

На правах рукописи

ЛИХАЧЕВ
Иван Владимирович

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МИНИМАЛЬНОЙ ПОДАВЛЯЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ
АНТИБИОТИКОВ МЕТОДОМ ГРАДИЕНТНОЙ ДИФФУЗИИ**

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2025

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: Кафтырева Лидия Алексеевна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник

Официальные оппоненты:

Тец Виктор Вениаминович - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии имени академика Д. К. Заболотного, заведующий кафедрой

Царев Виктор Николаевич - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__»_____2025 года в__ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан: «__»_____2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Пименова Алена Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (АМП) является важнейшей задачей в современной бактериологической лаборатории.

В большинстве случаев для этой цели используют широко распространённый диско-диффузионный метод (ДДМ) (Bauer, A.W. et al., 1966). Однако этим методом нельзя произвести количественную оценку чувствительности штамма, в то время как определение точного значения минимальной подавляющей концентрации (МПК) выбранного препарата во многих случаях играет ключевую роль (Поляк, М.С., 2014; Wilcox M. et al., 2019). При оценке чувствительности возбудителей инфекций с топографически труднодоступной локализацией очага, при сепсисе, хронических инфекциях и у пациентов с иммунодефицитами, а также инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, приобретают всё большую актуальность методы количественного определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (Magréault, S. et al., 2022).

С точки зрения последующего анализа, определение значения минимальной подавляющей концентрации является оптимальным, так как позволяет оценить имеющиеся результаты лабораторных исследований и адаптировать к новым стандартам ретроспективные данные при изменении критериев интерпретации (Козлов Р.С., 2000). Значение минимальной подавляющей концентрации необходимо при проведении микробиологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора (Шаталова Е.В. и др., 2016; Кафтырева Л.А. и др., 2017).

Метод градиентной диффузии (Е-тест) — один из наименее трудоёмких способов определения значения минимальной подавляющей концентрации (Hossain T.J. et al., 2024). Кроме исследования минимальной подавляющей концентрации антимикробных препаратов, модифицированный метод градиентной диффузии (кросс-тест) используется также при оценке комбинированного воздействия антимикробных препаратов (Rossolini G.M. et al., 2014; Ventola C.L. et al., 2014; Economou V. et al., 2015).

В настоящее время тест-полоски для определения значения минимальной подавляющей концентрации микроорганизмов к антимикробным препаратам в Российской Федерации, включая территории стран Евразийского экономического сообщества (ЕВРАЗЭС), не производятся. Использование зарубежных тест-систем затруднительно вследствие высокой стоимости и возможных ограничений импорта. Таким образом, разработка методики изготовления отечественных Е-тестов является востребованной и актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

Метод градиентной диффузии, или эпсилOMETрический тест (E-test), впервые был предложен Bolmstrom A. et al. в 1988 г. Среди отечественных разработок, наиболее близким к коммерческому исполнению E-test, является изобретение,

описанное Кальным С.М. и соавторами в патенте РФ №2147610. В данном патенте приведена методика изготовления полосок для эпсилометрического теста, предназначенная для выполнения исследователем. Технология промышленного выпуска в виде тест-систем авторами не разрабатывалась. Таким образом, в открытых источниках отсутствует информация о технологии изготовления Е-тестов, применимой для создания тест-систем.

Наиболее известными тест-системами данного типа являются: M.I.C. Evaluator (Oxoid, Великобритания), Etest (bioMérieux, Франция), Ezy MIC (HiMedia, Индия), MIC TEST STRIP (Liofilchem, Италия), MIC test strips (BIOANALYSE, Турция).

Цель исследования

Разработка диагностической тест-системы для определения чувствительности к антимикробным препаратам методом Е-теста с последующей проверкой на эталонных и клинических штаммах.

Задачи исследования:

1. Оценить частоту встречаемости комбинаций штамм микроорганизма/антимикробный препарат, относящихся к категории «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» или к зоне технической неопределённости.

2. Провести сравнительный анализ характеристик пористых и непористых листовых материалов, определить наиболее подходящие для использования в качестве подложки тест-полосок.

3. Разработать алгоритм расчёта концентрации и нанесения растворов антимикробных препаратов на подложку тест-полосок.

4. Спроектировать и изготовить лабораторную установку непрерывного нанесения антимикробных препаратов на подложку тест-полосок.

5. Исследовать функциональные характеристики тест-полосок на эталонных и клинических штаммах и определить их соответствие критериям приемлемости для медицинских изделий данного класса.

6. На клинических штаммах оценить возможность применения изготовленных тест-полосок для изучения комбинированного воздействия антимикробных препаратов методом кросс-теста.

Научная новизна

На статистически достоверной выборке (n=2212) изолятов *E. coli*, *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp. выявлены антимикробные препараты с наибольшей частотой встречаемости категории «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» и зоны технической неопределённости.

На основании распределения категории «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» и зоны технической неопределённости среди штаммов *E. coli*, *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp. изучено процентное соотношение данных энтеробактерий и установлены достоверные различия их частоты встречаемости для каждого из исследованных антимикробных препаратов.

Впервые в Российской Федерации разработана тест-система, предназначенная

для определения чувствительности к антимикробным препаратам методом градиентной диффузии и установлено, что в качестве материала подложки возможно использование бумаги фильтровальной быстрой фильтрации плотностью 160 ± 10 г/м², толщиной $0,4 \pm 0,1$ мм).

Предложена формула для расчёта концентрации наносимых на подложку тест-полосок растворов антимикробных препаратов, учитывающая концентрацию антимикробных препаратов, которую необходимо достичь в непосредственной близости от тест-полоски, геометрические характеристики подложки и объём жидкости, приходящийся на участок полоски с одной концентрацией.

Разработан прототип лабораторной установки для нанесения растворов антимикробных препаратов на подложку тест-полосок, представляющий из себя 16-канальную помпу с роликовым дозатором.

С помощью изготовленных тест-полосок воздействие комбинаций азидотимидина и байкалина с антимикробными препаратами в отношении изолятов *Klebsiella pneumoniae*. Для комбинации азидотимидина с гентамицином был выявлен синергетический эффект, для комбинации азидотимидина с ципрофлоксацином и байкалина с цефотаксимом — аддитивный эффект.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о необходимости количественного определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Установлена распространённость категории «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» и зоны технической неопределённости среди штаммов *E. coli*, *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp. по отношению к 13 антимикробным препаратам 7 фармакологических групп, что позволяет с новых позиций подойти к оценке потребности в тест-системах для количественного определения чувствительности данных микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Изучение воздействия антимикробных препаратов методом кросс-теста дают возможность рассматривать результаты работы в качестве основы развития нового перспективного направления — создания тест-систем для оценки комбинированного применения антимикробных препаратов, особенно актуального в условиях роста антибиотикорезистентности.

Выявленный в работе синергетический эффект комбинаций азидотимидина и байкалина с антимикробными препаратами (гентамицин, цефотаксим, ципрофлоксацин) в отношении штаммов *Klebsiella pneumoniae* позволяет расширить возможности антибиотикотерапии в отношении резистентных изолятов.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в создании методики расчёта концентраций растворов антимикробных препаратов, способе изготовления тест-полосок и сконструированном прототипе лабораторной установки, применение которых демонстрирует возможность создания тест-системы для количественного определения чувствительности из доступного отечественного сырья, что особенно актуально в условиях импортозамещения.

Использованные в работе подходы формируют методическую базу для изготовления тест-систем на основе принципа градиентной диффузии, предназначенных для определения клинически значимых фенотипов резистентности.

Разработанные протоколы оценки функциональных характеристик тест-системы применимы в качестве основы программы для клинических испытаний при регистрации данного медицинского изделия в системе Росздравнадзора.

Тест-полоски, изготовленные на основании материалов диссертационного исследования, используются для количественного определения чувствительности клинических штаммов бактерий к антимикробным препаратам в работе Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (акт внедрения от 08.11.2024), Государственного Бюджетного Учреждения "Республиканский клинический центр инфекционных болезней, профилактики и борьбы со СПИД" (акт внедрения от 13.11.2024) и Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова» (акт внедрения от 27.11.2024).

Методология и методы исследования

В работе применялись общепринятые методы определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам — метод градиентной диффузии и метод серийных разведений (МСР) в бульоне. В качестве референтной тест-системы при исследовании минимальной подавляющей концентрации антимикробных препаратов в отношении штаммов ESKAPE методом градиентной диффузии использовали М.І.С.Е.-полоски производства «Oxoid» (Великобритания) со следующими антимикробными препаратами: азитромицин, амикацин, ванкомицин, гентамицин, меропенем, оксациллин, цефотаксим, ципрофлоксацин.

Исследование проводили на базе лабораторий биопрепаратов, кишечных инфекций и медицинской бактериологии Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертационное исследование одобрено на заседании локального этического комитета Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека №97/1 от 30.05.2024.

Материал исследования

Штаммы микроорганизмов. Для изучения распространенности микробиологических критериев количественного определения чувствительности к антимикробным препаратам исследовали 2212 штаммов микроорганизмов порядка *Enterobacterales*: *E. coli* (n = 1223), *Salmonella* spp. (n = 881), *Klebsiella* spp. (n =

108). Для оценки функциональных характеристик разработанной тест-системы использовали эталонные штаммы Американской коллекции типовых культур (ATCC) - *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. pneumoniae* ATCC 49619 и штаммы возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) (n=133) - *E. coli* (n=12), *Enterococcus* spp. (n=15), *S. aureus* (n=30), *K. pneumoniae* (n=28), *Acinetobacter* spp. (n=15), *P. aeruginosa* (n=13), *Enterobacter* spp. (n=20). Штаммы были получены из ГБУЗ и ФБУЗ Центров гигиены и эпидемиологии Санкт-Петербурга и Ленинградской области, Владивостока, Вологды, Мурманска, Омска и Челябинска.

Питательные среды. В работе использовали бульон и агар Мюллера-Хинтон (Himedia, Индия), бульон и агар Мюллера-Хинтон для прихотливых микроорганизмов, «ГМФ-агар» (ООО НИЦФ, РФ).

Антимикробные препараты и компоненты рабочих растворов. В работе использовали следующие субстанции АМП (Sigma-Aldrich, Германия). Для растворения АМП и получения рабочих растворов применяли реактивы, предоставленные АО «ЛенРеактив» (РФ).

Методы исследования

Микробиологические методы. В работе использовали общепринятые методы определения чувствительности микроорганизмов к АМП – диско-диффузионный метод (ДДМ), метод градиентной диффузии и метод серийных разведений (МСР) в бульоне.

Диско-диффузионный метод. Оценку чувствительности изолятов диско-диффузионным методом к 18 проводили к следующим АМП: амикацин (30 мкг), амоксициллин/клавулановая кислота (20/10 мкг), ампициллин (10 мкг), гентамицин (10 мкг), нитрофурантоин (300 мкг), меропенем (10 мкг), налидиксовая кислота (30 мкг), тетрациклин (30 мкг), тобрамицин (10 мкг), триметоприм/сульфаметоксазол (1,25/23,75 мкг), хлорамфеникол (30 мкг), цефепим (30 мкг), цефотаксим (5 мкг), цефтазидим (10 мкг), ципрофлоксацин (5 мкг), эртапенем (10 мкг). В исследовании применяли диски производства Oxoid (Великобритания). Чувствительность исследуемых штаммов оценивали по стандартам EUCAST 14.0 (2024) и CLSI M100-ED34 (2024).

Метод градиентной диффузии. Инокуляцию чашек с агаром, аппликацию тест-полосок, инкубацию и учёт результатов производили в соответствии с рекомендациями KMAX (Версия 2024-02). Перед проведением исследования тест-полоски с антимикробными препаратами выдерживали при комнатной температуре (18–25) °С в течение 1 ч. с целью предотвращения образования конденсата на тест-полосках. В качестве референтной тест-системы при исследовании МПК АМП в отношении штаммов ESKAPE методом градиентной диффузии использовали M.I.C.E.-полоски производства «Oxoid» со следующими АМП: азитромицин, амикацин, ванкомицин, гентамицин, меропенем, оксациллин, цефотаксим, ципрофлоксацин. Определение чувствительности при помощи тест-полосок,

изготовленных в ходе диссертационного исследования, производили к следующим АМП: амикацин, азитромицин, азтреонам, амоксициллин/клавулановая кислота, бензилпенициллин, ванкомицин, гентамицин, имипенем, клиндамицин, левофлоксацин, меропенем, нитрофурантоин, оксациллин, тетрациклин, триметоприм/сульфаметоксазол, хлорамфеникол, цефепим, цефотаксим, цефтазидим, цефтриаксон, ципрофлоксацин, эритромицин.

Метод серийных разведений. Рабочие растворы АМП готовили, используя растворители и разбавители, рекомендованные CLSI M100. Проведение исследования методом серийных разведений осуществляли согласно ГОСТ Р ИСО 20776-1-2021. Перечень АМП, исследованных методом серийных разведений, соответствовал перечню, исследованному методом градиентной диффузии с помощью изготовленных тест-полосок.

Метод кросс-теста. Значения МПК исследуемых АМП определяли методом градиентной диффузии. С помощью пинцета располагали две тест-полоски на поверхности питательной среды таким образом, чтобы место их пересечения приходилось на предварительно установленные значения МПК каждого из АМП в отношении исследуемого изолята.

Метод твердотельного моделирования. Проектирование лабораторной установки для производства тест-полосок Е-теста осуществлялось методом твердотельного моделирования в программном комплексе системы автоматизированного проектирования SolidWorks Premium 2018 SP5.0.

Статистические методы. Статистическую обработку результатов осуществляли согласно руководящим документам, регламентирующим проведение оценки функциональных показателей тест-систем, предназначенных для определения чувствительности к АМП. Результаты исследований обрабатывали при помощи электронных таблиц MS-Excel. Были оценены воспроизводимость, правильность и показатели качества (категорийное согласование (categorical agreement, CA), существенное согласование (essential agreement, EA), большое расхождение (major discrepancy, MD) и очень большое расхождение (very major discrepancy, VMD).

Личное участие автора в получении результатов

Автором самостоятельно сформулированы цель и задачи исследования, разработаны необходимые для исследования методологические подходы, организованы и выполнены все разделы диссертационной работы. Автором проведён анализ данных научного и справочного характера, разработаны методики расчёта концентраций антимикробных препаратов, наносимых на тест-полоски, спланированы и выполнены микробиологические эксперименты, работы по проектированию и изготовлению лабораторной установки, анализ и статистическая обработка полученных результатов, сформированы выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшего исследования.

Изучение чувствительности изолятов диско-диффузионным методом выполнено на базе лаборатории кишечных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт

эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (заведующая лабораторией — д.м.н., вед.н.с. Макарова М.А.).

Изучение чувствительности клинических изолятов группы ESKAPE выполнено на базе лаборатории медицинской бактериологии Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (заведующая лабораторией — д.м.н., вед.н.с. Краева Л.А.). Разработка методики изготовления тест-полосок и апробация изготовленных изделий на эталонных штаммах выполнялась на базе лаборатории биопрепаратов отдела новых технологий Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (заведующий отделом — к.х.н. Вербов В.Н.).

Основные положения, выносимые на защиту

1. По результатам проведённого изучения чувствительности штаммов *E.coli*, *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp. к антимикробным препаратам, подтверждена актуальность разработки отечественной тест-системы для определения МПК методом градиентной диффузии (Е-тест).

2. Впервые разработана методика для изготовления Е-тестов, отличающаяся алгоритмом расчёта концентрации раствора антимикробного препарата и использованием фильтровальной бумаги ЛФБ-160 в качестве подложки, и лабораторная установка, представляющая собой 16-канальную шприцевую помпу с роликовой подачей.

3. Установлено, что тест-система, изготовленная по разработанной методике, соответствует критериям приемлемости для медицинских изделий данного класса и пригодна для количественного определения чувствительности к антимикробным препаратам и изучения комбинированного действия методом кросс-теста.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность и обоснованность результатов работы обеспечена достаточным объемом исследований, применением референтных методов исследования и статистической обработкой полученных данных согласно требованиям руководящих документов. Диско-диффузионным методом изучена чувствительность 2212 клинических изолятов порядка *Enterobacterales* (1223 — *E. coli*, 881 — *Salmonella* spp., 108 — *Klebsiella* spp). Исследования методом градиентной диффузии включали в себя определение минимальной подавляющей концентрации к 22 антимикробным препаратам при помощи разработанных тест-полосок на эталонных штаммах коллекции АТСС (n=5) и клинических изолятах (n=121), в качестве эталона сравнения применялся референтный метод серийных разведений и коммерческие Е-тесты.

Апробация работы проведена на заседании Ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 12 от 18.12.2024 г.). Основные результаты работы доложены и обсуждены на научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Иркутск, 5–7 декабря 2017 г.), семинаре «Стандарты лабораторной диагностики в рамках организации и проведения эпиднадзора за иерсиниозами» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, 23–25 октября 2019 г.), всероссийской научно-практической интернет-конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора с международным участием (Пермь, 5–9 октября 2020 г.), семинаре «Стандарты лабораторной диагностики в рамках организации и проведения эпиднадзора за иерсиниозами», (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, 12-14 декабря 2023 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 статьи – в рецензируемых изданиях, 4 тезиса в материалах международных и всероссийских научно-практических конференций, 1 патент на изобретение РФ.

Структура и объём диссертации

Текст работы изложен на 145 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, трёх глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 26 рисунками и 26 таблицами. Список литературы содержит 186 источников, из которых 57 – отечественных и 129 – зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Определение чувствительности к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом

С целью оценки практической востребованности тест-системы для количественного определения чувствительности к АМП, оценивали частоту встречаемости комбинаций штамм микроорганизма/АМП, относящихся к категории «чувствительный при увеличенной экспозиции АМП» (I) или к зоне технической неопределённости (ЗТН). Исследование представляло собой ретроспективное изучение чувствительности 2212 клинических изолятов порядка *Enterobacterales* (1223 – *E. coli*, 881 – *Salmonella* spp., 108 – *Klebsiella* spp.) к АМП. Интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с критериями международных стандартов EUCAST 14.0 (2024), лежащего в основе отечественных клинических рекомендаций (КМАХ, Версия 2024-02) и CLSI M100-ED34 (2024). По результатам проведённой работы, представленным в таблице 1, установлено:

Таблица 1 – Частота встречаемости категории «I» и ЗТН согласно EUCAST 14.0 и категории «I» согласно CLSI M100-ED34

Частота встречаемости	Микроорганизм/АМП					
	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i> spp.		<i>Klebsiella</i> spp.	
	EUCAST 14.0	CLSI M100-ED34	EUCAST 14.0	CLSI M100-ED34	EUCAST 14.0	CLSI M100-ED34
<1 %	цефотаксим, меропенем, триметоприм/сульфаметоксазол	хлорамфеникол, эртапенем, меропенем, тетрациклин	цефотаксим, триметоприм/сульфаметоксазол	хлорамфеникол, эртапенем, меропенем, триметоприм/сульфаметоксазол, тетрациклин	цефтазидим	-
1-10%	цефтазидим, цефепим, ципрофлоксацин	ципрофлоксацин, нитрофурантоин, цефепим, налидиксовая кислота, триметоприм/сульфаметоксазол	цефтазидим, цефепим	амикацин, амоксициллин/клавулановая кислота, ампициллин, цефепим	цефепим, меропенем	амоксициллин/клавулановая кислота, хлорамфеникол, ципрофлоксацин, цефепим, гентамицин, меропенем, налидиксовая кислота, тобрамицин
10-50%	амоксициллин/клавулановая кислота	амикацин, амоксициллин/клавулановая кислота, гентамицин, тобрамицин	—	нитрофурантоин	амоксициллин/клавулановая кислота	амикацин
>50%	—	—	—	—	ципрофлоксацин	—

Примечание: «—» — не встречались

1. Количество исследований с результатом «чувствительный при увеличенной экспозиции» или ЗТН зависит от применяемого стандарта интерпретации. В стандарте CLSI M100-ED34 отсутствует категория ЗТН, в то же время критерии интерпретации предполагают наличие категории «чувствительный при увеличенной экспозиции» для аминогликозидов и нитрофурантоина.

2. Согласно стандарту EUCAST 14.0, среди тестируемых АМП, наиболее часто требуется количественное определение чувствительности к амоксициллину/клавулановой кислоте, цефалоспорином (цефотаксим, цефтазидим, цефепим), ципрофлоксацину и к триметоприм/сульфаметоксазолу

3. Согласно стандарту CLSI M100-ED34, наиболее актуально количественное определение чувствительности среди исследованных АМП для ципрофлоксацина, амоксициллина/клавулановой кислоты, нитрофурантоина и аминогликозидов (гентамицин, тобрамицин, амикацин).

Выбор материала подложки изделия

В качестве подложки для изготовления тест-полосок были рассмотрены листовые пористые и непористые материалы. Материалы должны были отвечать критериям приемлемости по следующим параметрам: влагостойкость, термическая устойчивость, эластичность, стойкость к методам стерилизации, отсутствие взаимодействия с исследуемой культурой микроорганизмов, минимальные потери АМП при нанесении, возможность резки в размер механическим режущим инструментом, возможность нанесения типографского изображения, стоимость и доступность материала, утилизация вместе с отходами класса «Б». Из пористых материалов в качестве материала подложки рассматривался картон фильтровальный плотностью 270 г/м², бумага фильтровальная плотностью 160 г/м², мембрана нитроцеллюлозная (диаметр пор 0,45 мкм) и мембрана нейлоновая (диаметр пор 0,45 мкм), из непористых — плёнки из полистирола (PS), полиэтилена (PE), полипропилена (PP), полиамида (PA), полиэтилентерефталата (PET) и поливинилхлорида (PVC). Из пористых материалов наиболее подходящей по совокупности параметров являлась бумага фильтровальная плотностью 160 г/м², из непористых — плёнка из полиэтилентерефталата. Результаты исследования показали, что наиболее подходящий пористый материал для изготовления тест-полосок - это однокомпонентная подложка из фильтровальной бумаги марки ЛФБ-160, поскольку при сорбции АМП на данный материал можно использовать более производительную технологию непрерывного нанесения.

Разработка методики расчёта концентрации АМП и способа нанесения АМП на впитывающую подложку

Для определения концентрации АМП, наносимого на подложку, была выведена формула (1):

$$C_{1-\text{го разведения}} = \frac{C_0 \times e \times x \times y \times z}{V_{\text{нанесения}}}, \quad (1)$$

где C_0 — концентрация АМП в мкг/мл, которую необходимо достичь в непосредственной близости от полоски (значение, нанесённое на шкале), e —

математическая константа, xyz – длина, ширина и высота участка нанесения одной концентрации на подложке (см), $V_{\text{нанесения}}$ – объём раствора в мкл, наносимый на участок полоски с одной концентрацией (определяется экспериментально в зависимости от впитывающих свойств подложки). После определения концентрации и приготовления раствора, наносимого на участок с самой большой концентрацией ($C_{1\text{-го}}$ разведения), готовится ряд двукратных разведений ($n=16$), наносимых на остальные участки.

Разработка конструкции устройства нанесения АМП на впитывающую подложку

Для изготовления тест-полосок Е-теста разработана установка, представляющая собой устройство, состоящее из блока перемещения подложки относительно капилляров и блока подачи раствора в капилляры. Схематическое изображение устройства представлено на рисунке 1. Блок подачи раствора обозначен цифрой 1 на рисунке 1 и представляет собой 16-канальную шприцевую помпу, связанную через быстросъёмные соединения капиллярами с дозирующей головкой, имеющей регулировку расстояния между наконечниками и регулировку по высоте и углу наклона относительно подложки. Блок перемещения подложки обозначен цифрой 2 на рисунке 1 выполнен в виде стола с парой обрешиненных валиков, приводимых в движение электроприводом. С помощью собранной лабораторной установки были изготовлены тест-полоски на основе подложки из фильтровальной бумаги плотностью 160 г/м².

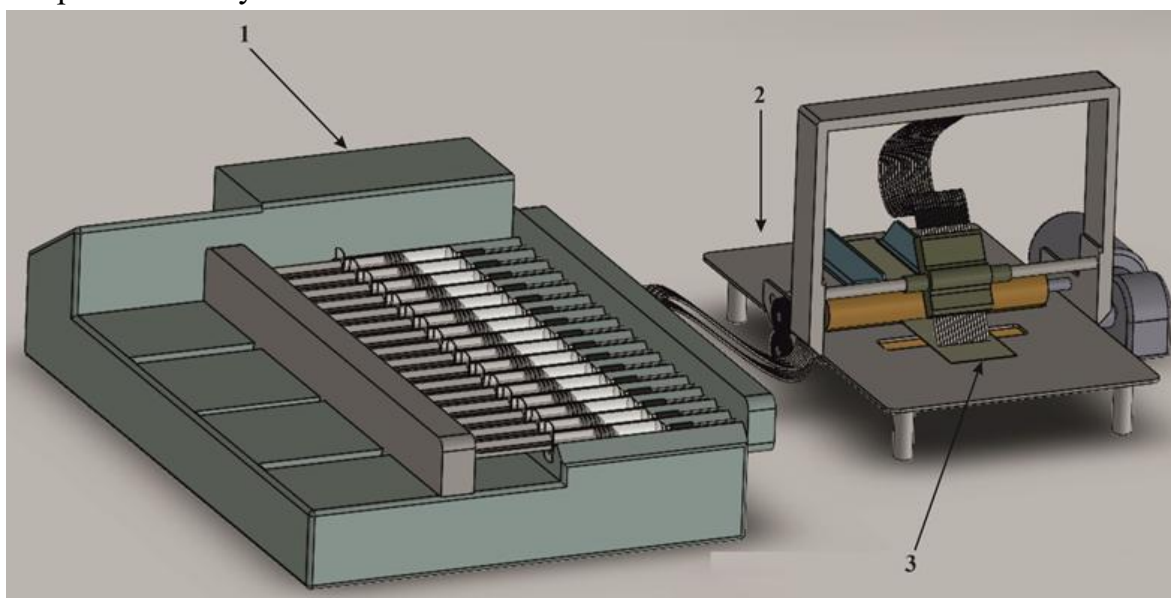


Рисунок 1 – 16-канальная шприцевая помпа с роликовой подачей
Примечание: 1 — шприцевая помпа, 2 — роликовая подача, 3 — подложка

Изготовленные тест-полоски

Перечень АМП ($n=22$), которые были нанесены на тест-полоски, был сформирован таким образом, чтобы в максимально включить используемые в настоящее время фармакологические группы АМП. Изготовленные тест-полоски и диапазоны концентраций АМП на них представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Тест-полоски с АМП, изготовленные в ходе диссертационного исследования

№ п/п	Наименование АМП	Диапазон концентраций АМП, мкг/мл	Фармакологическая группа АМП
1	Амикацин	0,016 – 512	Аминогликозиды
2	Гентамицин	0,016 – 512	
3	Хлорамфеникол	0,016 – 512	Амфениколы
4	Ванкомицин	0,016 – 512	Гликопептиды
5	Имипенем	0,004 – 128	Карбапенемы
6	Меропенем	0,004 – 128	
7	Клиндамицин	0,016 – 512	Линкозамиды
8	Азитромицин	0,008 – 256	Макролиды
9	Эритромицин	0,016 – 512	
10	Азтреонам	0,008 – 256	Монобактамы
11	Нитрофурантоин	0,031 – 1024	Нитрофураны
12	Амоксициллин/клавулановая кислота	0,016/2 – 512/2	Пенициллины
13	Оксациллин	0,016 – 512	
14	Бензилпенициллин	0,016 – 512	
15	Триметоприм/сульфаметоксазол	0,0008/0,016 – 26,9/512	Сульфаниламиды
16	Тетрациклин	0,016 – 512	Тетрациклины
17	Цефепим	0,008 – 256	Цефалоспорины
18	Цефотаксим	0,004 – 128	
19	Цефтриаксон	0,004 – 128	
20	Цефтазидим	0,016 – 512	
21	Левифлоксацин	0,008 – 256	Фторхинолоны
22	Ципрофлоксацин	0,004 – 128	

Оценка воспроизводимости и правильности результатов, получаемых при помощи разработанных тест-полосок

Воспроизводимость — это степень близости друг к другу независимых результатов измерений [ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002]. Воспроизводимость результатов, полученных при помощи разработанных тест-полосок, оценивали на основании тройного параллельного исследования каждого наименования тест-полосок.

Исследование проводили с использованием эталонных штаммов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212 и *S. pneumoniae* ATCC 49619 на основании целевых и допустимых значений МПК, установленных EUCAST в разделе «Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion» и Институтом клинических и лабораторных стандартов в разделе «Perfomans standarts for antimicrobial

susceptibility testing» (CLSI M100-S25). Всего было исследовано 22 наименования тест-полосок, содержащих АМП из 13 фармакологических групп.

Удовлетворительным результатом считалось совпадение результатов определения МПК для комбинации АМП/штамм микроорганизма в пределах $\pm$ одно двукратное разведение, как продемонстрировано на рисунке 2.

Правильность — степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений (или результатов испытаний), к истинному значению [ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002]. За действительные значения в данном исследовании принимался диапазон значений МПК, указанный в руководящих документах для каждого сочетания АМП-эталонный штамм. Правильность считалась доказанной при соответствии всех полученных значений МПК диапазону допустимых значений МПК.

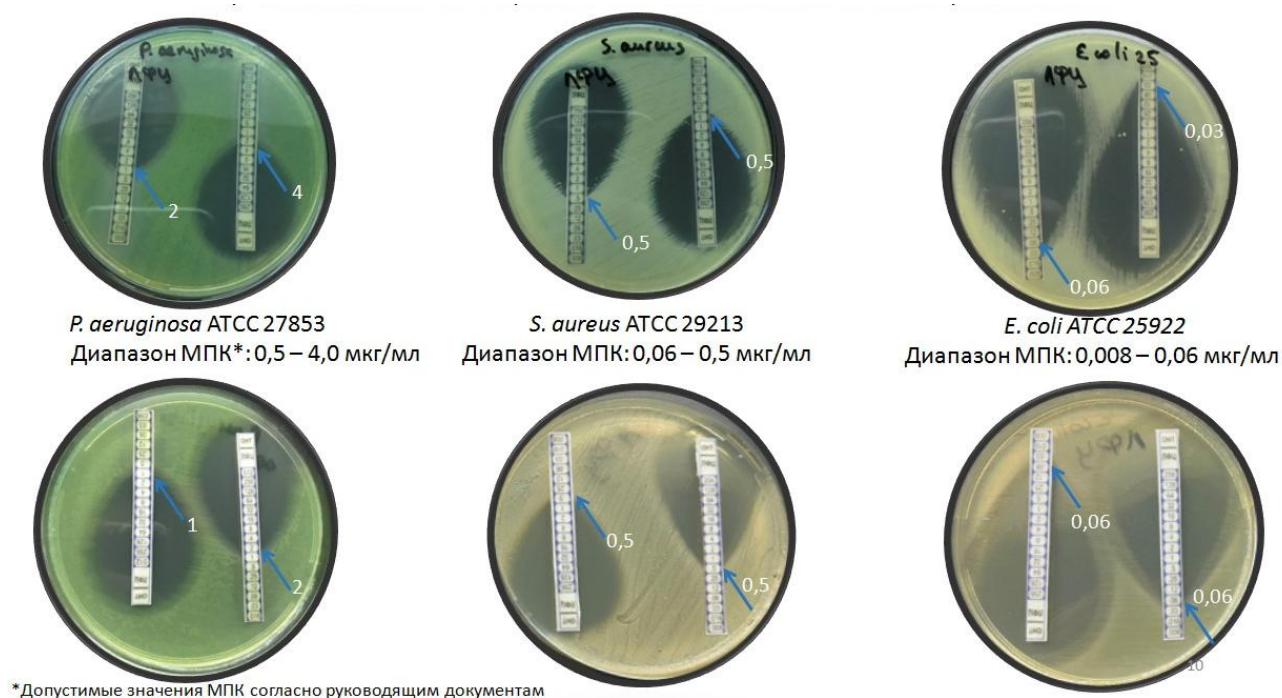


Рисунок 2 — Определение МПК с помощью тест-полосок

Оценка показателей качества на клинических изолятах с использованием референтного метода серийных разведений

При оценке показателей качества (СА, ЕА, MD, VMD) на клинических изолятах с использованием разработанных тест-полосок и референтного метода серийных разведений (МСР), за истинные значения принимались значения МПК, полученные при помощи МСР в бульоне Мюллера-Хинтон в 96-ти луночных полистироловых планшетах («Медполимер», РФ). Для определения показателей СА и ЕА сравнивали значения МПК, полученные с помощью разработанного изделия и референтного метода, как показано на рисунке 3. Критерии приемлемости для показателей качества приведены в таблице 3, полученные значения показателей качества приведены в таблице 4.

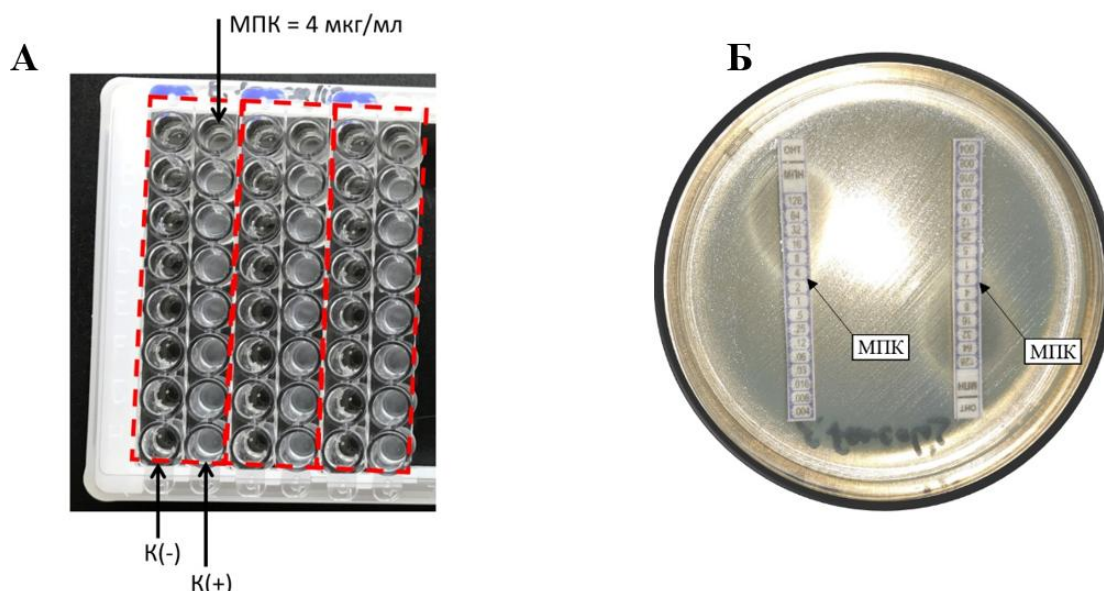


Рисунок 3 — Параллельное определение МПК с помощью МСР (А) и методом градиентной диффузии (Б)

Примечание: K(–) — отрицательный контроль; K(+) — положительный контроль

Для определения показателей MD и VMD сравнивались клинические категории, соответствующие полученным значениям МПК.

Таблица 3 – Расчет показателей качества и допустимые критерии приемлемости

Коэффициент эффективности	Формула расчета	Значение переменных в формуле	Критерий приемлемости
Категорийное согласование (Categorical agreement, CA)	$\frac{N_{CA}}{NT} \times 100$	N_{CA} – число штаммов в той же категории, что и категории по референтному методу; NT – общее число штаммов	$\geq 90 \% CA$
Существенное согласование (Essential agreement, EA)	$\frac{N_{EA}}{NT} \times 100$	N_{EA} – число штаммов со значением МПК, находящимся в пределах одного двукратного разведения от МСР; NT – общее число штаммов	$\geq 90 \% EA$
Большое расхождение (Major discrepancy, MD)	$\frac{N_{MD}}{N_{RefS}} \times 100$	N_{MD} – число штаммов, оцененных как резистентные тестируемым методом, но как чувствительные при помощи МСР; N_{RefS} – число изолятов, оцененных как чувствительные МСР	$\leq 3 \% MD$
Очень большое расхождение (Very major discrepancy, VMD)	$\frac{N_{VMD}}{N_{RefR}} \times 100$	N_{VMD} – число штаммов, оцененных как чувствительные тестируемым методом, но как резистентные МСР; N_{RefR} – число изолятов, оцененных как резистентные МСР	$\leq 3 \% VMD$

Таблица 4 – Значения показателей качества разработанных тест-полосок

№п/п	АМП	СА, n (%)	Критерий приемлемости	ЕА, n (%)	Критерий приемлемости	MD, n (%)	Критерий приемлемости	VMD, n (%)	Критерий приемлемости
1	Азитромицин	96,67	≥95%	96,67	≥90%	3,33	≤3%	0	≤3%
2	Азтреонам	100	≥95%	93,34	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
3	Амикацин	100	≥95%	96,67	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
4	Амоксициллин/клавулановая кислота	100	≥95%	93,34	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
5	Ванкомицин	100	≥95%	93,34	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
6	Гентамицин	100	≥95%	93,34	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
7	Имипенем	100	≥95%	96,67	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
8	Клиндамицин	96,67	≥95%	93,34	≥90%	3,33	≤3%	0	≤3%
9	Левифлоксацин	100	≥95%	93,34	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
10	Меропенем	96,67	≥95%	90	≥90%	3,33	≤3%	0	≤3%
11	Нитрофурантоин	96,67	≥95%	90	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
12	Бензилпенициллин	96,67	≥95%	90	≥90%	3,33	≤3%	0	≤3%
13	Оксациллин	100	≥95%	90	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
14	Тетрациклин	100	≥95%	93,34	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
15	Триметоприм / сульфаметоксазол	100	≥95%	96,67	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
16	Хлорамфеникол	96,67	≥95%	100	≥90%	3,33	≤3%	0	≤3%
17	Цефепим	100	≥95%	90	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
18	Цефотаксим	100	≥95%	93,34	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
19	Цефтазидим	100	≥95%	96,67	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
20	Цефтриаксон	100	≥95%	90	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
21	Ципрофлоксацин	100	≥95%	93,34	≥90%	0	≤3%	0	≤3%
22	Эритромицин	100	≥95%	96,67	≥90%	0	≤3%	0	≤3%

Примечание: МСР – метод серийных разведений; СА - Categorical agreement (категорийное согласование); ЕА - Essential agreement (существенное согласование); MD - Major discrepancy (большое расхождение); VMD - Very major discrepancy (очень большое расхождение)

Оценка показателей качества на клинических изолятах с использованием референтных тест-полосок

На данном этапе исследования оценивали соответствие значений МПК и клинических категорий чувствительности, полученных с использованием разработанных тест-полосок (МПК-Е-тест) и референтных М.І.С.Е.– полосок (Oxoid). Методом градиентной диффузии определяли чувствительность 101 клинического изолята микроорганизмов группы ESKAPE к соответствующим АМП. Были изучены 25 комбинаций микроорганизм/АМП: *Enterococcus* spp./ванкомицин и ципрофлоксацин; *S. aureus*/азитромицин, амикацин, ванкомицин, гентамицин, оксациллин и ципрофлоксацин; *K. pneumoniae*/амикацин, гентамицин, меропенем, цефотаксим, ципрофлоксацин; *Acinetobacter* spp./амикацин, гентамицин, меропенем и ципрофлоксацин; *Pseudomonas aeruginosa*/амикацин, меропенем и ципрофлоксацин; *Enterobacter* spp./амикацин, гентамицин, меропенем, цефотаксим и ципрофлоксацин. Согласно полученным значениям МПК, исследованные изоляты отнесли к соответствующей клинической категории чувствительности.

По результатам исследования, как показано в таблице 5, процент полного соответствия значений МПК, полученных с использованием разработанных тест-полосок и М.І.С.Е.– полосок (Oxoid), составил ≥ 90 % для ципрофлоксацина при тестировании изолятов *S. aureus* и *K. pneumoniae*; ≥ 80 % – для амикацина при тестировании *S. aureus*, *Acinetobacter* spp. и *Enterococcus* spp.; 80 % – для ванкомицина и гентамицина при тестировании *S. aureus*.

Таблица 5 – Доля (%) полного соответствия значений МПК, полученных при тестировании клинических изолятов микроорганизмов группы ESKAPE с использованием сравниваемых тест-полосок

АМП	<i>Enterococcus</i> spp. (n = 15)	<i>S. aureus</i> (n = 10)	<i>K. pneumoniae</i> (n = 28)	<i>Acinetobacter</i> spp. (n = 15)	<i>P. aeruginosa</i> (n=13)	<i>Enterobacter</i> spp. (n=20)
Азитромицин	но*	70,0	но*	но*	но*	но*
Амикацин	но*	80,0	85,7	80,0	69,2	85,0
Ванкомицин	46,6	80,0	но*	но*	но*	но*
Гентамицин	но*	80,0	85,7	66,7	но*	70,0
Меропенем	но*	но*	58,3	46,7	53,8	50,0
Оксациллин	но*	60,0	но*	но*	но*	но*
Цефотаксим	но*	но*	78,6	но*	но*	65,0
Ципрофлоксацин	53,3	90,0	92,8	60,0	76,9	70,0

Примечание: «*»– не определяли

Для остальных комбинаций микроорганизм/АМП процент полного соответствия значений МПК колебался от 46,6% (*Enterococcus* spp./ванкомицин) до 76,9% (*P. aeruginosa*/ципрофлоксацин). Выявленные расхождения значений МПК

находились в пределах одного двукратного разведения. Таким образом, показатель существенного согласования ЕА составил 100%. В результате исследования оценивали насколько выявленные расхождения в значениях МПК повлияли на клиническую категоризацию изолятов, которая используется клиницистами для принятия решения о выборе АМП и режиме дозирования в рамках этиотропного лечения заболеваний. Установлено, что, несмотря на расхождения значений МПК, категории чувствительности клинических изолятов (S, I или R), определенные с использованием разработанных тест-полосок и референтных М.І.С.Е. полосок (Oxoid), совпали для всех исследуемых комбинаций микроорганизм/АМП. Таким образом, показатель СА составил 100%, а показатели MD и VMD – 0%.

Оценка возможности использования разработанных тест полосок для определения сочетанного действия двух АМП методом кросс-теста

В работе использовали тест-полоски, изготовленные по разработанной технологии. На лицевую сторону тест-полоски было нанесено типографское изображение шкалы со значениями концентрации АМП или тестируемого вещества. На противоположную сторону двух вариантов полосок были нанесены азидотимидин и байкалин.

На другие четыре варианта полосок наносили АМП (гентамицин, цефотаксим, цiproфлоксацин и хлорамфеникол). Вещества азидотимидин (АЗТ) и байкалин исследовали как потенциальные синергисты АМП.

Определение чувствительности к комбинациям различных АМП с азидотимидином и байкалином проводили модифицированным методом градиентной диффузии (cross-test). МПК₅₀ и МПК₉₀ определяли как концентрации АМП, которые ингибируют 50% и 90% исследуемых штаммов микроорганизмов соответственно.

Работу производили в три этапа. На первом осуществляли контроль качества изготовленных тест-полосок с АМП с использованием референтных штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *E. faecalis* 29212. На втором методом градиентной диффузии при помощи изготовленных тест-полосок определяли значения МПК₅₀ и МПК₉₀ для следующих антибиотиков: гентамицина, цефотаксима, цiproфлоксацина и хлорамфеникола в отношении полирезистентных изолятов *K. pneumoniae*. В исследовании использовали клинические штаммы *K. pneumoniae* (n = 20) с множественной лекарственной устойчивостью, выделенные от пациентов различных стационаров Санкт-Петербурга. Был исследован потенциальный синергизм данных антимикробных препаратов с АЗТ и байкалином. Результаты определения значений МПК₅₀ и МПК₉₀ для антибиотиков и их комбинаций с тестируемыми веществами для изолятов *K. pneumoniae* представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Значения МПК для антибиотиков и их комбинаций с исследуемыми веществами для изолятов *K. pneumoniae*

АМП	Потенциальные синергисты АМП		МПК ₅₀	МПК ₉₀
	АЗТ	Байкалин		
Гентамицин	-*	-	128	128

Гентамицин	+	-	16	16
Гентамицин	-	+	64	128
Цефотаксим	-	-	64	128
Цефотаксим	+	-	64	128
Цефотаксим	-	+	32	64
Ципрофлоксацин	-	-	8	16
Ципрофлоксацин	+	-	4	8
Ципрофлоксацин	-	+	8	16
Хлорамфеникол	-	-	32	32
Хлорамфеникол	+	-	32	32
Хлорамфеникол	-	+	32	32

Примечание: *символом «-» или «+» отмечено, какое из веществ (АЗТ или байкалин) проверялось на наличие синергетического эффекта с АМП

На третьем этапе оценивали результат комбинированного действия двух соединений. Для этого для каждого штамма рассчитывали индекс фракционной подавляющей концентрации (ФПК) (fractional inhibitory concentrations ΣFIC) в соответствии с формулой (2):

$$\Sigma FPK = MPK_{AB} / MPK_A + MPK_{BA} / MPK_B \quad (2),$$

где MPK_A —МПК антибиотика А;

MPK_B —МПК вещества Б;

MPK_{AB} —МПК антибиотика А в присутствии вещества Б;

MPK_{BA} —МПК вещества Б в присутствии антибиотика А;

ΣFPK —индекс фракционной подавляющей концентрации).

Схема постановки и учета результатов кросс-теста представлена на рисунке 4.

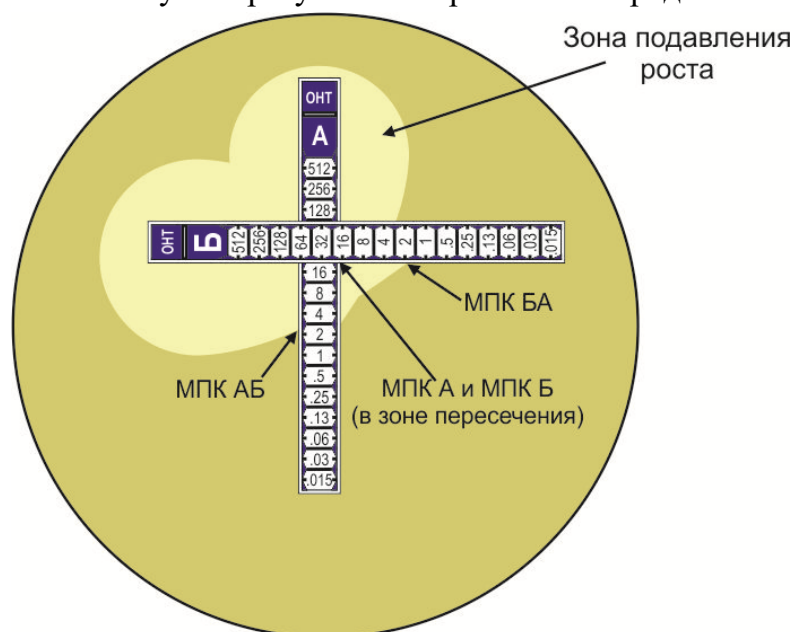


Рисунок 4 – Схема постановки и учета результатов кросс-теста

При $\Sigma FPK \leq 0,5$ эффект комбинации оценивали как синергидный, при $0,5 < \Sigma FPK \leq 1,0$ как аддитивный, при $1,0 < \Sigma FPK \leq 4,0$ как нейтральный и при $\Sigma FPK > 4,0$ – как антагонистический.

По результатам исследования было установлено, что АЗТ обладает антибактериальной активностью: МПК₅₀ - 1 мкг/мл и МПК₉₀ - 2 мкг/мл. Значения МПК₅₀ и МПК₉₀ для байкалина составляли >256 мкг/мл и >256 мкг/мл соответственно.

В ходе работы было исследовано 20 изолятов *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью. Как показано в таблице 6, значения МПК₅₀ и МПК₉₀ значительно уменьшились в комбинации АЗТ с гентамицином и АЗТ с цiproфлоксацином. Значения МПК не изменились при сочетании АЗТ с цефотаксимом или хлорамфениколом. Выявлен синергический антибактериальный эффект при сочетании азидотимидина с гентамицином (диапазон ΣФПК 0,33–0,50). Аддитивный эффект (Σ ФПК 0,65–0,84) выявлен при сочетании АЗТ с цiproфлоксацином.

Байкалин не влиял на чувствительность исследуемых штаммов к цiproфлоксацину и хлорамфениколу. Синергизм был выявлен в комбинации байкалин-цефотаксим (ΣФПК 0,52 – 0,75 - аддитивный эффект).

ВЫВОДЫ

1. Для штаммов *E. coli*, *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp., наиболее часто требуется количественное определение чувствительности к амоксициллин/клавулановой кислоте, цефалоспорином (цефотаксим, цефтазидим, цефепим), цiproфлоксацину и триметоприм/сульфаметоксазолу, аминогликозидам (гентамицин, тобрамицин, амикацин) и нитрофурантоину.

2. Для изготовления тест-полосок в качестве материала подложки могут применяться листовые гидрофильные пористые материалы. Преимуществом пористых материалов являются: возможность использования непрерывного нанесения растворов антимикробных препаратов на подложку, возможность пропитывания подложки органическими растворителями и аппликации на агар как тыльной, так и лицевой (с обозначением шкалы) поверхностью. К недостаткам Е-тестов из пористых материалов относится вероятность деформации с последующим отклеиванием от поверхности агара.

3. Е-тесты из непористых материалов отличаются более быстрой и надёжной, по сравнению с выполненными из пористых материалов, адгезией к поверхности агара. Основным недостатком непористых материалов – большая, по сравнению с пористыми, технологическая сложность нанесения раствора антимикробного препарата. Перспективной непористой подложкой является плёнка из полиэтилентерефталата толщиной 200 мкм.

4. Изготовление тест-полосок для определения МПК методом градиентной диффузии возможно с использованием пористой подложки отечественного производства – фильтровальной бумаги быстрой фильтрации плотностью 160 г/м² (ЛФБ-160).

5. Выведено соотношение, связывающее концентрацию антимикробного препарата, наносимого на пористую подложку, геометрические параметры

подложки и концентрацию антимикробного препарата в плотной питательной среде:

$$C_{1-\text{го разведения}} = \frac{C_0 \times e \times хуз}{V_{\text{нанесения}}}$$

где C_0 – концентрация АМП в мкг/мл, которую необходимо достичь в непосредственной близости от полоски (значение, нанесённое на шкале), e – математическая константа, $хуз$ – длина, ширина и высота участка нанесения одной концентрации на подложке (см), $V_{\text{нанесения}}$ – объём раствора в мкл, наносимый на участок полоски с одной концентрацией (определяется экспериментально в зависимости от впитывающих свойств подложки).

6. Функциональные характеристики тест-полосок, изготовленных по разработанной методике, изученные на эталонных штаммах и клинических базовых изолятах, находятся в допустимых диапазонах, регламентированных EUCAST 14.0, CLSI M100-ED34, и ГОСТ Р ISO 20776-2-2010.

7. Подтверждена возможность применения изготовленных тест-полосок для проведения исследований методом кросс-теста. Изучена активность комбинаций азидотимидина и байкалина в сочетании с антимикробными препаратами в отношении изолятов *Klebsiella pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью: синергетический антибактериальный эффект выявлен при сочетании азидотимидина с гентамицином (диапазон Σ ФПК 0,33–0,50), аддитивный эффект (Σ ФПК 0,65–0,84) — при сочетании азидотимидина с ципрофлоксацином и в комбинации байкалин-цефотаксим (Σ ФПК 0,52 – 0,75).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При исследовании чувствительности штаммов *E. coli* к антимикробным препаратам необходимо учитывать, что в отношении амоксициллина/клавулановой кислоты (до 50 % штаммов), цефалоспоринов и ципрофлоксацина (до 10 % штаммов), триметоприм/сульфаметоксазола и меропенема (до 1% штаммов) следует применять определение МПК. При исследовании штаммов *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp. наблюдается такое же соотношение, при этом чувствительность *Salmonella* spp. к ципрофлоксацину, согласно руководящим документам, следует определять исключительно количественными методами.

2. Разработанная методика, включающая в себя использование фильтровальной бумаги плотностью 160 г/м², предложенного алгоритма расчёта концентрации наносимых на подложку растворов антимикробных препаратов и 16-канальной помпы с роликовой подачей, рекомендуется к использованию при изготовлении Е-тестов для определения МПК антибиотиков, растворимых в полярных и неполярных растворителях.

3. Для совершенствования методики изготовления тест-полосок рекомендуется применение непористой подложки из полиэтилентерефталатной плёнки. Использование данной подложки улучшает адгезию тест-полоски к поверхности агара и полностью исключает риски частичного отклеивания.

4. Тест-полоски, изготовленные по разработанной методике, рекомендуются к применению как для определения МПК клинических штаммов бактерий методом градиентной диффузии, так и для оценки комбинированного воздействия антимикробных препаратов методом кросс-теста с целью выявления оптимальных комбинаций при использовании сочетанной антибиотикотерапии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Представляется перспективным расширение перечня антимикробных препаратов, сорбируемых на тест-полоски, за счёт включения новых, в том числе комбинированных препаратов — тикарциллин/клавулановая кислота, пиперациллин/тазобактам, цефтазидим/авибактам. Метод градиентной диффузии позволяет быстро оценить антимикробный эффект препаратов, а разработанная методика позволяет изготавливать тест-полоски, импрегнированные веществами, растворимыми как в полярных, так и в неполярных растворителях, что позволяет применять её в изучении новых антимикробных препаратов.

Помимо стандартных тест-полосок, содержащих один антимикробный препарат, или комбинацию антимикробный препарат/ингибитор бактериального фермента, сконструированная лабораторная установка позволяет изготовить тест-полоски для фенотипической детекции клинически значимых механизмов резистентности, например, продукции β -лактамаз расширенного спектра, или цефалоспоринов молекулярного класса C (AmpC). Актуальна разработка тест-полосок для фенотипической детекции карбапенемаз генетической группы KPC, а также для определения чувствительности к гликопептидным антибиотикам у штаммов *S. aureus* типа GISA или hGISA (гетеро-GISA). Разработанные Е-тесты позволяют изучать потенциально перспективные комбинации антибиотиков, а также комбинации антибиотиков и веществ, не обладающих выраженным самостоятельным антибактериальным эффектом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Лихачев, И.В.** Разработка набора реагентов для фенотипической детекции бета-лактамаз расширенного спектра действия / И.В. Лихачев // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, 5-7 декабря 2017 г., г. Иркутск. – Иркутск, 2017. – С. 84-85.
2. **Егорова, С.А.** Устойчивость к антимикробным препаратам и клинически значимые механизмы резистентности штаммов *Salmonella*, выделенных в 2014-2018 гг., в Санкт-Петербурге, Россия / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, Л.В. Сужаева, А.В. Забровская, Е.В. Войтенкова, З.Н. Матвеева, Ю.В. Останкова, И.В. Лихачев, Н.В. Сатосова, Р.В. Кицбабашвили, Е.В. Смирнова, Л.И. Семченкова, Т.Е. Быстрая, С.Е. Сокольник, Н.П. Уткина, Л.Ю. Сихандо // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 10, № 64. – С. 620-626.
3. Самойлова, А.А. Особенности применения индикаторов pH и редокс-потенциала для определения антибиотикочувствительности методом серийных микроразведений / А.А. Самойлова, **И.В. Лихачев**, О.В. Заручейнова //

Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия: Тезисы XXI Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии, 22-24 мая 2019 г., г. Москва. – Москва, 2019. – С. 57-58.

4. **Лихачев, И.В.** Сравнительный анализ разрабатываемых наборов реагентов для количественной оценки антибиотикочувствительности бактерий с зарубежными аналогами / **И.В. Лихачев, А.А. Самойлова, Л.А. Кафтырева** // Материалы V Национального конгресса бактериологов, 16-17 сентября 2019 г., г. Москва. – Москва, 2019. – С. 52–53.

5. **Лихачев, И.В.** Апробация отечественных тест-полосок, предназначенных для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам методом градиентной диффузии (Е-ТЕСТ) / **И. В. Лихачев, Л.А. Краева, А.А. Самойлова, Е.В. Рогачева, Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, Н.В. Михайлов** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 9. – С. 557-561.

6. **Самойлова, А.А.** Апробация отечественного набора «МПК-МИКРО», предназначенного для определения антибиотикочувствительности микроорганизмов методом серийных микроразведений / **А.А. Самойлова, Л.А. Краева, И.В. Лихачев, Е.В. Рогачева, В.Н. Вербов, Н.В. Михайлов, Е.В. Зуева** // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 231-236.

7. **Самойлова, А.А.** Разработка отечественных наборов для определения чувствительности клинически значимых микроорганизмов к антимикробным препаратам / **А.А. Самойлова, И.В. Лихачев, Е.В. Рогачева** // Материалы всероссийской научно-практической интернет-конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора с международным участием, 5–9 октября 2020 г., г. Пермь. – Пермь, 2020. – С. 180-185.

8. **Лихачев, И.В.** Разработка Е-тестов для выявления потенцирующего эффекта антимикробных соединений в отношении полирезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* / **И.В. Лихачев, Л.А. Кафтырева, А.А. Самойлова, Л.А. Краева, Н.В. Михайлов** // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2024. – Т. 26, № 1. – С. 98-103.

Патент на изобретение

9. Патент на изобретение 2761096 Российская Федерация, С12Q 1/04 (2021.08); С12Q 1/18 (2021.08). MALDI-TOF масс-спектрометрический способ определения устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам / **Зуева Е.В., Лихачев И.В., Краева Л.А., Михайлов Н.А., Тотолян Арег А.** заявитель и патентообладатель: ФБУН НИИЭМ им. Пастера (RU). – № 2020103551; заявл. 27.01.2020 г.; опубл. 27.07.2021, Бюл. № 34. – 16 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЗТ — азидотимидин

АМП — антимикробный препарат

ДДМ — диско-диффузионный метод
ЕВРАЗЭС — Евразийское экономическое сообщество
ЗТН — зона технической неопределенности
ИСМП — инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
МПК — минимальная подавляющая концентрация
МСП — метод серийных разведений
ФПК (FIC) — фракционная подавляющая концентрация (fractional inhibitory concentration)
ATCC — American Type Culture Collection – Американская коллекция типовых культур
CA — categorical agreement; категорийное согласование
CLSI — Clinical and laboratory standards institute – Институт клинических и лабораторных стандартов
EA — Essential agreement; существенное согласование
EUCAST — European Committee on antimicrobial susceptibility testing – Европейский комитет по определению чувствительности к антибиотикам
GISA — штаммы *S. aureus*, обладающие промежуточным типом чувствительности к гликопептидным АМП
MD — major discrepancy; большое расхождение
PA — polyamide; полиамид
PE — polyethylene; полиэтилен
PET — polyethylene terephthalate; полиэтилентерефталат
PP — polypropylene; полипропилен
PS — polystyrene; полистирол
PVC — polyvinyl chloride; поливинилхлорид
VMD — very major discrepancy; очень большое расхождение