Zdorov'ya, 1997. - 201 p. Ukrainian (Палій Г.К., Ковет Т.О., Палій В.Г. та співавт. Антисептики в профілактиці і лікуванні інфекцій. К.: Здоров'я, 1997. - 201 с).
2. Paliy G.K., Nazarchuk O.A., Gonchar O.O. et. al. The research of physical and chemical, antimicrobial qualities of "decamethoxin<sup>®</sup>" remedy. Medychna I klinichna khimiya 2016; 18, (1): 36-44. Ukrainian (Г.К. Палій, О.А. Назарчук, О.О. Гончар та співавт. Дослідження фізико-хімічних, антимікробних властивостей лікарського препарату декаметоксину<sup>®</sup>. Медична та клінічна хімія 2016; 18 (1): 36-44).
3. Jung W, Koo H, Kim K, Shin S, Kim S, Park Y : Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. American Society for Microbiology 2008, 74 (7), 2171-2178.
4. Castillo J, Clape's P, Infante M. et al. : Comparative study of the antimicrobial activity of bis(Na-caproyl-L-arginine)-1,3-propanediamine dihydrochloride and chlorhexidine dihydrochloride against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 57, 691-698.
5. Nekrasova L.S., Svyta V.M., Glushkevych T.G. et al. Determination of microorganisms' sensitivity to antibacterial medicines: methodological guidelines MV 9.9.5 - 143. K.; 2007. - 74 p. Ukrainian (Некрасова Л.С., Свита В.М., Глушкевич Т.Г. та співавт. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки МВ 9.9.5-143. К.; 2007.-74 с.)
6. Dykstra MJ, Reuss LE Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting, Springer US, 2003, 2<sup>nd</sup> ed., 535 p.
7. Sarkisova D.S., Petrova Yu.L. Microscopy Technique: Guideline for doctors and laboratory assistants. M.: Medicina, 1996. - 544. Russian (Саркисова Д.С., Перова Ю.Л. Микроскопическая техника: Руководство для врачей и лаборантов. М.: Медицина, 1996. - 544 с.)
8. Yunkerov V.I., Grigorjev S.G., Rezvantsev M.V. Mathematical and statistical data processing of medical researches. SPb.: VMeedA, 2011. - 318 p. (Юнкеров В.И., Григорьев С.Г., Резванцев М.В. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб.: ВМеедА, 2011. - 318 с.)