

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ НА КИШЕЧНУЮ ПАЛОЧКУ

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология
очной формы обучения, группы 07001316
Горловой Александры Андреевны

Научный руководитель
проф., к.б.н. Сиротин А.А.

БЕЛГОРОД 2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Общие сведения об антибиотиках.....	6
1.2 История открытия и исследования антибиотиков.....	7
1.3 Получение антибиотиков	9
1.4 Требования, предъявляемые к антибиотикам	10
1.5 Классификация антибиотиков по спектру действия.....	11
1.6 Механизм действия.....	12
1.7 Устойчивость бактерий к антибиотикам	14
1.8 Чувствительность антибиотиков к микроорганизмам	17
1.9 Антибиотики в отношении кишечной палочки.....	20
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
2.1 Объект исследования	28
2.2 Методы исследования	31
2.2.1 Метод выделения чистой культуры	31
2.2.2 Приготовление питательной среды.....	32
2.2.3 Посев чистой культуры на питательную среду.....	32
2.2.4 Диско-диффузный метод определения антибиотикочувствительности культуры <i>Escherichia coli</i>	33
2.2.5 Статистическая обработка результатов	33
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	35
3.1 Подсчеты зон ингибирования цефалоспориновых антибиотиков в нативной и наноструктурированной формах	35
3.2 Статистическая обработка цифровых данных, характеризующих реакцию кишечной палочки на нативные формы антибиотиков, зоны ингибирования (мм).	38

3.3 Статистическая обработка цифровых данных, характеризующих сравнительную реакцию кишечной палочки между нативной формы антибиотиков и наноструктурированной формы, зоны ингибирования (мм).	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.....	46
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	48

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики стали неотъемлемой частью жизни человека более полувека назад. Такие заболевания как пневмония, туберкулез, гангрена и другие инфекции перестали быть смертельно опасными для человека благодаря антибиотикам. Но даже самые сильные антибиотики не способны уничтожить все патогенные микроорганизмы. В результате эволюции бактерии стали более устойчивы, формируя природный генетический механизм. В результате появились новые штаммы микроорганизмов, на которые уже не действуют сильные препараты. Устойчивость с каждым годом растет, поэтому усилия медиков, ученых всего мира брошены на поиски более новых и устойчивых препаратов, а так же на борьбу с опасными бактериями [2].

Непосредственно идет борьба с устойчивыми штаммами микроорганизмов, регулируя применение антибиотиков. Во многих развитых странах антибиотики отпускают только строго по рецептам. Но так же есть и другие меры. Во всем мире запрещено использовать для консервации продуктов питания антибиотики медицинского назначения. Забой скота, который ранее был подвержен приему антибиотиков, должен осуществляться после полного выведения антибиотика из организма, т.е. в продукте не должен находиться антибиотик [40].

В нашем исследовании брали цефалоспориновые антибиотики, которые применяются в медицинской практике с 60-х годов XX века. В настоящее время они занимают ведущее место при лечении различных инфекций. На данном этапе их применение зависит от поколения антибиотика, пути введения в организм, чувствительности к данному препарату.

Зачастую многие лекарственные препараты не дают терапевтического эффекта. Одной из причин этой проблемы может служить неправильная дозировка активного вещества. Известно, что наноструктурированные формы многих лекарственных препаратов позволяют пролонгировать период их

действия и снизить дозу за счет повышения эффективности. Для подробного изучения этой проблемы мы проводили лабораторные исследования биологической активности нативных цефалоспориновых антибиотиков в отношении кишечной палочки (*Escherichia coli*), а также проанализировать эффективность их наноструктурирования.

Цель исследования: Определить биологическую активность нативных цефалоспориновых антибиотиков в отношении кишечной палочки (*E.coli*), а также проанализировать эффективность их наноструктурирования с оценкой по критерию Стьюдента.

Для достижения нашей цели были выявлены следующие задачи:

1. Определить биологическую активность цефалоспориновых антибиотиков в отношении *E.coli*, по среднему диаметру зоны ингибирования роста;
2. Провести статистическую обработку цифровых данных и определить достоверность различий по критерию Стьюдента;
3. Дать сравнительный анализ биологической активности нативных и наноструктурированных форм антибиотиков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения об антибиотиках

Антибиотики - низкомолекулярные продукты метаболизма микроорганизмов, подавляющие рост других микроорганизмов. «низкомолекулярные» вещества – это те вещества, у которых молекулярная масса не превышает несколько тысяч. Ферменты и сложные белки, обладающие антибактериальным действием, не относятся к антибиотикам. Если следовать этому определению, то антибиотиками можно считать только природные продукты, образуемые микроорганизмами. К антибиотикам так же относят и следующие полусинтетические вещества:

- продукты, полученные химической модификацией природных антибиотиков или других продуктов метаболизма микроорганизмов;
- продукты, полученные в результате микробиологической трансформации синтетических соединений [25].

На определенный вид микробов каждый антибиотик обладает специфическим избирательным действием. Благодаря такому избирательному действию многие антибиотики подавляют жизнедеятельность патогенных микроорганизмов в безвредных для организма концентрациях. Именно такие антибиотики используют для лечения различных как инфекционных заболеваний, так и воспалительных [23].

Основными продуцентами антибиотиков служат микроорганизмы, обитающие в почве и воде, где они непрерывно вступают в симбиоз. Микроорганизмы, обитающие в воде, могут быть нейтральными, взаимовыгодными, но очень часто они являются антагонистическими. Так в природе и сложилось сбалансированное сосуществование огромного числа видов живых существ. И. И. Мечников предложил использовать антагонизм между бактериями на пользу человеку. Он советовал подавлять активность

гнилостных бактерий в кишечнике человека молочнокислыми бактериями, продукты жизнедеятельности которых, по его мнению, сокращают жизнь человека.

Механизмы микробного антагонизма различны. Они могут быть связаны с конкуренцией за питательные вещества и кислород, с изменением рН среды в сторону, неблагоприятную для конкурента, и т.д [48].

1.2 История открытия и исследования антибиотиков

Впервые термин «антибиотики» был предложен Ваксманом в 1942 году.

Первые попытки использовать антибиотики в лечебных целях были предприняты Н. Н. Благовещенским в 1890 году. Он показал, что синегнойная палочка подавляет развитие сибирской язвы у животных; при этом лечебное действие синегнойной палочки обусловливается определенным продуктом жизнедеятельности этого микроба, то есть антибиотиком [11].

Первые попытки выделения антибиотиков были сделаны Эммерихом, изолировавшим из культур синегнойной палочки вещество, которое он назвал пиоцианазой, обладавшее бактерицидными свойствами в отношении возбудителей сибирской язвы, брюшного тифа, дифтерии, чумы и стафилококков. Некоторое время пиоцианазы использовались для местного лечения ран. Полученный препарат не был стандартным, и результаты его применения были очень непостоянными. Почти одновременно Н. Ф. Гамалея получил из культуры синегнойной палочки другой малотоксичный препарат, названный пиокластином, активный в отношении ряда микробов. В 1896 году Гозио выделил из плесени (*Penicillium*) первый кристаллический антибиотик - микофеновую кислоту - и доказал, что это соединение задерживало развитие бактерий сибирской язвы. В 1924 году Грациа и Дат

описали новое антибиотическое вещество, образуемое *Actinomyces albus*, которое они назвали актиномицетином. В 1931 году был выделен антибиотик цитринин из культуры *Penicillium citrinum*.

Работы Дюбо оказались главным этапом в исследованиях антибиотиков. Он получил кристаллическое вещество тиротрицин из почвенной бактерии *Bacillus brevis*, состоящее из двух антибиотиков-полипептидов - грамицидина и тироцидина [13].

Грамицидин был более активен в отношении грамположительных, а тироцидин - в отношении грамотрицательных бактерий. Тиротрицин обладает сильным бактерицидным действием в отношении многих патогенных микробов. Это было доказано опытным путем на мышах, зараженных пневмококком. Это первый антибиотик, внедренный в медицину; он применяется довольно широко и в настоящее время. Позднее, в 1942 году, Г. Ф. Гаузе и М. Г. Бражникова выделили антибиотик грамицидином С из новой разновидности *Bacillus brevis*, обладающий некоторыми преимуществами по сравнению с тиротрицином Дюбо.

Открытие Флемингом пенициллина стало переворотом истории антибиотиков. Еще в 1929 году Флеминг заметил, что вокруг колоний *Penicillium notatum* колонии стафилококка в чашке Петри лизируются, а фильтраты бульонных культур этого гриба обладают антибактериальным действием в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных микробов. Из-за нестабильности этого антибиотика, выделить чистый пенициллин Флемингу не удалось. В 1940 году Флори и Чейн разработали метод извлечения пенициллина из культуральной жидкости *Penicillium notatum*, и вскоре была выявлена высокая терапевтическая активность этого препарата.

Ценные свойства пенициллина послужили толчком в развитии промышленности антибиотиков. В СССР первый пенициллин был получен З. В. Ермольевой в 1942 году. После открытия пенициллина начались

интенсивные поиски новых антибиотиков, которые продолжаются и до сих пор [9].

Большинство ученых подразумевает под антибиотиками не только антибактериальные вещества, образуемые микроорганизмами, но и соединения, обладающие антибактериальной активностью, выделенные из животных тканей и высших растений. Описано более 2000 антибиотиков и получено множество производных природных соединений, но для медицинского применения существует всего несколько. Остальные антибиотики слишком токсичны, малоактивны или лишены химиотерапевтическими свойствами [1].

1.3 Получение антибиотиков

Продуцентами антибиотиков являются различные микроорганизмы. Способностью вырабатывать антибиотики обладают как спорообразующие, так и не образующие спор бактерии, в том числе и различные рода грибов. Так, к примеру, источником получения цефалоспориновых антибиотиков служит плесневый гриб *Cephalosporium acremonium*. Источником для получения послужил цефалоспорин С - природный продуцент плесневых грибов и источник 7-аминоцефалоспороновой кислоты. В медицинской практике используют полусинтетические антибиотики, полученные ацилированием по аминогруппе 7-АЦК [49].

Существуют два основных метода выделения антибиотика. Первый метод заключается в адсорбировании антибиотика на ионообменных смолах, второй – экстракции антибиотика из культуральной жидкости органическими растворителями. Для очистки препарата используют различные физико-химические методы, в зависимости от природы антибиотика [33].

Очищенные препараты антибиотики для парентерального применения выпускают в виде стерильно расфасованного во флаконы сухого порошка, хорошо растворимого в воде, изотоническом растворе хлорида натрия или

растворах новокаина. За последние годы стойкие антибиотики выпускаются в виде готовых к употреблению стерильных растворов во флаконах. Для приема внутрь антибиотики выпускают в виде таблеток или в желатиновых капсулах.

Проверка на биологическую активность большинства антибиотиков проводится микробиологическими методами. Для многих антибиотиков в качестве тест-микробов используются почвенные бациллы (*Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides* и др.), а также *Escherichia coli* [38].

1.4 Требования, предъявляемые к антибиотикам

Для высокого терапевтического эффекта, антибиотик должен иметь, некоторые обязательные свойства.

1. Он должен убивать возбудителя или подавлять рост и размножение, при низкой концентрации (10-30 мкг /мл).
2. Активность антибиотика не должна значительно снижаться под действием жидкостей организма.
3. Он должен быстро воздействовать на микроорганизм, чтобы за короткий срок прервать его жизненный цикл.
4. Антибиотик не должен вредить макроорганизму. Аллергенность и токсичность и после введения разовой дозы, и после многократного введения должны отсутствовать.
5. Антибиотик не должен препятствовать процессу выздоровления.
6. Антибиотик не должен снижать и тем более подавлять иммунологические реакции. Он не должен наносить никакого ущерба иммунной системе организма [4].

Во многом есть и исключения. Речь идет о поиске таких антибиотиков, которые бы подавляли трансплантационный иммунитет. К числу последних относится циклоспорин А, который обладает мощным иммуносупрессивным

действием. Его широко применяют благодаря его свойству препятствовать цитотоксическое действие на почки [9].

1.5 Классификация антибиотиков по спектру действия

Антибиотик принято разделять на несколько групп: антибактериальные, противогрибковые и противоопухолевые. В медицинской практики такое разделение весьма удобное, так как указывает на сферу применения данного препарата. В действительности такое разделение имеет недостатки, т.к. похожие между собой антибиотики могут сильно отличаться друг от друга по антибактериальному спектру действия. Примерами могут служить антибиотики из группы пенициллинов: одни подавляют развитие только грамположительных микробов, а другие - как грамположительных, так и грамотрицательных микробов.

Антибактериальные антибиотики подавляют развитие и размножение бактерий. Некоторые из них, бензил пенициллин, ристомицин, Макролиды, новобиоцин и другие, активны только в отношении грамположительных микробов, другие, например, полимиксин, подавляют развитие грамотрицательных бактерий, третьи - левомецетин (хлорамфеникол, хлоромецетин), тетрациклины, аминоглюкозиды, так называемые антибиотики широкого спектра действия, задерживают рост грамположительных и грамотрицательных бактерий [28].

Противогрибковые антибиотики оказывают специфическое подавляющее действие на рост и развитие грибов. Широкое применение в медицинской практике нашли антибиотики нистатин и леворин, используемые для лечения кандидоза и других заболеваний, вызываемых дрожжеподобными грибами. Антибиотик амфотерицин Б применяется для лечения генерализованных и глубоких микозов.

Противоопухолевые антибиотики - задерживают размножение клеток злокачественных опухолей. Противоопухолевые антибиотики включают в

себя шесть групп химических соединений, представители которых используются клинически.

Первую группу составляют актиномицины, вторая группа противоопухолевых антибиотиков - это антибиотики антрациклины, третья группа противоопухолевые антибиотики, состоящие из производной ауреоловой кислоты, четвертая группа противоопухолевых антибиотиков представлена в Советском Союзе антибиотиком брунеомицином [27].

1.6 Механизм действия

По спектру действия антибиотиков на бактерии можно разделить на две группы: антибиотики с бактериостатическим действием и антибиотики бактерицидного действия. Бактериостатические антибиотики в концентрациях, приемлемых в организме, задерживают рост микробов, но не убивают их, тогда как воздействие бактерицидных антибиотиков в аналогичных концентрациях приводит к гибели клетки. В более высоких концентрациях бактериостатические антибиотики могут оказывать бактерицидное действие. К бактериостатическим антибиотикам относятся макролиды, тетрациклины, левомицетин и др., а к бактерицидным - пенициллины, цефалоспорины, ристоцетин, аминогликозиды и др.

За последние годы большие успехи были достигнуты в изучении механизма действия антибиотиков на молекулярном уровне. Цефалоспорины, относящиеся к бактерицидной группе, они активны против организмов, находящихся в фазах роста и размножения. Поскольку стенка микробного организма состоит из высокополимерным пептидогликаном, они действуют на уровне синтеза его мономеров и нарушают синтез поперечных полипептидных мостиков. Однако, в силу биологической специфичности возбудителя, между разными видами и классами возможны появления различных, новых структур и способов функционирования [35].

Некоторые виды грибов содержат оболочки, в то время когда у микоплазм и простейших ее нет. Вследствие подобной специфики строения, перечисленные группы возбудителей не чувствительны к действию бета-лактамов.

Естественная устойчивость истинных вирусов к противомикробным средствам обуславливается отсутствием молекулярной мишени (стенка, мембрана) для их действия.

Механизм действия других антибактериальных антибиотиков - левомицетина, макролидов, тетрациклинов - заключается в нарушении синтеза белка бактериальной клетки на уровне рибосом. Подавляющие образование муреина, антибиотики, угнетающие синтез белка, действуют на различных этапах этого процесса и поэтому не имеют перекрестной устойчивости между собой.

Противогрибковые антибиотики – полиены, нарушают целостность цитоплазматической мембраны у грибковой клетки, вследствие этого мембрана теряет свойства барьера между содержимым клетки и внешней средой, обеспечивающего избирательную проницаемость. В отличие от пенициллина, полиены активны и в отношении покоящихся клеток грибов. Противогрибковое действие полиеновых антибиотиков обуславливается связыванием их со стеринами, содержащимися в цитоплазматической мембране клеток грибов. Устойчивость бактерий к полиеновым антибиотикам объясняется отсутствием в их цитоплазматической мембране стерина, связывающихся с полиенами.

Противоопухолевые антибиотики, в отличие от антибактериальных, нарушают синтез нуклеиновых кислот в бактериальных и животных клетках [26].

1.7 Устойчивость бактерий к антибиотикам

Широкое внедрение антибиотиков в медицину и ветеринарию привело к резистентности. Такую группу бактерий можно разделить на две группы: 1) устойчивые к одному антибиотику и 2) устойчивые одновременно к нескольким антибиотикам (множественная резистентность).

Патогенные микроорганизмы, устойчивые к большинству антибиотиков, в последнее время стали распространяться среди вполне здоровых людей. Это процесс очень тяжело контролировать и еще труднее предотвратить. Так, в США ученые обнаружили, что устойчивые штаммы золотистого стафилококка MRSA распространяются среди спортсменов, вступающих в контакт (например, среди борцов) или соприкасающихся с общим предметом, например с мячом. Были случаи заболевания MRSA в школьных спортивных командах [31].

Чем чаще используются антибиотики, тем быстрее теряется чувствительность к бактериям. Поэтому не рекомендуется использовать антибиотики без консультирования, лечащего врача. Зачастую при простуде сразу начинают принимать антибиотики, которые предназначены для лечения бактериальных инфекций. Но иногда бывает, что за так называемой простудой могут скрываться, различные инфекционные заболевания, в том числе и вирусные (например, грипп), против которых применение антибактериальных препаратов не просто бесполезно. От такого лечения нет никаких результатов, но в организме идет нарушение естественной бактериальной микрофлоры, в результате чего могут развиваться инфекции, например кандидоз (неконтролируемый рост дрожжевых грибов рода *Candida*). Помимо этого, возникает риск появления в организме устойчивых бактериальных штаммов [37].

Другая причина при лечении, когда больной при улучшении самочувствия, прекращает прием антибиотика или принимает его в низких дозах, по сравнению с назначенной врачом. Это приводит к устойчивости

лекарственным препаратам у болезнетворной бактерии; следовательно, следующая попытка лечения этим же антибиотиком будет бесполезна.

Зачастую при лечении антибактериальными препаратами устойчивость к лекарствам вырабатывается у бактерий, составляющих микрофлору человека. Такие устойчивые бактерии способны передавать гены резистентности чужеродным бактериям, вызывающим различные болезни. Тем самым, благодаря межвидовому обмену генами, возбудители инфекции становятся устойчивыми [36].

Генами определяется чувствительность генетический контроль чувствительности к антибиотикам, находящиеся в бактериальных хромосомах или в трансмиссибельных плазмидах. Последние обеспечивают множественную резистентность клетки к нескольким антибиотикам.

Бактерия, устойчивая к данному антибиотику, представляет собой мутант по соответствующему хромосомному набору генов, который контролирует структуру компонентов клетки, являющихся объектом действия антибиотиков. Мутации по хромосомным генам, приводящие к антибиотикорезистентности, возникая с низкой частотой, поэтому возникновение одновременно хромосомных мутаций к двум или более антибиотикам, в основном, невозможно. Бактерии, несущие хромосомные мутации к двум или более антибиотикам, возникают в результате независимой мутации в штамме, первично резистентном к одному из антибиотиков.

Молекулярный механизм, лежащий в основе резистентности мутантной бактерии, для разных антибиотиков различен и определяется повреждением структур клетки, взаимодействующих с определенными антибиотиками.

Широко распространен ферментативный механизм резистентности к антибиотикам. Он заключается в преобразовании активного антибиотика в неактивную форму в результате действия на него модифицирующих ферментов клетки. Этот тип резистентности контролируется R-плазмидами, несущими различный набор генов устойчивости к таким антибиотикам как:

ампициллин, спектиномицин, хлорамфеникол, канамицин, стрептомицин, тетрациклин и гентамицин. Вероятно, устойчивость бактерий, контролируемая плазмидами, не ограничена перечисленными антибиотиками, список которых постоянно увеличивается по мере открытия новых R-факторов и создания и открытия новых препаратов антибиотиков. Резистентность, определяемая R-плазмидами, она распространена среди бактерий, относящихся к разным родам и семействам: *Shigella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. Молекулярные механизмы, обеспечивающие резистентность бактерий, несущих R-фактор (R⁺-клетки), к разным антибиотикам, различны.

Инактивация антибиотиков в R⁺ - штаммах, характеризующихся множественной резистентностью, осуществляется тремя типами реакций: фосфорилированием, ацетилированием и аденилированием. Изучение биохимических механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам показало, что резистентность к отдельному антибиотику не всегда контролируется индивидуальным геном R-фактора. Иными словами, бактерия может обладать резистентностью к большему числу антибиотиков, чем число генов, контролирующих эти признаки. Это связано с тем, что индивидуальный фермент, синтез которого детерминируется одним геном, способен определять разные антибиотики. В периплазматическом пространстве локализованы клетки, которые инактивируют антибиотики, синтезируемые под контролем R-фактора [6].

Расшифровка биохимических и генетических механизмов, определяющая резистентность бактерий к антибиотикам, объясняет правильность клинического использования, способы преодоления резистентности бактерий и направленности поиска новых лечебных препаратов. Преодоление множественной антибиотикоустойчивости бактерий теоретически может быть достигнута путем использования препаратов, избирательно блокирующих репликацию R-фактора или путем определения ферментов, модифицирующих антибиотики. Одним из

возможных вариантов для борьбы с антибиотикорезистентностью, связанный с действием R-ферментов, является комбинированное применение препаратов, одни из которых защищают другие от инактивации. Например, гентамицин способен подавлять в низких концентрациях инактивацию других аминогликозидов [10].

1.8 Чувствительность антибиотиков к микроорганизмам

Т.к. существует огромное количество антибиотиков разные по своим свойствам, то и чувствительны они к каждому микроорганизму по-разному. Так Харьковский НИИ микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова провел исследования, бактерий, выделенных из фекалий больных дисбактериозом кишечника и ОКИ к антибактериальным препаратам. Обследование больных детей в возрасте от 1 месяца до 14 лет и взрослых в возрасте от 19 до 65 лет проводили на базе ХНИМИ им. И. И. Мечникова и бактериологической лаборатории инфекционной больницы г.Харькова.

Для изучения видового состава патогенной и условно патогенной микрофлоры фекалий при кишечных инфекциях проводили бактериологические исследования в первую неделю госпитализации и в период реконвалесценции (3-я неделя), а также через 7–10 недель после перенесенной ОКИ — 125 больных.

Дозированный посев фекалий в разведениях от 10^{-1} до 10^{-8} проводили на селективные питательные среды, в следствие этого были выделены микрофлоры разных групп. Идентификация была проведена общеизвестными методами.

Изучена чувствительность 298 штаммов к следующим антибактериальным средствам: тетрациклинам, пенициллинам, макролидам, полимиксинам, хлорамфениколу, линкомицинам, рифампицину, аминогликозидам, а также цефалоспорином (клафорану), хинолинам (таривиду).

По результатам исследования было выявлено, что степень чувствительности к антибиотикам среди энтеробактерий сильно изменчива. Так, шигеллы в 100% случаев резистентны к макролидам и тетрациклинам, а в 94,9% — к пенициллинам, в т. ч. карбенициллину; 41,2% — к клафорану, но не было выявлено шигелл, проявляющих резистентность к таривиду, 99,9% сальмонелл резистентны к макролидам, и большинство к пенициллинам, тетрациклинам, линкомицину (64,8–92,9%). Сальмонеллы сохраняют высокую чувствительность к клафорану, полимиксину, таривиду (15,7–33,5%). Патогенные кишечные палочки сохраняли высокую чувствительность к цефалоспорином и аминогликозидам, а также таривиду. Половина изученных штаммов *E. coli* оказалась не чувствительны к полимиксину.

Pseudomonas aeruginosa устойчива к большинству антибиотикам. Практически все изученные штаммы ее были малочувствительны к хлорамфениколу, цефалоспорином и резистентны к пенициллинам, тетрациклинам, макролидам, высокая чувствительность *Pseudomonas aeruginosa* наблюдается только к таривиду.

Условно-патогенная флора остается высокочувствительной к аминогликозидам, полимиксину, таривиду, клафорану.

Представители кокковой флоры *Streptococcus faecalis* наиболее чувствительны к тетрациклинам, пенициллинам, линкомицином, макролидам, таривиду; *Streptococcus aureus* чувствителен к аминогликозидам, макролидам, клафорану, таривиду.

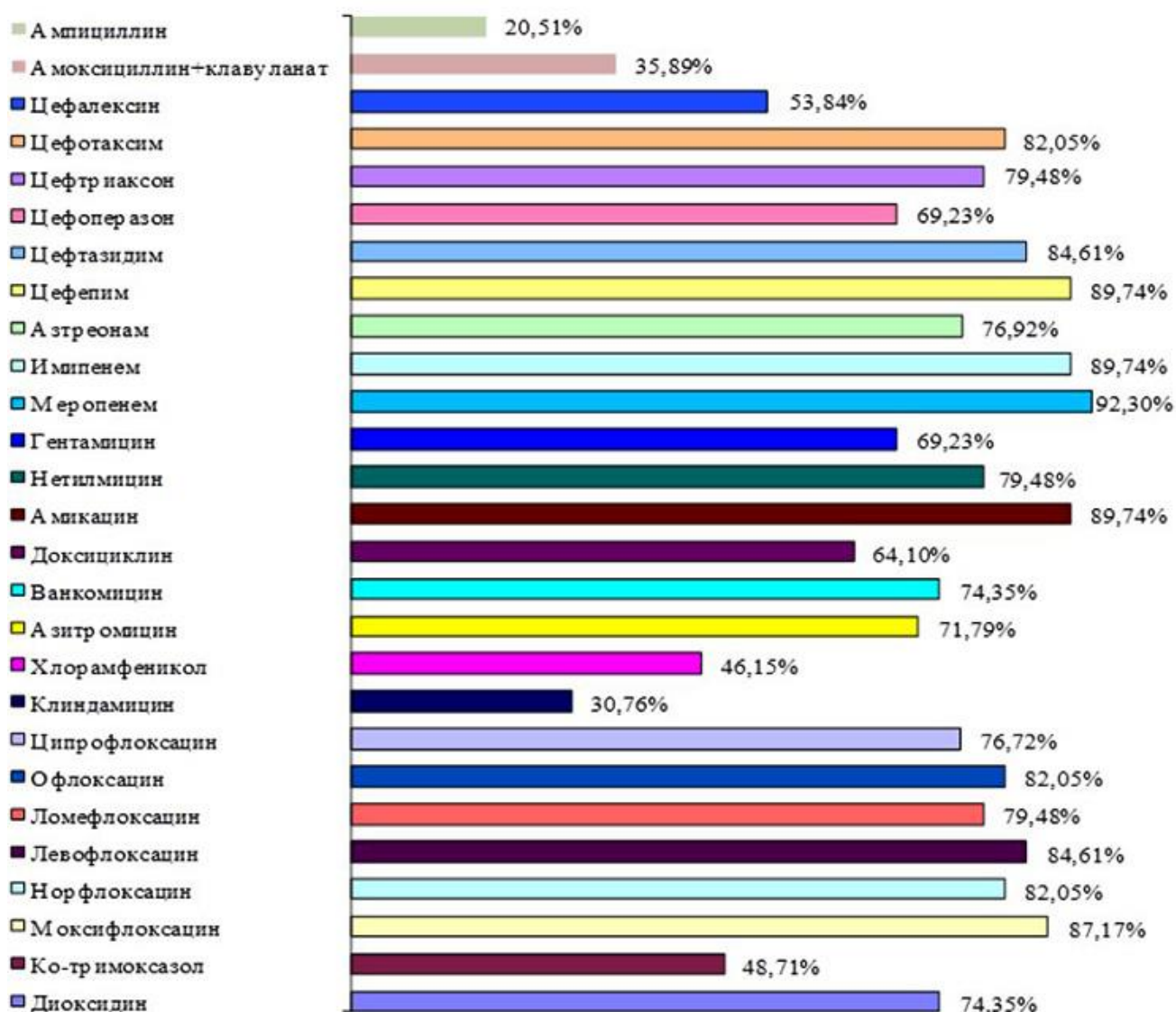
Полученные данные подтверждают, что большинство штаммов изученных бактерий имеют максимальную чувствительность и сохранили ее к таривиду, аминогликозидам, полимиксину. Причем у всех бактерий минимальный процент резистентных штаммов отмечен к таривиду [41].

Так же были проведены исследования чувствительности антибиотиков в отношении *E.coli*. Из рис.1.8.1 видно, что антибактериальная активность наиболее проявляется у цефалоспориновых, фторхинолов и некоторых

пенициллиновых антибиотиков. Наименьшую чувствительность проявил ампициллин, это может связано с его более ранним обнаружением и применением в практической медицине, чем остальных антибиотиков. Со временем устойчивость к этому антибиотику снизилась [49].

Рис.1.8.1 Чувствительность *Escherichia coli* к антибактериальным препаратам

(Косинец В.А.)



1.9 Антибиотики в отношении кишечной палочки

Кишечная палочка (лат.*Escherichia coli*; общепринятое сокращение *E. coli*) — вид грамотрицательных палочковидных бактерий, входящий в состав нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека.

Вид эшерихия коли (*E.coli*) входит в род эшерихии (лат. *Escherichia*), семейство энтеробактерии (лат.*Enterobacteriaceae*), порядок энтеробактерии (лат.*Enterobacteriales*), класс гамма-протеобактерии (лат.*γ proteobacteria*), тип протеобактерии (лат.*Proteobacteria*), царство бактерии. Существует большое число разновидностей кишечной палочки (*Escherichia coli*), в том числе, более 99 патогенных («энтеровирулентных») типов, объединенных в четыре класса: энтеропатогенные, энтеротоксигенные, энтероинвазивные и энтерогеморрагические. В природе существует большое количество типов кишечной палочки, в основном они непатогенные, а некоторые из них и полезные. Бактерии, входящие в состав микрофлоры, останавливают размножение патогенных бактерий. Так же кишечная палочка вырабатывает витамин К. Некоторые типы *E. coli* могут вызывать тяжелые заболевания. Отличия, по морфологическим показателям, у патогенной и непатогенной кишечной палочки отсутствуют. Различить их можно только проанализировав их антигены [5].

Выделяют шесть типов патогенных кишечных палочек.

- Энтерогеморрагическая кишечная палочка. Бактерии этого типа вырабатывают два токсина - веротоксинами, или шигаподобными (шигеллоподобными) токсинами. Эта палочка вызывает дизентерию, сопровождающиеся геморрагической диареей. В тяжелых случаях может развиваться гемолитико-уремический синдром (ГУС).
- Энтеротоксигенная кишечная палочка вырабатывает термолабильный и термостабильный токсины. Термостабильные токсины похожи на токсин холерного вибриона. Для заболеваний, вызываемых этой

бактерией, характерна водянистая диарея, повышенная температура и, в некоторых случаях, тошнота.

- Энтероинвазивная кишечная палочка. Она вызывает заболевания, похожие на бактериальную дизентерию. Бактерии такого типа проникают в клетки эпителия кишечника и размножаются в них.

- Энтеропатогенная кишечная палочка в основном вызывает диарею у детей, чем у взрослых. Эти бактерии прикрепляются к клеткам эпителия кишечника, но не проникают в них. Вызванные заболевания, энтеропатогенной кишечной палочкой, могут продолжаться около 2 недель.

- Энтероагрегативная кишечная палочка вызывает заболевания, в основном, у детей. Бактерии прикрепляются к эпителию кишечника и выделяют токсины [31,32,33,34,35].

Диффузно-адгезивная кишечная палочка вызывает легкую диарею у детей, в частности возрастом до 3х лет. Этот микроорганизм обнаружен и у здоровых детей, а также у здоровых взрослых.

E.coli обладает высокой ферментативной активностью. Эти палочки каталазоположительны и оксидазоотрицательны. Разлагают сахара (глюкозу, лактозу, маннит, арабинозу, сахарозу и др.) до газа и кислоты. Разложение лактозы является отличительной особенностью эшерихий от других энтеробактерий. Восстанавливают нитраты в нитриты, образуют индол, аммиак, не продуцируют сероводород, не разжижают желатин.

E.coli хорошо выживает во внешней среде, сохраняется в почве и воде несколько месяцев. При 55 °С гибнут в течении 1 часа, нагревание до 60° С выдерживают не более 15-20 мин, при кипячении погибают мгновенно. Весьма чувствительны к антибиотикам и дезинфицирующим средствам [3].

Одним из наиболее распространённых классов антибактериальных препаратов, являются цефалоспорины. Они относятся к ингибиторам синтеза клеточной стенки по своему механизму действия и имеют сильный бактерицидный эффект. Вместе с пеницилинами, карбапенемами и монобактамами образуют группу β -лактамовых антибиотиков [12].

Цефалоспориновые антибиотики обладают следующими свойствами:

- Бактерицидный механизм действия;
- Хорошая переносимость и небольшая частота побочных проявлений;
- Простота и удобства дозирования;
- Перекрестная аллергия у 5-10% пациентов с аллергией на пенициллин;
- Синергизм с аминогликозидами.

От I к III поколению для цефалоспориновых антибиотиков характерно расширение спектра действия и повышение уровня антимикробной активности по отношению грамотрицательных бактерий при некотором понижении активности в отношении грамположительных микроорганизмов.

Общим свойством для всех цефалоспоринов является отсутствие активности в отношении энтерококков MRSA (Метициллинорезистентный *S. aureus*). Штаммы *S. aureus*, резистентные к оксацилину. Подлинный MRSA содержат ген устойчивости *mecA*, обуславливающий изменение ПСБ. MRSA нечувствительны ко всем β -лактамным антибиотикам. MRSA устойчивы к антибиотикам других классов (тетрациклинам, аминогликозидам, и др.), отсюда они и получили название: "множественно-резистентные стафилококки".) и *Listeria monocytogenes*. КНС (Коагулазонегативный стафилококк), менее чувствительны к цефалоспорином, чем *Streptococcus aureus* [18].

Существует V поколений цефалоспоринов:

I. Цефазолин, Цефалексин, Цефадроксил;

Сходны по антимикробному спектру, препараты предназначены для приема внутрь, (цефдроксил, цефалексин). Цефазолин является парентеральный препарат, которому уступают другие антибиотики I поколения.

Антибиотики активны по отношению к семейству Стрептококковых . (*S.pyogenes*, *S.pneumoniae*) и MRSA. Цефалоспорины I поколения уступают

по уровню активности антипневмококков, а так же уступают аминопеницилинам и большинству более новых цефалоспоринов. Особо важной клинической особенностью является отсутствие активности в отношении листерий и энтерококков.

Некоторые штаммы, являющиеся продуцентами этих ферментов, могут проявлять к ним некоторую устойчивость. Несмотря на то, что цефалоспориновые антибиотики I поколения проявляют устойчивость к стафилококковым β -лактамазам.

По отношению к грамотрицательным бактериям цефалоспорины I поколения проявляют узкий спектр действия и невысокий уровень активности. Они проявляют эффективность в отношении группы семейства *Neisseria*. Клиническая активность в отношении *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis* незначительна.

Из представителей семейства *Enterobacteriaceae* чувствительны *E.coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* и *Proteus irabilis*.

Среди штаммов *E.coli* и *P.mirabilis*, вызывающие внебольничные и нозокомиальные инфекции, наблюдается приобретенная устойчивость, обусловленная продукцией β -лактамаз расширенных спектров действия.

Другие энтеробактерии, семейства *Pseudomonas*, а так же неферментирующие бактерии устойчивы к цефалоспорином I поколения.

Аэробы чувствительны к данным антибиотика, устойчивость проявляют только *Bacteroides fragilis* и родственные им микроорганизмы[19].

II. Цефуросим, Цефокситин, Цефотетан, Цефаклор, Цефуросим-аксетил;

Существует определенная разница между двумя основными антибиотиками этого поколения - цефуросимом и цефаклором. При приближенном антимикробном свойстве цефуросим наиболее активен в отношении *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* Но они оба неактивны в отношении MRSA, энтерококков, и листерий.

Спектр действия цефалоспоринов II поколения в отношении грамотрицательных микроорганизмов шире, чем у представителей I поколения. Цефуроксим имеет высокое клиническое значение в отношении *M. catarrhalis* и семейство *Haemophilus*. Так же он более активен в отношении поскольку устойчив к гидролизу их β -лактамам, что нельзя сказать о цефаклоре, т.к. ферменты действуют разрушительно на него.

Из семейства *Enterobacteriaceae* чувствительны *E.coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *P.mirabilis*, а так же *Klebsiella spp.*, *Proteus vulgaris*, *Citobacter diversus*. Выше перечисленные микроорганизмы чувствительны к цефуроксиму. Цефуроксим и цефаклор разрушаются БЛРС (Бета-лактамазы расширенного спектра).

Некоторые штаммы семейства *Enterobacter*, *Citobacter freundii*, *Serratia spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri* могут проявлять умеренную чувствительность к цефуроксиму, в условиях *in vitro*.

Псевдомонады, некоторые неферментирующие микроорганизмы, анаэробы группы *Bacteroides fragilis* устойчивы к цефалоспорином II поколения [17].

III. Цефотаксим, Цефтриаксон, Цефоперазон, Цефтазидим, Цефоперазон, Цефдиторен, Цефиксим, Цефподоксим, Цефтибутен;

Основными антибиотиками из этой группы выделяют только цефотаксим и цефтриаксон, они в основном идентичны по своим свойствам. Они проявляют высокий уровень активности в отношении *Streptococcus spp.*, при этом основная часть пневмококков, устойчивы к пенициллину, сохраняют чувствительность к цефотаксиму и цефтриаксону. Цефотаксим и цефтриаксон активны в отношении *Streptococcus aureus*, кроме MRSA. Весьма чувствительны и коринебактерии (кроме *C.jejikeium*). Что касается энтерококков, MRSA, *L.monocytogenes*, *B.antracis* и *B.cereus*, то они весьма устойчивы.

Цефотаксим и цефтриаксон имеют высокую активность в отношении менингококков, гонококков, *H.influenzae* и *M.catarrhalis*, а так же и в

отношении штаммов с меньшей чувствительностью к пенициллину, независимо от механизма устойчивости.

Цефотаксим и цефтриаксон в отношении, в основном, всех представителей семейства *Enterobacteriaceae* обладают высокой природной активностью. Устойчивость *E.coli* и *Klebsiella spp.* чаще всего обусловлена продукцией БЛРС. Устойчивость *Enterobacter spp.*, *C.freundii*, *Serratia spp.*, *M.morganii*, *P.stuartii*, *P.rettgeri* связана с гиперпродукцией хромосомных β -лактамаз класса C.

Цефтриаксон и цефотаксим бывают активны в условиях *in vitro* в отношении некоторых штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и других неферментирующих микроорганизмов и *B.fragilis* [42].

Цефтазидим и цефоперазон по устойчивости к микроорганизмам похожи с цефотаксимом и цефтриаксоном. Но и существуют и различия, такие как:

- выраженная (особенно у цефтазидима) активность в отношении *P.aeruginosa* и некоторых неферментирующих микроорганизмов;
- существенно меньшая активность в отношении стрептококков, непосредственно всего у *Streptococcus pneumoniae*;
- высокая чувствительность к гидролизу β -лактамазе расширенному спектру.

Существуют различия между цефиксима, цефтибутена и цефотаксима, цефтриаксона по следующим параметрам:

- отсутствие активности в отношении семейства стрептококковых;
- цефтибутен в отношении пневмококков;
- оба препарата неактивны или малоактивны в отношении семейства *Enterobacter*, *C.freundii*, *M.morganii*, *P.stuartii*, *P.rettgeri*, семейства *Serratia*[22].

IV. Цефепим, Цефпиром;

Цефепим по множественным показателям приближен к цефалоспорином III поколения. Но благодаря химической структуры

способен проникать через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий, так же он устойчив к гидролизу хромосомными β -лактамазами класса C. Сравнивая его с цефалоспориновыми антибиотиками III поколения, у цефепима можно выделить следующие свойства:

- Значительно высокая активность в отношении *P.aeruginosa*;
- Высокая активность в отношении микроорганизмов – гиперпродуцентов хромосомных бета-лактамаз класса C (*Enterobacter spp.*, *C.freundii*, *Ferratia spp.*, *M.morganii*, *P.stuartii*, *P.rettgeri*);
- Высокая устойчивость к гидролизу [34].

V. Анти MRSA: Цефтобипрол, Цефтаролин.

Цефтибипрол (пирролидинон-3-илиденеметил-цефем) является первым представителем нового класса парентеральных цефалоспориновых антибиотиков. Препарат является первым среди цефалоспориновых антибиотиков, проявляющую активность в отношении MRSA, а так же активны в отношении пенициллинрезистентных штаммов *Streptococcus pneumoniae*.

Спектр антимикробной активности цефтобипрола аналогичен спектру других цефалоспоринов IV поколения и охватывает грамположительные и грамотрицательные аэробные и анаэробные микроорганизмы.

Цефтобипрол имеет высокий аффинитет к пенициллинсвязывающим белкам (ПСБ) – ПСБ2а (стафилококки) и ПСБ 2х(пневмококки), ПСБ 1в (*Citobacter freundii*) и низкий аффинитет к ПСБ 5 (*Enterococcus faecium*).

В клетках *Streptococcus pneumoniae* цефтобипрол связывается с ПСБ2х в 8 раз сильнее, чем цефтриаксон; оба препарата не связываются с ПСБ 2в.

В клетках *Escherichia coli* цефтобипрол, цефтриаксон имеют высокий аффинитет к ПСБ2; цефтобипрол и цефтриаксон имеют аффинитет к ПСБ3.

Цефтобипрол обладает бактерицидными действиями [12].

В таблице ниже представлена эффективность цефалоспоринов по отношению к бактериям. От – (минимальный эффект) до ++++ (максимальный эффект). Из табл.1.9.1 видно, что наибольшую эффективность проявляют цефалоспориновые антибиотики 4 и 5 поколения по отношению грамотрицательных бактерий (*E.coli*). Что касается 1,2 и 3 поколения, то они проявляют меньшую эффективность, особенно цефалоспорины 1 поколения. Они проявляют большую эффективность по отношению грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*) [22]

Таблица.1.9.1

Эффективность цефалоспориновых антибиотиков по отношению к бактериям

Бактерии	Поколения				
	1	2	3	4	5
Гр+	++++	+++	+	++	++
Гр-	+	++	+++	++++	++++
MRSA	—	—	—	—	++++
Анаэробы	—	+/- Действуют только Цефокситин и Цефотетан*	+	+	+
Примечания	Не назначаются на MRSA, энтеро-, менинго- и гонококки, листерии, бета-лактамазопродуцирующие штаммы и синегнойную палочку.	Не эффективны против синегнойки, сераций, большинства анаэробов, морганеллы.	Не влияет на <i>V.fragilis</i> (анаэробы).	Эффективны даже в отношении пенициллин-резистентных штаммов.	

*Антибиотики группы цефалоспоринов, названия (с анаэробной активностью): Мефоксин, Анаэроцеф, Цефотетан + все представители третьего, четвертого и пятого поколений.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1 Объект исследования

1) Чистая культура *Escherichia coli*;

Общая характеристика культуры:

Кишечная палочка (*Escherichia coli*; общепринятое сокращение *E. coli*) — вид грамотрицательных палочковидных бактерий, входящий в состав нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека. Вид эшерихия коли (*E.coli*) входит в род эшерихии (*Escherichia*), семейство энтеробактерии (*Enterobacteriaceae*), порядок энтеробактерии (*Enterobacteriales*), класс гамма-протеобактерии (*γ proteobacteria*), тип протеобактерии (*Proteobacteria*), царство бактерии. Существует большое число разновидностей кишечной палочки (*Escherichia coli*), в том числе, более 100 патогенных («энтеровирулентных») типов, объединенных в четыре класса:

- Энтеропатогенные;
- Энтеротоксигенные;
- Энтероинвазивные;
- Энтерогеморрагические.

Существует огромное количество типов кишечной палочки, в основном они непатогенные, среди них встречаются и полезные. Бактерии, входящие в состав микрофлоры, останавливают размножение патогенных бактерий. Также кишечная палочка вырабатывает витамин К. Некоторые типы *E. coli* могут вызывать тяжелые заболевания. Отличия по морфологическим показателям у патогенной и непатогенной кишечной палочки отсутствуют. Различить их можно только проанализировав их антигены. Для представителей семейства *Enterobacteriaceae* свойственны следующие тинкториально-морфологические признаки: короткие (длиной 1,5-3,0 мкм и шириной 0,6-1,2 мкм) палочки с закругленными концами, не образующие

споры, грамтрицательные. Хорошо размножаются на обычных питательных средах [43].

Культуральные свойства:

E.coli - факультативный анаэроб, хорошо растет как на обычных простых, так и на синтетических питательных средах при температуре от 15 до 46°C. Оптимальная температура культивирования - 37-38°C. Хорошо растет на средах, где рН близок к нейтральному значению (7,2-7,4). На плотных питательных средах *E.coli* образует круглые выпуклые колонии средней величины, влажные, с гладкой блестящей поверхностью с ровным краем (S-форма) или плоские, сухие со слегка волнистым краем и шероховатой поверхностью (R-форма). При культивировании в жидких средах образует интенсивно равномерное помутнение среды, образуя осадок, иногда кольца на стенке пробирки или пленку на поверхности. При встряхивании осадок распределяется по среде, образуя гомогенную взвесь. На селективно-дифференциальной среде образует колонии малиново-красного цвета с металлическим блеском. На агаре Левина (среда с эозином и метиленовым синим) - колонии темно-фиолетового цвета.

Ферментативные свойства:

Кишечная палочка продуцирует разнообразные ферменты, разлагающие углеводы и многоатомные спирты (глюкозу, галактозу, левулезу, лактозу, мальтозу, маннит, рамнозу, непостоянно - сахарозу и дульцит, раффинозу, салицин, сорбит, глицерин) с образованием пируватов, которые превращаются в молочную, уксусную и форминовую кислоты. Из форминовой кислоты образуются углекислый газ и водород. Названные бактерии образуют индол, восстанавливают нитраты в нитриты, дают положительную реакцию с метилротом. На средах с эритроцитами синтезируют α - и β -гемолизины. По культуральным, морфологическим и ферментативным свойствам непатогенные и патогенные разновидности *E. coli* не отличаются друг от друга, что затрудняет их выделение и идентификацию [5].

2) Цефалоспориновые антибиотики;

Цефалоспорины — антибиотики, в основе химического строения которых лежит 7-аминоцефалоспориновая кислота. Основными особенностями цефалоспоринов являются широкий спектр действия, высокая бактерицидность, относительно большая по сравнению с пенициллинами резистентность по отношению к β -лактамазам.

3) Наноструктурированные частицы антибиотиков. Взять описание из статьи.

Самая важная особенность наноструктурированных соединений это возможность построить огромную рабочую поверхность. Главное их применение – это контролируемое освобождение веществ в определённом месте и времени[24].

Изучение нанокapsул цефалоспориновых антибиотиков в альбумине, интерфероне и синтетическим интерфероне - полудане проводили методом НТА в водных растворах и в таблицах 2.1.1 и 2.1.2.

Таблица 2.1.1

Статистические характеристики распределений цефтриаксона в полудане [20,21,30].

Параметр	Значение
Средний размер, нм	159
D10, нм	92
D50, нм	184
D90, нм	308
Коэффициент полидисперсности, (D90-D10)/D50	1.17
Общая концентрация частиц, $\times 10^{12}$ частиц/мл	1.02

Таблица 2.1.1

Статистические характеристики распределений цефатоксима в полудане [20,21,30].

Параметр	Значение
Средний размер, нм	184
D10, нм	87
D50, нм	128
D90, нм	249
Коэффициент полидисперсности, (D90-D10)/D50	1.27
Общая концентрация частиц, $\times 10^{12}$ частиц/мл	1.15

Измерения проводили на мультипараметрическом анализаторе наночастиц Nanosight LM0 производства Nanosight Ltd (Великобритания) в конфигурации HS-BF (высококочувствительная видеокамера Andor Luca, полупроводниковый лазер с длиной волны 405 нм и мощностью 45 мВт). Прибор основан на методе Анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA), описанном в ASTM E2834.

Оптимальным разведением для разведения было выбрано 1: 100. Для измерения были выбраны параметры прибора: Camera Level = 16, Detection Threshold = 10 (multi), Min Track Length:Auto, Min Expected Size: Auto, длительность единичного измерения 215 сек, использование шприцевого насоса [20,21,30].

2.2 Методы исследования

2.2.1 Метод выделения чистой культуры

Существуют различные методы выделения чистой культуры, они основаны на следующих принципах:

1. Механическое разделение бактериальных колоний.

2. Химические и физические факторы, способные оказывать селективный процесс.

3. Способность бактерий размножаться в организме.

В своей работе мы использовали метод Дригальского, основанный на механическом разделении посевом на твердую питательную среду.

1) Засев культуры *Escherichia coli* в чашки Петри: одну каплю наносят на питательную среду и растирают по всей поверхности питательной среды шпателем.

2) Засеянные чашки переворачивают и оставляют в термостате на 18-20 часов при температуре 37⁰С.

3) После инкубации выбирают нужную культуру по морфологическим признакам колонии, и пересеивают в пробирку на скошенный агар.

4) Пробирку с культурой инкубируют в термостате при температуре 37⁰С 18-20 часов. При необходимости дополнительной очистки культуры пассаж повторяют [32].

2.2.2 Приготовление питательной среды.

В качестве питательной среды мы взяли ГРМ (питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой). Растворили при нагревании 7,5 г препарата в 300 мл. водопроводной воды. Затем, плотно закрыв колбу марлевой пробкой, автоклавировали. После автоклавирования нагревали среду до жидкого состояния и разливали по чашкам Петри.

2.2.3 Посев чистой культуры на питательную среду.

Засевали чистую культуру (*E. coli*) в чашки с ранее приготовленной средой методом «газона». Посев проводится вблизи пламени горелки. Лево́й

рукой, держа большим и указательным пальцами, слегка приоткрывают крышку. Бактериологической петлей наносят на поверхность среды материал, после чего тщательно втирают его круговыми движениями шпателя до тех пор, пока шпатель не перестанет свободно скользить по поверхности среды. При этом одновременно вращают чашку [39].

2.2.4 Диско-диффузный метод определения антибиотикочувствительности культуры *Escherichia coli*.

На исследуемую бактериальную культуру *Escherichia coli*, посеянную в чашки Петри, помещали 4 бумажных диска, с 30 мкл раствора антибиотиков, в разведении 0,01г/мл. Посев инкубировали при 37°C 24 часа. Затем определяли чувствительность *E.coli* к антибиотикам, с оценкой степени по диаметру зон ингибирования вокруг дисков [39].

2.2.5 Статистическая обработка результатов

Основная задача математической статистики заключается в определении достоверности полученных результатов. В опыте необходимо достаточное количество вариантов и повторностей. Необходимо, чтобы варианты находились в одних и тех же условиях. Основой статистических методов являются экспериментальные данные, часто называемые статистическими данными. В проведенных опытах определяют подлинность различий между средними арифметическими исследуемых вариантов. В своих расчетах мы применяли разностный метод. Разностный метод обработки используется для опытов, размещенных стандартными методами. При стандартном размещении контрольный и опытный варианты находятся в одинаковых условиях, независимо от повторений. Это повышает существенность различий между вариантами и точность опыта. Разность (d) между антибиотиками вычисляют по всем повторениям. Затем

вычисляется средняя арифметическая разности (d_{cp}). Отклонения $d-d_{cp}$ рассчитывают между каждой разностью и средним значением. Эти отклонения возводят в квадрат и суммируют, а их суммы $\sum(d-d_{cp})^2$ используют для вычисления ошибок разностей (S_d) по формуле:

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n - 1)}}$$

Где n-число повторений.

Вычисляют критерий существенности Стьюдента фактический:

$$t_{(1-2)} = (\bar{x}_2 - \bar{x}_1) / S_{d(1-2)}$$

Фактические критерии сравниваются с теоретическими и делают выводы, пользуясь таким правилом: если фактический критерий Стьюдента равен теоретическому значению или больше него, то разность между вариантами существенна на определенном уровне значимости ($P=0,001$; $0,01$ или $0,05$).

Теоретические значения критериев Стьюдента берут из таблицы чисел степеней свободы, которые вычисляются по формуле:

$$v = (n_1 - 1) + (n_2 - 1) [29].$$

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Подсчеты зон ингибирования цефалоспориновых антибиотиков в нативной и наноструктурированной формах

По результатам исследования были получены следующие данные, характеризующие зону ингибирования нативных цефалоспориновых антибиотиков и антибиотиков, находящихся в разных оболочках. Результаты представлены в таблицах 3.1.1 и 3.1.2

Таблица 3.1.1

Влияние нативной формы цефалоспориновых антибиотиков на рост кишечной палочки (*E.coli*), зона ингибирования (мм).

Название антибиотика	Среднее значение зоны ингибирования, (мм)	Ошибка среднего, $S_{\bar{x}}$
Цефазолин	12,63	0,88
Цефотаксим	18,75	1,51
Цефтриаксон	19,50	0,73
Цефепим	16,00	0,88

Таблица 3.1.2

Влияние наноструктурированных антибиотиков на рост кишечной палочки(*E.coli*), зона ингибирования (мм).

Название антибиотиков	Альгинат	Ошибка среднего, $S_{\bar{x}}$	Интерферон	Ошибка среднего, $S_{\bar{x}}$	Полудан	Ошибка среднего, $S_{\bar{x}}$
Цефазолин	4,55	0,19	11,75	0,62	0,00	0,00
Цефотаксим	4,67	0,77	10,63	1,02	14,00	0,93
Цефтриаксон	9,11	0,60	19,50	1,38	17,38	0
Цефепим	8,78	0,53	9,50	0,9	6,38	0,6

Сравнивая биологическую активность разных антибиотиков в отношении кишечной палочки, можно отметить существенную разницу как у нативных, так и у наноструктурированных форм. Максимальная активность проявляется в реакции на цефтриаксон в нативной форме, минимальна – у цефазолина как в нативной, так и в капсулированной формах. Исходя из приведенных данных, можно сказать, что антибиотики, в нативной форме, в основном, имеют большую биологическую активность, по отношению *E.coli*, чем в наноструктурированной форме.



Рисунок 3.1.1. Рост кишечной палочки при воздействии цефепима в нативной форме

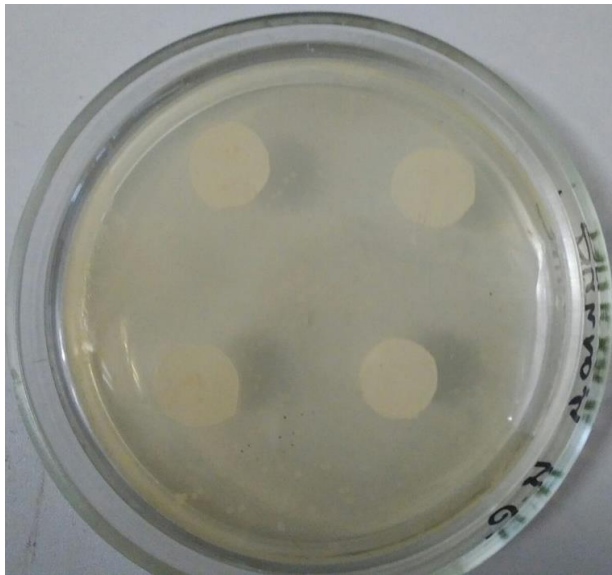


Рисунок 3.1.2. Рост кишечной палочки при воздействии цефтриаксоном в полудане



Рисунок 3.1.4 Рост кишечной палочки при воздействии цефатоксима в полудане

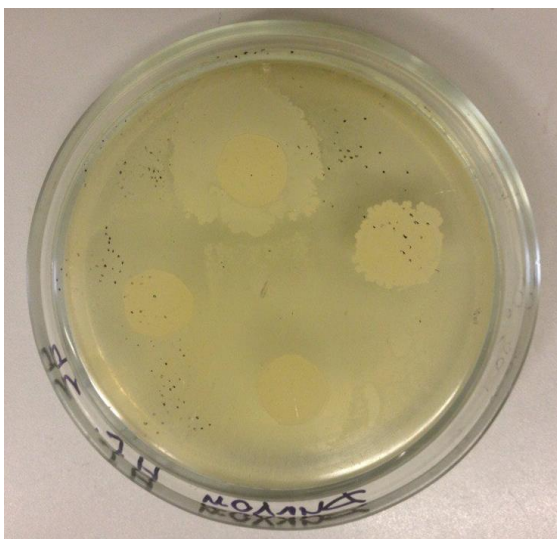


Рисунок 3.1.1. Рост кишечной палочки при воздействии цефепима в полудане

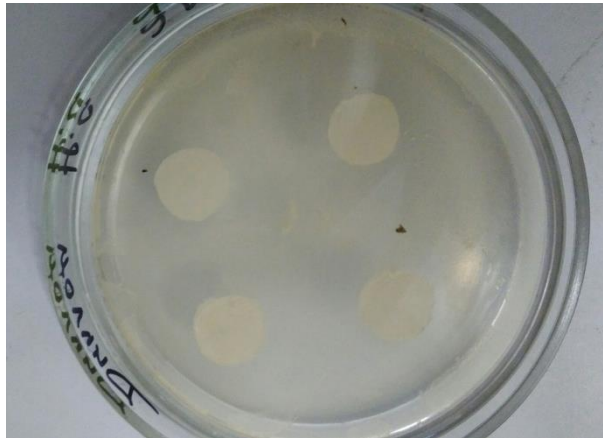


Рисунок 3.1.1. Рост кишечной палочки при воздействии цефазолина в интерфероне

Отличия значений в нативной форме антибиотиков можно объяснить тем, что антибиотики принадлежат к разным поколениям цефалоспоринов, и различной реакцией кишечной палочки. Это проявляется в разных зонах ингибирования, показанных на рисунках 3.1.1; 3.1.2; 3.1.3; 3.1.4; 3.1.5

3.2 Статистическая обработка цифровых данных, характеризующая реакцию кишечной палочки на нативные формы антибиотиков, зоны ингибирования (мм).

С помощью этого метода мы проанализировали достоверность разницы между цефалоспориновыми антибиотиками в нативной форме. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента, при различных уровнях значимости.

Таблица 3.2.1

Статистическая обработка цифровых данных, характеризующая реакцию кишечной палочки на нативные формы антибиотиков цефазолина и цефотаксима, зоны ингибирования (мм).

Цефазолин (1)	Цефотаксим (2)	d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	S _d (1-2)	t _d (1-2)
10	16	2	-0,75	0,5625	1,69	3,28
11	17	3	0,25	0,0625		
12	17	2	-0,75	0,5625		
12	18	2	-0,75	0,5625		
12	21	5	2,25	5,0625		
13	25	9	6,25	39,0625		
14	20	2	-0,75	0,5625		
17	16	-3	-5,75	33,0625		
X _{cp1} =12,63	X _{cp2} =18,75	d _{cp} =2,75	∑=0	∑(d-d _{cp}) ² = 70,50		

Различия в эффективности между цефазолином и цефотаксимом в нативном виде можно считать достоверными при уровне значимости $p=0,01$, поскольку $t_{st} = 2,95$, $t_d = 3,28$ ($t_{d(1-2)} > t_{st}$). Это можно объяснить принадлежностью этих двух антибиотиков к разным поколения, а так же их разную биологическую активность.

Таблица 3.2.2

Статистическая обработка цифровых данных, характеризующая реакцию кишечной палочки на нативные формы антибиотиков цефазолина и цефтриаксона, зоны ингибирования (мм).

Цефазолин (1)	Цефтриаксон (3)	d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	S _d (1-3)	t _d (1-3)
10	18	8	1,13	1,27	0,23	29,90
11	19	8	1,13	1,27		
12	19	7	0,13	0,02		
12	19	7	0,13	0,02		
12	20	8	1,13	1,27		
13	20	7	0,13	0,02		
14	20	6	-0,88	0,77		
17	21	4	-2,88	8,27		
X _{cp1} =12,63	X _{cp2} =19,50	d _{cp} =6,88	∑=0	∑(d-d _{cp}) ² =12,88		

Различия данных между цефазолином и цефтриаксоном в нативном виде можно считать достоверными при уровне значимости $p=0,001$, $t_{st} = 4,02$, $t_{st} = 29,90$ $t_{d(1-3)} > t_{st}$. Это можно объяснить принадлежностью этих двух антибиотиков к разным поколения, а так же их разную биологическую активность.

Таблица 3.2.3

Статистическая обработка цифровых данных, характеризующая реакцию кишечной палочки на нативные формы антибиотиков цефазолина и цефепима, зоны ингибирования (мм).

Цефазолин (1)	Цефепим (4)	d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-4)	t _d (1-4)
10	14	4	0,13	0,02	0,27	12,71
11	14	3	-0,88	0,77		
12	15	3	-0,88	0,77		
12	16	4	0,13	0,02		
12	16	4	0,13	0,02		
13	16	3	3,13	9,77		
14	18	4	0,13	0,02		
17	19	2	-1,88	3,52		
X _{cp1} =12,63	X _{cp2} =16,00	d _{cp} =3,38	∑=0	∑(d-d _{cp}) ² = 14,88		

Различия данных между цефазолином и цефепимом можно, считать достоверными при уровне значимости $p = 0,001$, $t_{st} = 4,02$, $t_{st} = 12,71$ т. е. $t_{d(1-4)} > t_{st}$. Это можно объяснить принадлежностью этих двух антибиотиков к разным поколения, а так же их разную биологическую активность.

Таблица 3.2.4

Статистическая обработка цифровых данных, характеризующая реакцию кишечной палочки на нативные формы антибиотиков между цефатоксимом и цефтриаксоном, зоны ингибирования (мм).

Цефатоксим (2)	Цефтриаксон (3)	d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	S _d (2-3)	t _d (2-3)
16	18	2	-0,25	0,06	0,42	1,79
17	19	2	-0,25	0,06		
17	19	2	-0,25	0,06		
18	19	1	-1,25	1,56		
21	20	1	-1,25	1,56		
25	20	5	2,75	7,56		
20	20	0	-2,25	5,06		
16	21	5	2,75	7,56		
X _{cp1} =18,75	X _{cp2} =19,50	d _{cp} =2,25	∑=0	∑(d-d _{cp}) ² = 23,50		

Различие данных между цефатоксимом и цефтриаксоном - недостоверны, т.к. при самом низком уровне значимости $p=0,05$, $t_{st} = 2,12$, $t_d = 1,79$ ($t_{d(2-3)} < t_{st}$). Т.к. антибиотики относятся к одному поколению и схожи по биологической активности.

Таблица 3.2.5

Статистическая обработка цифровых данных, характеризующая реакцию кишечной палочки на нативные формы антибиотиков цефотаксима и цефепима, зоны ингибирования (мм).

Цефотаксим (2)	Цефепим (4)	d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	S _d (2-4)	t _d (2-4)
16	14	2	-1,50	2,25	0,75	3,67
17	14	3	-0,50	0,25		
17	15	2	-1,50	2,25		
18	16	2	-1,50	2,25		
21	16	5	1,50	2,25		
25	16	9	5,50	30,25		
20	18	2	-1,50	2,25		
16	19	3	-0,50	0,25		
X _{cp1} =18,75	X _{cp2} =16,00	d _{cp} =3,50	∑=0	∑(d-d _{cp}) ² = 42,00		

Различие данных между цефотаксимом и цефепимом являются достоверными при самом низком уровне значимости $p=0,05$, $t_{st} = 2,12$, $t_d = 3,67$ ($t_{d(2-4)} > t_{st}$).

Таблица 3.2.6

Статистическая обработка цифровых данных, характеризующая реакцию кишечной палочки на нативные формы антибиотиков цефтриаксона и цефепима, зоны ингибирования (мм).

Цефтриаксон (3)	Цефепим (4)	d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	S _d (3-4)	t _d (3-4)
18	14	4	0,38	0,14	0,18	19,85
19	14	5	1,38	1,89		
19	15	5	1,38	1,89		
19	16	3	-0,63	0,39		
20	16	4	0,38	0,14		
20	16	4	0,38	0,14		
20	18	2	-1,63	2,64		
21	19	2	-1,63	2,64		
X _{cp1} =1 9,50	X _{cp2} =16,00	d _{cp} =3,63	∑=0	∑(d-d _{cp}) ² = 9,88		

Различия данных между цефтриаксоном и цефепимом можно, считать достоверными при высоком уровне значимости $p = 0,001$, $t_{st} = 4,02$, $t_d = 19,85$ т. к. $t_{d(3-4)} > t_{st}$. Это можно объяснить принадлежностью этих двух антибиотиков к разным поколения, а так же их разную биологическую активность.

3.3 Статистическая обработка цифровых данных, характеризующая сравнительную реакцию кишечной палочки в нативной антибиотиков и наноструктурированной форме, зоны ингибирования (мм).

По результатам исследования были получены следующие данные, характеризующие сравнительную реакцию кишечной палочки, между нативной формы антибиотиков и наноструктурированной формы, выраженной зоной ингибирования. Результаты представлены в таблице 3.3.1

Таблица 3.3.1

Статистическая обработка цифровых данных, характеризующая сравнительную реакцию кишечной палочки в нативной и наноструктурированной форме антибиотиков, зоны ингибирования, мм

№	Название антибиотика	Оболочка	Среднее значение зоны ингибирования, мм	S _d	t _d
1	Цефазолин	–	12,63	1,23	16,20
		альгинат	4,55		
2	Цефатоксим	–	18,75	0,45	25,39
		альгинат	4,67		
3	Цефтриаксон	–	17,78	0,63	18,06
		альгинат	9,11		
4	Цефепим	–	14,33	0,42	15,87
		альгинат	8,78		

В результате было выявлено, что различия достоверны между антибиотика в нативной форме и в оболочке во всех четырех случаях. Таким образом, мы выявили, что биологическая активность антибиотиков в нативной форме значительно выше, чем в наноструктурированной форме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе нашей исследовательской работы вначале были изучены литературные данные, электронные источники, а так же научные статьи. Известно, что цефалоспориновые антибиотики делятся на 5 поколений, различные по своей природной, биологической и клинической активности. Цефалоспорины - антибиотики нового поколения, устойчивость микроорганизмов к данному типу антибиотиков еще не выработалась, поэтому в настоящее время стали широко применять этот класс антибиотиков. В нашем исследовании мы взяли антибиотики I, III и IV поколений. Цефалоспориновые антибиотики до III поколения обладают высокой антимикробной активностью по отношению к грамотрицательным микроорганизмам. Что касается грамположительных бактерий, то их чувствительность к данным антибиотикам ниже, чем у грамотрицательных.

Объектом исследования стала кишечная палочка (*E.coli*), которая является грамотрицательной бактерией. Антибиотики в отношении *E. coli* в нативной форме проявили различную активность. Так, наибольшую биологическую активностью проявил цефтриаксон, со средним значением зоны ингибирования 19,50 мм. На втором месте по эффективности оказался цефотаксим, со средним значением зоны ингибирования 18,75 мм. Разница между цефтриаксоном и цефотаксимом незначительна, такая разница объясняется принадлежностью к одному поколению цефалоспориновых антибиотиков. Наименьшую эффективность показал цефазолин – 12,63 мм., в следствии его принадлежности к I поколению цефалоспориновых антибиотиков. Цефепим занял промежуточное положение со средним значением зоны ингибирования 16,00 мм.

Проанализировав полученные данные наноструктурированных форм антибиотиков, можно сделать вывод: эффективность капсулированной формы значительно меньше, чем в нативной форме. Сравнивая биологическую активность антибиотиков в наноструктурированной форме

было выявлено, что антибиотик в интерфероне проявил большую эффективность, по сравнению с другими оболочками.

По окончании исследования были достигнуты поставленные нами задачи, а именно:

1. Определили биологическую активность цефалоспориновых антибиотиков в отношении *E.coli*; Каждый антибиотик проявил различную активность. Наибольшую проявил в нативной форме – цефтриаксон. Наименьшую – цефазолин. Антибиотики в нанострукт форме, в нашем эксперименте, не всегда проявляют повышенную активность, по сравнению с нативными.

2. Провели статистическую обработку цифровых данных и определили достоверность различий по критерию Стьюдента; Биологическая активность всех антибиотиков, в подавляющем большинстве случаев, в нативной форме различна достоверна. Что касается наноструктурированной формы, по уровню активности достоверны, но различались между собой.

3. Дали сравнительный анализ биологической активности нативных и наноструктурированных антибиотиков цефалоспориновой группы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоусов Ю. Б., Моисеев В. С., Лепяхин В. К. Клиническая фармакология и фармакотерапия. М.: Универсум, 1993.
2. Белоусов Ю.Б. Клиническая фармакология и фармакотерапия. М., 2000. – 17с
3. Белясова, Н.А. Микробиология: Учебник / Н.А. Белясова. - Мн.: Вышэйшая шк., 2012. - 443 с.
4. Большой справочник лекарственных средств [Текст] / под ред. Л. Е. Зиганшиной [и др.] ; рец. Д. А. Харькевич ; АСМОК. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 574-580 с.
5. Волина, Е.Г. Частная микробиология: учебное пособие / Е.Г. Волина, Л.Е. Саруханова. - М.: РУДН, 2016. - 222 с.
6. Волова, Т. Г. Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова. – Электрон. дан. (2 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – 183 с.
7. Воронцова М.Л., Тырсин Ю.А., Кролевец А.А. Исследование микрокапсул экстракта зеленого чая методом рамановской спектроскопии / Тез. докладов международной конф. «Нанотехнологии в пищевой промышленности», М., МГУПП, 2012, 36-39 с.
8. Воронцова М.Л., Тырсин Ю.А., Кролевец А.А. Применение технологии нано- и микрокапсулирования в пищевой промышленности/ Материалы международной научно-технической конф. «Новое в технике и технологии пищевых производств», Белгород, 2013, 42—46 с.
9. Госманов, Р.Г. Микробиология и иммунология: учебное пособие. 2-е изд., пер. и доп. / Р.Г. Госманов, А.И. Ибрагимова, А.К. Галиуллин. - СПб.: Лань, 2013. - 240 с.
10. Гусев М.В., Минеева Л.А. Учебник Микробиология. Учебник, 2-е издание (1985) – 72-89 с.

11. Гэйл Э. и др. Молекулярные основы действия антибиотиков, пер. с англ., М., 1975 – 59-62 с.
12. Дьяческо С.В д.м.н.,доцент Антибактериальные препараты группы цефалоспориновых., Хабаровск 2016 г, - 32-57 с.
13. Ермольева З. В. Антибиотики, Интерферон, Бактериальные полисахариды, М., 1968 - 142-154 с.
14. Ершов Ф.И, Романцов М.Г. Лекарственные средства, применяемые при вирусных заболеваниях. Руководство для врачей., М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2007. – 103-120 с.
15. Ершов Ф.И., Романцов М.Г..Лекарственные средства, применяемые при вирусных заболеваниях., М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2007.
16. Зубков М.Н, Практическое руководство по клинической микробиологии и антимикробной терапии для врачей стационарной помощи.. Москва, 2002.- 83 с.
17. Кашкин П. Н. и др. Антибиотики, М., 1970, библиография, - 52 с.
18. Клиническая фармакология в практике врача-терапевта: учебное пособие/ под ред. В.И. Петрова.-Волгоград.: Издательство ВолГМУ, 2007.- 471с
19. Коротяев, А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. 5-е изд. / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. - СПб.: СпецЛит, 2012. - 760 с
20. Кролевец А.А., Воронцова М.Л., Быковская Е.Е., Тырсин Ю.А. Супрамолекулярные свойства микрокапсул квертецина / Тез. докладов международной конф. «Нанотехнологии в пищевой промышленности», М., МГУПП, 2012, с. 33-35.
21. КролевецА.А.,БогачевИ.А., НикитинК.С., БойкоЕ.Е., МедведеваЯ.В. Влияние природы антибиотиков цефалоспоринового ряда на размер нанокапсул наоснове альгината натрия / The priorities of the word science: experiments and scientific debate. Proceedigs of the IV international scientific conference. North Charleston, SC, USA, 2014, p. 20-22

22. Крылов Ю.Ф., Бобырев В.М. Фармакология. - М.: ВХНМЦ МЗ РФ, 1999. - 352 с.
23. Кукес В.Г. Клиническая фармакология. 2006 год. Москва. Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа» - 52-70 с.
24. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова © 2000-2007 НИИАХ СГМА ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО по антиинфекционной химиотерапии.
25. Ланчини Д., Паренти Ф., Антибиотики. Пер. с англ. — М.: Мир. 1985 г. — 272 с.
26. Машковский М.Д. - Лекарства XX века, 1998 – 134 с.
27. Машковский М.Д. "Лекарственные средства". - 14-е изд., Т.2 - М.: ООО "Новая волна", 2002. – 86 с.
28. Медицинская энциклопедия/пер с англ. М. Луппо. - М.:Крон-Пресс 1998. - 970 с.
29. Моисейченко В. Ф., Трифонова М. Ф., Заверюха А. Х., Ещенко В. Е. Основы научных исследований в агрономии, Москва «колос» 1996г. – 297 с.
30. Навальнева И.А., Кролевец А.А., Богачев И.А., Никитин К.С., Бойко Е.Е., Медведева Я.В. Исследование супрамолекулярных свойств нанокапсул ауксинов / The priorities of the word science: experiments and scientific debate. Proceedigs of the IV international scientific conference. North Charleston, SC, USA, 2014, p. 23-26
31. Навашин С. М., Фомина И. П. и Сазыкин Ю. О. Антибиотики группы аминогликозидов, М., 1977
32. Нетрусов А.И, Котова И.Б., Микробиология. Учебник 2009 г. – 87 с.
33. Нил, М. Д. Наглядная фармакология [Текст] : учеб. пособие / М. Д. Нил ; пер. с англ. под ред. Р. А. Аляутдина. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 104 с. : ил. - Предм. указ.: с. 100- 103
34. О. Ефременкова Журнал «Наука И Жизнь» №8 2006г. Антибиотики: Жизнь Продолжается Кандидат биологических наук О. (Научно-

исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва)

35. Першин Г. Н., Гвоздева Е. И. Учебник фармакологии. М.: Медицина, 1967.

36. Поздеев О.К.. Медицинская микробиология. Москва, ГЭОТАР-МЕД, 2001- 32-49 с.

37. Рациональная антимикробная терапия. Руководство для практикующих врачей под редакцией В.П. Яковлева, С.В. Яковлева. Москва, 2003.- 74-89 с.

38. Ряженев В.В. "Фармакология". - М.: Медицина, 1984 – 43-58 с.

39. Сиротин А.А., Королевцев А.А., Трифонова М.Ф., Ключева В.В., Горлова А.А., Савинова Н.С. «Наноструктурированные цефалоспориновые антибиотики: свойства и биологическая активность»

40. Справочник по антимикробной терапии. Выпуск 1. Л.С. Страчунский. Москва, 2006 – 57-61с.

41. Харкевич Д.А. Фармакология: учебник для студентов медицинских вузов. 2005. – 38с.

42. Харкевич, Д. А. Фармакология : учеб. для вузов / Д. А. Харкевич. - 10-е изд., испр., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 752 с. : ил. - Указ. препаратов: с. 730-750.

43. Шлегель Г.Г История микробиологии 2006г., - 12-25 с.

44. Germani Y, Bégaud E, Duval P, Le Bouguéne C. Prevalence of enteropathogenic, enteroaggregative, and diffusely adherent *Escherichia coli* among isolates from children with diarrhea in New Caledonia. *J Infect Dis.* 1996 Nov;174(5):1124-6

45. Isabel C. A. Scaletsky, Sandra H. Fabbri, Rozane L. B. Carvalho, Claudia R. Nunes, Helcio S. Maranhão, Mauro B. Morais, and Ulysses Fagundes-Neto Diffusely Adherent *Escherichia coli* as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil: a Case-Control Study. *J Clin Microbiol.* 2002 Feb; 40(2): 645–648.

46. Mansan-Almeida R, Pereira AL, Giugliano LG. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiol.* 2013 Feb 1;13:22

47. Tyrsin Yu.A., Krolevets A.A., Edelev D.A., Bykovskaya E.E. Nano and micro capsulation of cephalosporin antibiotics / *World Applied Sciences Journal*, 2014, v.30, N 11, p.1636-1641

48. Фармакология: http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/pharmakologia/lectures_stud/ru/med/lik/ptn/Фармакология/3%20курс/17%20%20Фармакология%20антибиотиков.htm: дата обращения 13.02.2017 г.

49. Обзор антибиотиков группы цефалоспорины с названиями препаратов: <http://lifetab.ru/antibiotiki-tsefalosporinovogo-ryada-spisok-preparatov/#3>: дата обращения