

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. Пастера»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

На правах рукописи

Лихачев Иван Владимирович

**Разработка тест-системы для определения минимальной подавляющей
концентрации антибиотиков методом градиентной диффузии**

1.5.11 - микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
Кафтырева Лидия Алексеевна

Санкт-Петербург – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность темы исследования	6
Степень разработанности темы исследования	7
Цель исследования	7
Задачи исследования	7
Научная новизна	8
Теоретическая и практическая значимость	9
Методология и методы исследования	11
Материал исследования	11
Диско-диффузионный метод	15
Метод серийных разведений	15
Метод градиентной диффузии (Е-тест)	19
Метод кросс-теста	20
Интерпретация результатов определения чувствительности	21
Видовая реидентификация микроорганизмов	23
Метод твердотельного моделирования	23
Статистические методы исследования	23
Объём проведённых исследований	24
Личное участие автора в получении результатов	27
Степень достоверности и апробация результатов	28
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	30
1.1 Актуальность проблемы резистентности к антимикробным препаратам	30
1.2 Причины возникновения резистентности к АМП	33
1.3 Виды резистентности к АМП	34
1.4 Механизмы антибиотикорезистентности бактерий	35
1.5 Определение чувствительности к АМП в клинической практике.....	35
1.6 Особенности микроорганизмов, требующих количественного определения чувствительности к АМП.....	37

1.6.1 Микробиологические критерии количественного определения чувствительности к АМП.....	37
1.6.2 Определение резистентности к β -лактамным антибиотикам.....	38
1.6.3 Выявление антибиотикорезистентности низкого уровня.....	39
1.6.4 Возбудители с повышенным значением МПК.....	40
1.6.5 Терапия инфекций, вызванных карбапенемазопродуцирующими энтеробактериями	40
1.7 Особенности применяемого АМП, требующие количественного определения чувствительности	41
1.7.1 Сохранение эффективности антибиотиков широкого спектра действия....	41
1.7.2 Ситуации, связанные с риском возникновения токсических осложнений. .	41
1.8 Особенности фармакокинетики пациентов, требующие количественного определения чувствительности к АМП	42
1.8.1 Ситуации, связанные с риском недостаточного воздействия АМП.....	42
1.8.2 Труднодоступные очаги инфекции	43
1.9 Количественные методы определения чувствительности к антимикробным препаратам	44
1.9.1 Метод серийных разведений.....	44
1.9.2 Метод градиентной диффузии (Е-тест)	47
1.10 Заключение по главе 1	49
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	51
ГЛАВА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ ДИСКО-ДИФФУЗИОННЫМ МЕТОДОМ	51
2.1 Оценка чувствительности изолятов согласно стандарту EUCAST 14.0	52
2.1.1 Характеристика чувствительности изолятов <i>E. coli</i>	54
2.1.2 Характеристика чувствительности изолятов <i>Salmonella</i> spp.....	55
2.1.3 Характеристика чувствительности изолятов <i>Klebsiella</i> spp.	56
2.1.4 Распространённость изолятов, отнесенных к категории «I» и ЗТН	57
2.2 Оценка чувствительности изолятов согласно стандарту CLSI M100-ED34..	59
2.2.1 Характеристика чувствительности изолятов <i>E. coli</i>	60
2.2.2 Характеристика чувствительности изолятов <i>Salmonella</i> spp.....	60

2.2.3 Характеристика чувствительности изолятов <i>Klebsiella</i> spp.	61
2.2.4 Распространённость изолятов, отнесенных к категории чувствительных при увеличенной экспозиции для разных АМП	62
2.3 Заключение по главе 2	64
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-ПОЛОСОК ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ МПК АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПЛОТНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ	66
3.1 Устройство и принцип действия тест-полосок Е-теста	66
3.2 Краткое техническое задание на разработку.....	67
3.3 Выбор материала подложки изделия	67
3.4 Разработка методики расчёта концентрации АМП и способа нанесения АМП на пористую подложку	77
3.5 Приготовление раствора АМП и нанесение на подложку.....	80
3.6 Разработка устройства для нанесения АМП на тест-полоски.....	80
3.7 Изготовление тест-полосок.....	84
3.8 Заключение по главе 3	85
ГЛАВА 4. ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК РАЗРАБОТАННЫХ ТЕСТ-ПОЛОСОК	87
4.1 Планирование исследования.....	87
4.2 Оценка воспроизводимости результатов на эталонных штаммах	91
4.3 Оценка правильности на эталонных штаммах.....	95
4.4 Оценка показателей качества на клинических изолятах	98
4.5 Оценка показателей качества разработанных тест-полосок на клинических изолятах с использованием референтных тест-полосок.....	102
4.6 Оценка возможности использования разработанных тест-полосок для проведения исследований методом кросс-теста.....	102
4.7 Заключение по главе 4	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ	113
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	115
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	117

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	120
ПРИЛОЖЕНИЕ	143

ВВЕДЕНИЕ

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) [65]. 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 [27, 28, 184]. При оценке чувствительности возбудителей инфекций с топографически труднодоступной локализацией очага, при сепсисе, хронических инфекциях и у пациентов с иммунодефицитом, а также инфекциях, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), приобретают всё большую актуальность методы количественного определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам [123].

С точки зрения последующего анализа, определение значения минимальной подавляющей концентрации является оптимальным, так как позволяет оценить имеющиеся лабораторные данные при использовании различных методов анализа, а также адаптировать к новым стандартам имеющиеся ретроспективные данные при изменении критериев интерпретации [11]. Значение минимальной подавляющей концентрации необходимо при проведении микробиологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора [8, 56].

Метод градиентной диффузии (Е-тест) — один из наименее трудоёмких способов определения значения минимальной подавляющей концентрации [103]. Кроме исследования минимальной подавляющей концентрации антимикробных препаратов, модифицированный метод градиентной диффузии (кросс-тест) используется ещё в одном из востребованных направлений — оценке комбинированного воздействия антимикробных препаратов [88, 145, 151, 177].

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 эпилотметрический тест (E-test), впервые был предложен Bolmstrom A. et al. в 1988 г [175]. Среди отечественных разработок, наиболее близким к коммерческому исполнению E-test, является изобретение, описанное Кальным С.М. и соавторами в патенте РФ № 2147610 [25]. В данном патенте приводится методика изготовления полосок для эпилотметрического теста, предназначенная для выполнения лабораторных исследований. 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 $160 \pm 10 \text{ г/м}^2$, толщиной $0,4 \pm 0,1 \text{ мм}$).

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

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 M.I.C.E.-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

Контроль качества определения антибиотикочувствительности проводили, используя эталонные штаммы: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. pneumoniae* ATCC 49619. Эталонные штаммы хранили в лиофилизированном виде в герметично закупоренных с сохранением вакуума флаконах, используя которые готовили рабочие культуры эталонных штаммов.

Для изучения распространенности микробиологических критериев количественного определения чувствительности к антимикробным препаратам исследовали 2212 штаммов порядка *Enterobacterales*: *E. coli* (n = 1223), *Salmonella* spp. (n = 881), *Klebsiella* spp. (n = 108). Штаммы были получены из ГБУЗ и ФБУЗ Центров гигиены и эпидемиологии Санкт-Петербурга и Ленинградской области, Владивостока, Вологды, Мурманска, Омска и Челябинска. Также были использованы штаммы, полученные в рамках научно-исследовательских работ, проведённых с бактериологическими лабораториями филиалов № 4 и 6 ФБУЗ ЦГиЭ по городу Санкт-Петербург.

Для оценки функциональных характеристик разработанной тест-системы использовали штаммы возбудителей 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 медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и из хирургических отделений, отделений реанимации и интенсивной терапии следующих медицинских учреждений города Санкт-Петербурга: Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Городская больница № 14, Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Питательные среды

Культивирование микроорганизмов проводили в течение 18-24 ч при температуре 35 °С. Резистентность к антимикробным препаратам определяли методом серийных микроразведений в жидкой питательной среде с использованием бульона МюллераХинтон (МХБ) (HiMedia, Индия), методом градиентной диффузии — на плотной питательной среде агар Мюллера-Хинтон (МХА) (HiMedia, Индия). Бульон и агар Мюллера-Хинтон, в том числе для прихотливых микроорганизмов (МХ-П) готовили согласно инструкциям производителя.

Для лиофилизации штаммов использовали среду следующего состава: 10 г сахаразы, 10 г желатина и 1 л фосфатного буферного раствора (ФБР).

Антимикробные препараты и компоненты рабочих растворов

Наименования субстанций антимикробных препаратов и иных веществ, используемых в работе для приготовления рабочих растворов, приведены в таблицах 1-2.

Таблица 1 — Компоненты рабочих растворов

Наименование	Нормативно-техническая документация
натрия хлорид	ГОСТ 4233-77
натрия гидрофосфат	ГОСТ 11773-76
калия дигидрофосфат	ГОСТ 4198-75
натрия бикарбонат	ГОСТ 4201-79
соляная кислота, 2 моль/л	CAS № 7647-01-0
натрия гидроокись	ГОСТ 4328-77
диметилсульфоксид	ТУ 2635-114-44493179-08
спирт этиловый 95%-й	ГОСТ Р 51723-2001
вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72

Материалы подложки

В качестве подложки были использованы следующие материалы: бумага фильтровальная плотностью 160 г/м² (марка ЛФБ-160), Отрадненская БКФ; картон фильтровальный плотностью 270 г/м² (марка КФБ-270), Отрадненская БКФ; пленка полипропиленовая РР ППП-50; пленка поливинилхлоридная PVC Orajet 3640; пленка полиэтилентерефталатная (PET) Xerox Backlit Film Front Print, 200 мкм, (023R02306); пленка полиэтиленовая (PE) марки Тс 60 мкм 3x100 м ГОСТ 10354-82 высший сорт; пленка полиамидная (РА) НПА-ТС, (ТУ 2255-008-00203430-2008), 75 мкм; нитроцеллюлозная мембрана ФМНЦ 0,45 мкм, АО «Владисарт»; нейлоновая мембрана ФМПА 0,20 мкм, АО «Владисарт».

Таблица 2 — Субстанции антимикробных препаратов и растворители

Наименование субстанции	Регистрац. номер CAS	Растворитель	Разбавитель
Азитромицин	83905-01-5	95 %-й этанол	вода дистиллированная
Азтреонам	78110-38-0	натрия бикарбонат насыщенный раствор	вода дистиллированная
Амикацин	39831-55-5	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Амоксициллин / клавулановая кислота	26787-78-0	фосфатный буферный раствор 0,1 моль/л pH 6,0	фосфатный буферный раствор 0,1 моль/л pH 6,0
Бензилпенициллин	69-57-8	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Ванкомицин	1404-93-9	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Гентамицин	1405-41-0	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Имипенем	74431-23-5	фосфатный буферный раствор 0,1 моль/л pH 7,2	фосфатный буферный раствор 0,1 моль/л pH 7,2
Клиндамицин	21462-39-5	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Левифлоксацин	100986-85-4	0,1 моль/л NaOH	вода
Меропенем	119478-56-7	фосфатный буферный раствор 0,1 моль/л pH 7,2	фосфатный буферный раствор 0,1 моль/л pH 7,2
Нитрофурантоин	67-20-9	диметилсульфоксид	фосфатный буферный раствор 0,1 моль/л pH 8,0
Оксациллин	1173-88-2	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Тетрациклин	64-75-5	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Триметоприм-сульфаметоксазол	8064-90-2	0,1 моль/л NaOH	вода дистиллированная

Продолжение таблицы 2

Хлорамфеникол (левомицетин)	56-75-7	95 % этанол	вода дистиллированная
Цефепим	107648-80-6	фосфатный буферный раствор 0,1 моль/л рН 6,0	фосфатный буферный раствор 0,1 моль/л рН 6,0
Цефотаксим	64485-93-4	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Цефтазидим	120618-65-7	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Цефтриаксон	104376-79-6	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Ципрофлоксацин	86393-32-0	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Эритромицин	114-07-8	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Азидотимидин	30516-87-1	вода дистиллированная	вода дистиллированная
Байкалин	21967-41-9	диметилсульфоксид	вода дистиллированная

Диско-диффузионный метод

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

Метод серийных разведений

Для приготовления стрипов с исследуемыми антимикробными препаратами к последним добавляли соответствующие растворители для получения основного раствора, который доводили до требуемого объема разбавителем. В работе

использовали растворители и разбавители, рекомендуемые стандартом CLSI M100 [74] и представленные в таблице 2.

Внесение антимикробных препаратов проводили дозированием 20 мкл рабочего раствора в полистироловые плоскодонные стрипы с использованием микропланшетного диспенсера Thermo Scientific Multidrop Combi («Thermo Fisher Scientific», США). Последний ряд лунок (лунки H) в планшете не заполняли, поскольку эти лунки выполняли функцию отрицательного и положительного контролей. Стрипы с сорбированными в них антимикробными препаратами хранили в морозильной камере «Binder» (Федеративная Республика Германия) при температуре -70°C . Перед использованием, стрипы выдерживали в боксе абактериальной воздушной среды в течение 1 ч при температуре $18-25^{\circ}\text{C}$.

Для проведения исследования бульон Мюллера-Хинтона, приготовленный согласно инструкции производителя, разливали в пенициллиновые флаконы по 10 мл и стерилизовали в автоклаве в течение 20 мин при 1,1 атм.

Флаконы с бульоном Мюллера-Хинтон хранили при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$. Перед проведением исследования среду выдерживали при комнатной температуре ($18-25^{\circ}\text{C}$) в течение 1 ч., тщательно перемешивали на Vortex («Elmi», Латвия). Затем переносили 100 мкл питательной среды в лунку с отрицательным контролем как показано на рисунке 1.

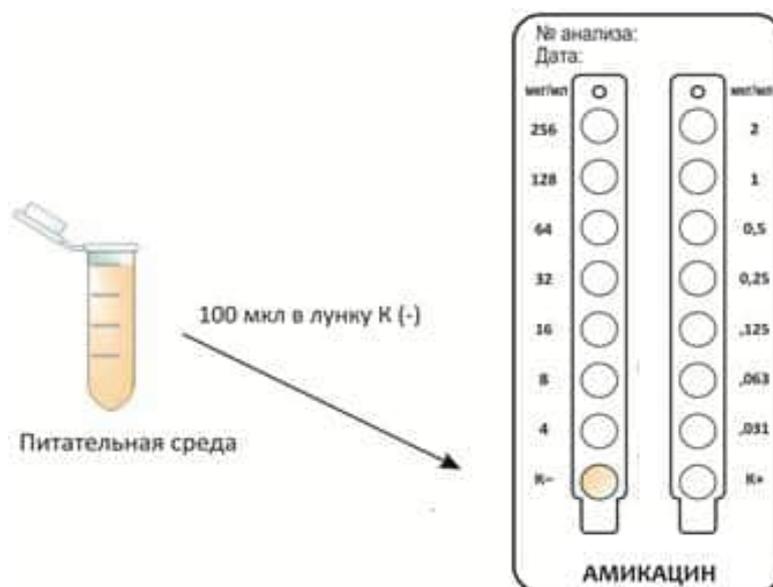


Рисунок 1 — Внесение отрицательного контроля в лунку стрипа

Стандартизованный инокулюм готовили, используя суточную культуру исследуемого микроорганизма на плотной питательной среде. Для приготовления стандартизованного инокулюма в пробирку для денситометра («Erba lachema», Чешская республика) вносили 2 мл стерильного физиологического раствора, после чего ресуспендировали в нем культуру бактерий, отобранную с поверхности питательной среды Мюллера-Хинтон агар (в модификации для прихотливых микроорганизмов для *S. pneumoniae* ATCC 49619). Затем готовили суспензию микроорганизмов в физиологическом растворе плотностью 0,5 McF. Стандартизованный инокулюм использовали в течение 15 мин после приготовления.

Для приготовления посевного инокулюма 20 мкл стандартизованного инокулюма (0,5 McF) добавляли в пробирку для микропроб, содержащую 1,9 мл питательной среды Мюллера-Хинтон бульон, как показано на рисунке 2.



Рисунок 2 — Приготовление стандартизованного и посевного инокулюма

Приготовленный посевной инокулюм тщательно перемешивали на Vortex и вносили по 100 мкл во все лунки стрипа, кроме лунки с отрицательным контролем как показано на рисунке 3. Помещали стрип в пакет с молнией и инкубировали в термостате при температуре 35 ± 1 °C в течение (18 ± 2) ч. Инкубацию *S. pneumoniae* ATCC 49619 проводили в атмосфере 4-6 % CO₂.

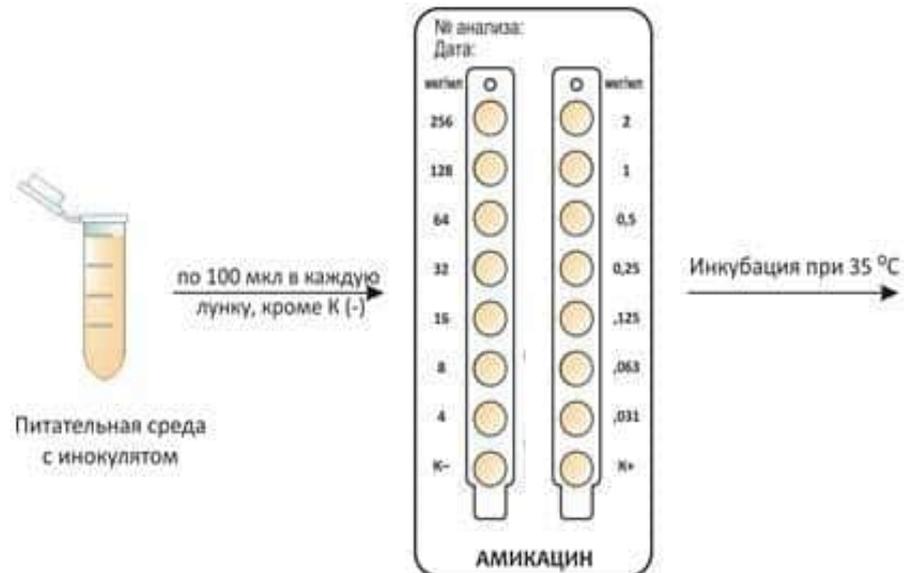


Рисунок 3 — Инокуляция лунок стрипа

Наличие роста бактериальной культуры определяли визуально при сравнении мутности среды в контрольных лунках и лунках, содержащих антимикробный препарат. Значение минимальной подавляющей концентрации антимикробного препарата соответствовало наименьшей концентрации, в которой не определялся видимый рост исследуемой культуры. Алгоритм учёта результатов представлен на рисунке 4.

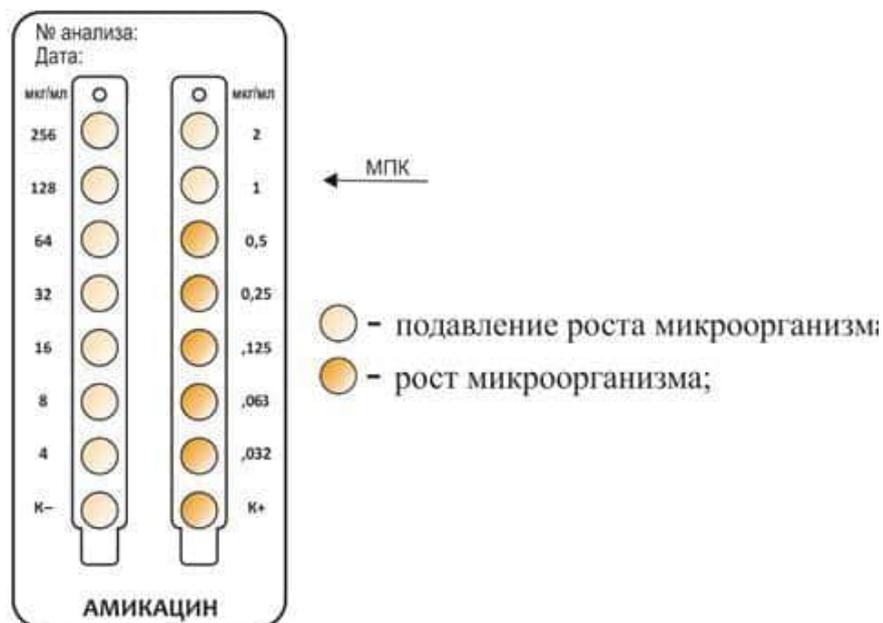


Рисунок 4 — Учёт результатов

Примечание: К (-) – отрицательный контроль (среда без культуры микроорганизма), К (+) – положительный контроль (среда с культурой микроорганизма), 256, 128...0,032 – концентрации антимикробного препарата, мкг/мл

Метод градиентной диффузии (Е-тест)

Обозначение наименования антимикробного препарата и диапазона концентраций отпечатывали на подложке типографским способом, получая шаблоны для сорбции антимикробных препаратов. Нанесение антимикробного препарата на шаблоны осуществляли при помощи 16-канальной шприцевой помпы с роликовой подачей. Подробное описание данного устройства и методика нанесения антимикробных препаратов приведены в главе «Разработка тест-полосок для количественной оценки МПК антимикробных препаратов на плотной питательной среде». Высушивание импрегнированной антимикробным препаратом подложки производили в сушильном шкафу, снабженном нагревательными элементами и приточно-вытяжной вентиляцией, в течение 40 мин при 40 °С.

Приготовление чашек с агаром осуществляли согласно Российским рекомендациям по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (КМАХ, Версия 2024-02) [34]. Стандартизацию суспензии исследуемого микроорганизма проводили согласно Методическим указаниям МУК 4.2.1890-04 [22]. Стандартизованный инокулюм использовали в течение 15 мин после приготовления.

Инокуляцию чашек с агаром производили в соответствии с рекомендациями КМАХ (Версия 2024-02) [34]. 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.

Аппликацию тест-полосок на поверхность агара проводили не позднее 15 минут после инокуляции. Пример расположения двух тест-полосок в чашке Петри диаметром 90 мм представлен на рисунке 5. Инкубацию производили при температуре 35 ± 1 °С в течение 18 ± 2 ч., для *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 — в 4-6 % CO₂.

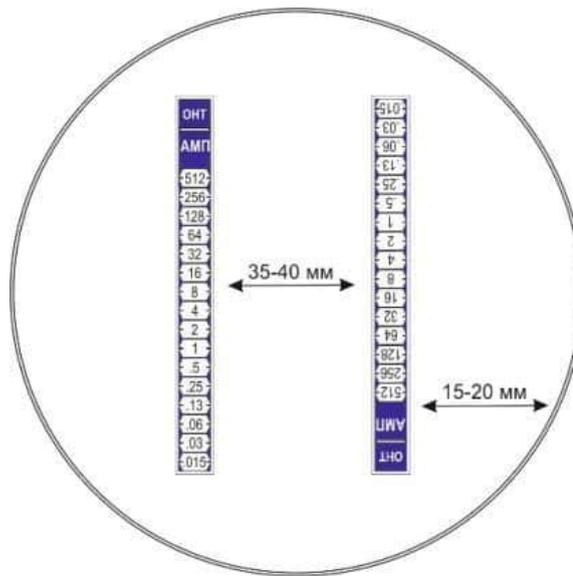


Рисунок 5 — Расположение тест-полосок в чашке Петри

Учёт результатов проводили следующим образом: чашку Петри с открытой крышкой помещали на темную матовую поверхность дном вниз таким образом, чтобы свет падал на нее под углом 45° . Результат исследования - значение минимальной подавляющей концентрации, находящееся на шкале тест-полоски в месте пересечения эллипсовидной зоны подавления роста с тест-полоской как показано на рисунке 6.

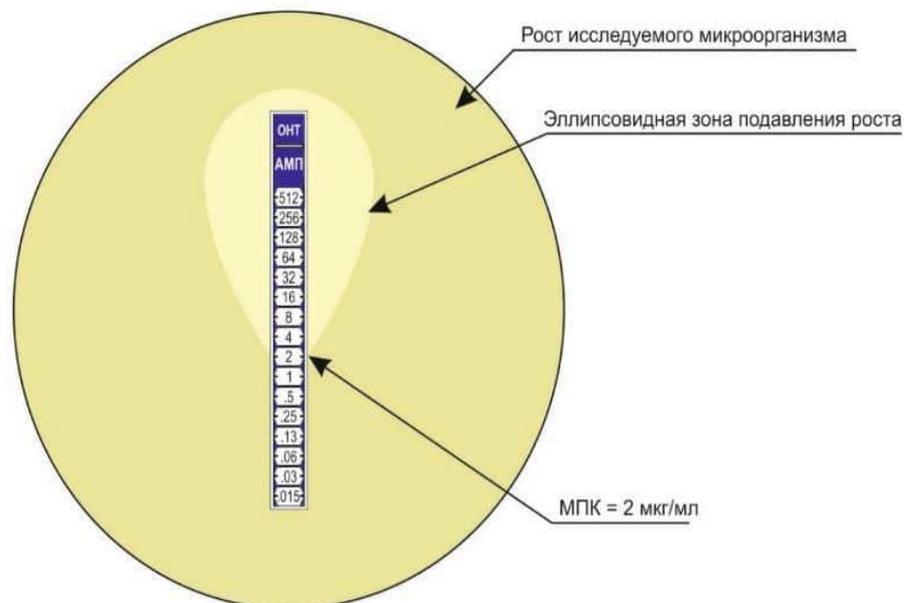


Рисунок 6 — Учёт результатов

Метод кросс-теста

Значения минимальных подавляющих концентраций исследуемых

антимикробных препаратов определяли методом градиентной диффузии. Этапы приготовления стандартизованного инокулюма и посева исследуемой культуры бактерий на плотные питательные среды осуществляли как описано выше.

Аппликацию тест-полосок на поверхность агара осуществляли таким образом, чтобы их пересечение соответствовало значениям минимальных подавляющих концентраций каждого из антимикробных препаратов (установленным предварительно) в отношении исследуемого изолята. Инкубация чашек производилась так же, как при методе градиентной диффузии.

Интерпретация результатов определения чувствительности

Интерпретацию полученных результатов проводили согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версия 2024.

Диапазоны допустимых значений минимальных подавляющих концентраций антимикробных препаратов приведены в таблице 3.

Таблица 3 — Диапазоны значений минимальных подавляющих концентраций антимикробных препаратов для эталонных штаммов микроорганизмов [34, 74, 91]

№ п/п	Наименование антимикробного препарата	<i>S. aureus</i> АТСС 29213	<i>E. faecalis</i> АТСС 29212	<i>E. coli</i> АТСС 25922	<i>P. aeruginosa</i> АТСС 27853	<i>S. pneumoniae</i> АТСС 49619
1	Азитромицин	0,5-2	–	–	–	0,06-0,25
2	Азтреонам	–	–	0,06-0,25	2-8	–
3	Амикацин	1-4	64-256	0,5-4	1-4	–
4	Амоксициллин / клавулановая кислота	0,25-1	–	4-16	–	0,03-0,125
5	Бензилпенициллин	0,25-2	1-4	–	–	0,25-1
6	Ванкомицин	0,5-2	1-4	–	–	0,125-0,5
7	Гентамицин	0,125-1	4-16	0,25-1	0,5-2	–
8	Имипенем	0,016-0,06	0,5-2	0,06-0,25	1-4	0,03-0,125
9	Клиндамицин	0,06-0,25	4-16	–	–	0,03-0,125
10	Левифлоксацин	0,06-0,5	0,25-2,	0,008-0,06	0,5-4	0,5-2

Продолжение таблицы 3

11	Меропенем	0,03-0,125	2,0-8,0	0,008-0,06	0,25-1	0,03-0,25
12	Нитрофурантоин	8-32	4-16	4-16	–	–
13	Оксациллин	0,125-0,5	–	–	–	–
14	Тетрациклин	0,125-1	8,0-32	0,5-2	8,0-32	0,06-0,5
15	Триметоприм / сульфаметоксазол	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	8,0-32	0,125-1
16	Хлорамфеникол	–	–	2-8	–	–
17	Цефепим	1-4	–	0,016-0,125	1-8	0,03-0,25
18	Цефотаксим	1-4	–	0,03-0,125	8-32	0,03-0,125
19	Цефтазидим	4-16	–	0,06-0,5	1-4	–
20	Цефтриаксон	1-8	–	0,03-0,125	8-64	0,03-0,125
21	Ципрофлоксацин	0,125-0,5	0,25-2	0,004-0,016	0,25-1	–
22	Эритромицин	0,25-1	1-4	–	–	0,03-0,125

Примечание: «–» – антимикробный препарат не контролируют на данном эталонном штамме

Оценку результатов, полученных при использовании изготовленных тест-полосок, проводили, используя формулы и критерии приемлемости, представленные в таблице 4.

Таблица 4 — Расчет коэффициентов эффективности и допустимые критерии приемлемости [4]

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	$\leq 3 \% VMD$

Видовая реидентификация микроорганизмов

Видовую реидентификацию микроорганизмов проводили с использованием спектрометра Microflex LRF и программного обеспечения «Biotyper RTC» (Bruker Daltonik, Германия) методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). В качестве критерия приемлемости видовой идентификации принимали значения $score \geq 2,0$.

Метод твердотельного моделирования

Проектирование лабораторной установки для изготовления тест-полосок E-теста осуществлялось методом твердотельного моделирования в программном комплексе системы автоматизированного проектирования SolidWorks.

Статистические методы исследования

Результаты исследований обрабатывали при помощи электронных таблиц MS-Excel. Доверительный интервал для долей рассчитывали методом откорректированной нормальной аппроксимации (откорректированный метод Вальда) при уровне статистической значимости $p < 0,05$. Статистические критерии применяли согласно нормативно-технической документации, регламентирующей проверку наборов реагентов, предназначенных для определения минимальной подавляющей концентрации антимикробных препаратов [4].

Объём проведённых исследований

Сводная информация о материалах и объеме проведённых исследований представлена в таблицах 5-6.

Таблица 5 — Материалы и объём проведённых экспериментальных исследований относительно изготовленных тест-полосок

Наименование АМП	Эталонные штаммы					Клинические изоляты							
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter spp</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Enterobacter spp</i>	Итого по АМП
Азитромицин	–	3	–	–	3	–	–	40	–	–	–	–	46
Азтреонам	3	–	–	3	–	7	–	–	7	–	8	8	36
Амикацин	3	3	3	3	–	5	–	15	33	20	18	25	128
Амоксициллин / клавулановая кислота	3	3	–	–	3	15	15	–	–	–	–	–	39
Бензилпенициллин	–	3	3	–	3	–	15	15	–	–	–	–	39
Ванкомицин	–	3	3	–	3	–	31	24	–	–	–	–	64
Гентамицин	3	3	3	3	–	6	–	16	94	21	–	26	175
Имипинем	3	3	3	3	3	5	5	–	5	5	5	5	45
Клиндамицин	–	3	3	–	3	–	–	30	–	–	–	–	39
Левофлоксацин	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	45
Меропенем	3	3	3	3	3	6	–	–	34	21	19	26	121
Нитрофурантоин	3	3	3	–	–	15	15	–	–	–	–	–	39
Оксациллин	–	3	–	–	–	–	–	40	–	–	–	–	43
Тетрациклин	3	3	3	3	3	–	–	24	–	6	–	–	45
Триметоприм/сульфаметоксазол	3	3	3	3	3	5	–	6	6	6	–	7	45
Хлорамфеникол	3	–	–	–	–	10	10	–	70	–	–	–	93
Цефепим	3	3	–	3	3	8	–	–	7	3	8	4	42

Продолжение таблицы 5

	Эталонные штаммы					Клинические изоляты							
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter spp</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Enterobacter spp</i>	Итого по АМП
Цефотаксим	3	3	–	3	3	11	–	–	98	3	–	26	150
Цефтазидим	3	3	–	3	–	7	–	–	7	3	8	5	39
Цефтриаксон	3	3	–	3	3	11	–	–	10	3	–	6	42
Ципрофлоксацин	3	3	3	3	–	4	19	14	92	19	18	25	203
Эритромицин	–	3	3	–	3	–	16	14	–	–	–	–	39
Всего штаммов:	48	60	39	39	42	119	130	242	467	114	89	168	1557

Примечание: «–» – тестирование не проводилось

Таблица 6 — Материалы и объём проведённых экспериментальных исследований относительно использованных штаммов

Штамм	Категория штамма	Количество исследований				
		ДДМ (ретроспективное исследование)	Разработанные тест-полоски	Референтный метод (МСП)	Референтные коммерческие тест-полоски	Метод кросс-теста
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Эталонный	-	48	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213		-	60	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		-	39	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		-	39	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		-	42	-	-	-
<i>E. coli</i>	Базовый клинический	1223	119	119	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.		-	130	90	30	-
<i>S. aureus</i>		-	242	192	60	-
<i>Salmonella</i> spp.		881	-	-	-	-
<i>Proteus</i> spp.		9	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> spp.		108	467	87	140	240
<i>Acinetobacter</i> spp.		-	114	54	60	-
<i>P. aeruginosa</i>		-	89	50	39	-
<i>Enterobacter</i> spp.		-	168	68	100	-
Итого:			1557	660	429	240
					Всего исследований:	2886

Примечание: «-» – тестирование не проводилось

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 проведенного 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

Достоверность и обоснованность результатов работы обеспечена достаточным объемом исследований, применением референтных методов исследования и статистической обработкой полученных данных согласно требованиям руководящих документов. Дisko-диффузионным методом изучена чувствительность 2212 клинических изолятов порядка *Enterobacteriales* (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.).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Актуальность проблемы резистентности к антимикробным препаратам

Распространение резистентности к антимикробным препаратам является проблемой современного здравоохранения, представляющей угрозу для всех стран, а определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам – одной из самых важных задач микробиологической диагностики [46, 52, 97, 134]. Резистентность к АМП — это естественное явление, характерное для всех микроорганизмов (бактерии, грибы, простейшие, вирусы), проявляющееся в способности микроорганизма противостоять действию антимикробных препаратов [168]. Международные организации, такие как: центр по контролю и профилактике заболеваний (CDC), Американское общество инфекционных заболеваний, Всемирный экономический форум и Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), объявили устойчивость к АМП «глобальной проблемой общественного здравоохранения» [97, 134, 168, 182].

Устойчивость бактерий к АМП известна с конца 1950-х гг на примере пенициллина, когда у штаммов *S. aureus* была выявлена устойчивость к данному препарату [7, 159]. После появления первого коммерческого препарата пенициллина в 1941 году, устойчивый к пенициллину *S. aureus* был обнаружен уже на следующий год [17, 79, 160]. Полусинтетический антибиотик метициллин из класса пенициллинов, стал применяться в 1960 году в отношении устойчивых к пенициллину штаммов *S. aureus*, но в том же году к нему развилась резистентность [127, 160]. Тогда данное явление не вызывало беспокойства, поскольку были открыты новые классы АМП: нитрофураны в 1953 г., макролиды в 1952 г., тетрациклины в 1948 г., хинолоны в 1960 г. [86, 135]. Это позволило предположить, что резистентность к АМП может быть преодолена путем разработки новых препаратов, но в последующие десятилетия появились иные механизмы устойчивости, и проблема стала ещё более актуальной [35].

Кроме этого, за последние 50 лет не было открыто новых классов АМП [62, 127]. Таким образом, большая часть используемых в настоящее время АМП была

открыта в «золотую эру» исследований антибиотиков (1940-1990 гг.), а после этого в основном, разрабатывались производные уже существующих препаратов [81]. Только 25% фармацевтических компаний, участвовавших в исследованиях антибиотиков в 1980-х годах, все еще действуют сейчас, поскольку большинство корпораций отказалось от разработок в данной области [131, 135].

За последние 30 лет, не было открыто и выведено на рынок ни одного нового класса антибиотиков [23, 86]. Согласно данным за 2018 год, только 2 из 45 перспективных АМП, прошедших клинические испытания для рынка США, были разработаны крупными фармацевтическими фирмами, остальные были предоставлены исследовательскими лабораториями, а также малыми и средними компаниями [137]. Исследуются возможности альтернативных антибиотикам препаратов, таких как бактериофаги и антимикробные пептиды [73]. Начиная с 1980-х годов, из различных источников было выделено около 1200 антимикробных пептидов, но пока ни один из них не может быть использован как полноценная замена антибиотикам [86]. Между тем, произошло распространение пула патогенных устойчивых бактерий, в результате чего снизилась эффективность лечения инфекционных заболеваний, выросли их тяжесть, длительность течения и смертность [12, 60, 165].

Согласно отчету ВОЗ за 2019 год, антибиотикорезистентность является причиной смерти 700 000 человек. По оценкам, к 2050 году эта цифра может вырасти до 20 миллионов, а экономические потери превысят 2,9 триллиона долларов [162, 180]. Помимо высоких затрат на исследования и развитие антибиотиков, ускоренное развитие антибиотикорезистентности привело к снижению доходности инвестиций в фармацевтические исследования и разработки. Первоначально резистентность к АМП была распространена среди стафилококков, стрептококков и гонококков, но в настоящее время, более 70% патогенных бактерий устойчивы по крайней мере к одному антибиотику [88]. Неудовлетворительные санитарно-гигиенические условия, загрязнение окружающей среды АМП и их свободная, безрецептурная продажа способствуют распространению резистентных штаммов [57, 66, 124, 151].

17 мая 2024 года Всемирная организация здравоохранения опубликовала обновлённый список бактериальных патогенов, включающий 15 семейств, по отношению к разработке новых АМП поделённых на группы критического, высокого и среднего уровней приоритетности:

Критический уровень приоритетности

- *Enterobacterales*, резистентные к цефалоспорином третьего поколения и карбапенемам;
- *Acinetobacter baumannii*, резистентные к карбапенемам;
- *Mycobacterium tuberculosis*, резистентные к рифампицину.

Высокий уровень приоритетности

- *Staphylococcus aureus*, резистентные к метициллину.
- *Salmonella typhi*, резистентные к фторхинолонам;
- *Pseudomonas aeruginosa*, резистентные к карбапенемам;
- *Shigella* spp, резистентные к фторхинолонам;
- *Enterococcus faecium*, резистентные к ванкомицину;
- *Neisseria gonorrhoeae*, резистентные к фторхинолонам и/или цефалоспорином третьего поколения;
- Небрюшнотифозные сальмонеллы, резистентные к фторхинолонам;

Средний уровень приоритетности

- Стрептококки группы А, резистентные к макролидам;
- Стрептококки группы В, резистентные к пенициллину.
- *Streptococcus pneumoniae*, резистентные к макролидам;
- *Haemophilus influenzae*, резистентные к ампициллину;

По сравнению со списком бактериальных патогенов 2017 года, *Helicobacter pylori*, устойчивые к кларитромицину, и *Campylobacter* spp., устойчивые к фторхинолонам, были исключены из группы высокого уровня приоритетности. В группы критически высокого уровня приоритетности добавлены *M. tuberculosis*, устойчивые к рифампицину и *S. pneumoniae*, устойчивые к макролидам. *P. aeruginosa*, устойчивые к карбапенемам, переведены из группы критически

высокой приоритетности в группу высокой приоритетности. Данный список демонстрирует широкую распространённость резистентности к АМП, в связи с чем приоритетные патогены присутствуют среди грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, среди патогенов, являющихся возбудителями антропонозов, зооантропонозов, сапронозов, среди условно-патогенных бактерий, среди возбудителей, передающихся контактным, фекально-оральным и капельным путями [182].

1.2 Причины возникновения резистентности к АМП

Согласно стратегии по предупреждению распространения устойчивости к АМП до 2030 года, принятой в 2017 году в Российской Федерации [40], основными причинами возникновения и распространения резистентности являются:

- ограниченная доступность тест-систем для оценки устойчивости бактериальных штаммов к антимикробным препаратам в сферах практического здравоохранения и ветеринарии;
- нарушение состава нормальной микрофлоры человека или животных;
- дефицит механизмов межведомственного взаимодействия по предупреждению распространения антибиотикорезистентности и её мониторинга;
- бесконтрольное и иррациональное применение АМП в здравоохранении, пищевой промышленности, сельском хозяйстве и ветеринарии;
- загрязнение окружающей среды и появление устойчивости к АМП, связанные с применением генно-инженерно-модифицированных организмов;

Исследования показывают, что вид АМП и продолжительность лечения выбирают ошибочно в 30%–50% клинических случаев [122, 145, 177]. Во всем мире антибиотики используют в качестве стимулятора роста домашнего скота [82]. По оценкам экспертов, около 80% антибиотиков продаются в США только для использования в качестве стимуляторов роста и для борьбы с инфекционными заболеваниями скота. В одном из исследований было подсчитано, что общее потребление антибиотиков в животноводстве в 228 странах в 2010 году составило

63151 тонну [174]. Прогнозируется рост потребления антибиотиков на 67 % к 2030 году, что примерно соответствует удвоению потребления в России, Бразилии, Индии, КНР и ЮАР [174].

1.3 Виды резистентности к АМП

В настоящее время, у бактерий выделяют два типа резистентности — природную и приобретённую [36, 147]. Природная резистентность — это обусловленная видовыми особенностями микроорганизма устойчивость к определенным классам антибиотиков, связанная с отсутствием у микроорганизмов мишени для проявления действия АМП [2, 36]. Примером природной резистентности является устойчивость к ванкомицину у *E. coli* и устойчивость *P. aeruginosa* к ампициллину и цефалоспорином 1-го и 2-го поколения [147, 154].

Даптомицин, который был одобрен для клинической практики в 2003 г., эффективен против грамположительных бактерий, однако не проявляет активность в отношении грамотрицательных бактерий вследствие различия в строении цитоплазматической мембраны (ЦПМ). Поскольку ЦПМ грамотрицательных бактерий содержит меньшую долю анионных фосфолипидов по сравнению с грамположительными бактериями, эффективность Ca^{2+} -опосредованного внедрения даптомицина в ЦПМ снижается [180]. Кроме того, некоторые АМП не проникают через мембрану, что также рассматривается как разновидность природной резистентности. У грамположительных бактерий ванкомицин ингибирует сшивание пептидогликана, воздействуя на пептиды d-Ala-d-Ala, тогда как при взаимодействии с грамотрицательными бактериями ванкомицин не проходит через внешнюю мембрану.

Приобретенная резистентность появляется вследствие мутации, или в результате переноса генетического материала в бактериальную клетку-реципиент [1, 36]. В первом случае, мутация передаётся дочерним клеткам (вертикальный путь переноса генов резистентности) [60]. Второй путь приобретения устойчивости (горизонтальный перенос генов при посредстве мобильных генетических элементов — плазмид и транспозонов) реализуется посредством

трансформации, транспозиции и конъюгации [82, 181]. Трансформацией называется поглощение внеклеточной донорской ДНК бактерией-реципиентом. При трансдукции донорская ДНК, содержащаяся в бактериофаге, проникает в бактерию-реципиент. Конъюгация предполагает передачу ДНК донора реципиенту при непосредственном контакте двух клеток [151]. Обычно наряду с мобильными генетическими элементами передаются генетические детерминанты ферментов, которые инактивируют АМП [164]. Встречаются случаи, когда в состав мобильных элементов входят кластеры регуляторных и структурных генетических детерминант, которые кодируют метаболические пути синтеза модифицированных мишеней действия АМП [36]. АМП могут дополнительно оказывать селективное воздействие на возникновение резистентности [114, 177, 181].

1.4 Механизмы антибиотикорезистентности бактерий

Основными механизмами резистентности к АМП являются: снижение проникновения препарата внутрь бактериальной клетки, модификация мишени действия препарата, инактивация вещества и активное его выведение, а также защита мишени действия АМП [36, 45, 67, 147]. Всё более актуальным становится механизм инактивации АМП, вследствие возможности переноса мобильными генетическими элементами [71, 96, 110, 125]. За последние два десятилетия возросло количество возбудителей, продуцирующих β -лактамазы (например, β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС), карбапенемазы и металло- β лактамазы), что привело к резистентности к цефалоспорином третьего поколения и карбапенемам [70, 179, 186].

1.5 Определение чувствительности к АМП в клинической практике

В сфере здравоохранения проблема антибиотикорезистентности усугубляется интенсивной селекцией госпитальных штаммов по принципу резистентности к широкому спектру АМП [35]. В настоящее время у клинически значимых микроорганизмов наблюдается резистентность практически ко всем антимикробным средствам, применяемым в медицинской практике [52, 54, 96].

Для лечения инфекций, вызванных резистентными микроорганизмами, в последние годы было синтезировано несколько новых АМП. Например, разработаны синтетический галогенированный антибиотик из группы тетрациклинов (эравацилин), фторхинолон четвертого поколения (делафлоксацин), сидерофорный цефалоспорин (цефидерокол), антибиотик из нового поколения полусинтетических аминогликозидов (плазмомоцин), а также комбинированный препарат, включающий меропенем и ингибитор β -лактамаз ваборбактам [135]. Учитывая стоимость научных исследований (стоимость цикла от создания нового АМП до его внедрения в практику может достигать от десятков до 200–300 миллиардов рублей) и время, которые необходимы для регистрации и внедрения новых АМП (10 и более лет), первостепенное значение для повышения эффективности этиотропной терапии бактериальных инфекций новыми и ранее применяющимися препаратами будет иметь выявление основных причин возникновения и распространения устойчивых к действию АМП микроорганизмов [40]. С точки зрения клинической практики, всё большее значение приобретают целенаправленное предупреждение возникновения и распространения устойчивости к АМП, в том числе этиологическая диагностика и определение резистентности микроорганизмов к АМП, а также оптимизация схем лечения, снижающих риск развития устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к АМП [16, 26, 28].

В начальных фазах инфекций, особенно тяжело протекающих, чаще всего проводят эмпирическую терапию, при которой АМП подбирают в зависимости от локализации инфекции, клинического состояния больного, анамнеза, сопутствующих заболеваний и выявленных органных патологий. АМП должен быть эффективен в отношении вероятного возбудителя, лекарственная чувствительность которого согласуется с эпидемиологическими данными, полученными при ретроспективном анализе результатов мониторинга при микробиологических исследованиях [39]. По возможности, назначению АМП должно предшествовать микробиологическое исследование. Чаще всего, исследования проводятся при помощи ДДМ и содержат данные качественного

характера, что позволяет отнести исследуемый микроорганизм к одной из трех категорий: чувствительный при стандартном режиме дозирования, чувствительный при использовании повышенной дозировки и резистентный [32, 51, 75]. Во многих случаях эти данные являются достаточными для назначения антимикробной терапии. Однако в ряде случаев, для выбора оптимального препарата и схемы лечения в клинической практике, а также для исследования уровня устойчивости бактериальных популяций, необходимы количественные данные – то есть определение значения МПК [28, 30, 171]. МПК — это наименьшая концентрация АМП, которая полностью подавляет видимый рост исследуемого микроорганизма *in vitro* в строго контролируемых условиях. МПК является высокоинформативным значением, определяющим степень устойчивости микроорганизма к АМП [28].

1.6 Особенности микроорганизмов, требующих количественного определения чувствительности к АМП

1.6.1 Микробиологические критерии количественного определения чувствительности к АМП

Основным критерием, регламентирующим необходимость количественного определения чувствительности исследуемого микроорганизма к АМП, является невозможность интерпретации результатов, полученных ДДМ, как «чувствительный» или «резистентный». В разных версиях руководящих документов такой результат исследования может обозначаться как «чувствительный при увеличенной экспозиции» (KMAX) [34], «чувствительный-дозозависимый» и «промежуточный» (CLSI M100-ED34) [74].

В Российских рекомендациях по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (KMAX, Версия 2024-02) микроорганизм оценивается как «Чувствительный при увеличенной экспозиции (Susceptible, Increased exposure, I)» при высокой вероятности эффективности терапии при увеличении экспозиции препарата [34].

Согласно стандарту CLSI M100-ED34 категория «чувствительный-дозозависимый (SDD)» — это категория, которая подразумевает, что

восприимчивость изолята зависит от режима дозирования для каждого конкретного пациента. Для достижения концентраций, которые будут клинически эффективными в отношении изолятов, необходимо использовать режим дозирования, обеспечивающий более высокую экспозицию препарата [74].

Категория интерпретации микроорганизма «промежуточный (I)» в CLSI M100-ED34 включает изоляты с МПК или диаметрами зон подавления роста, находящихся в диапазоне между чувствительными и резистентными. МПК при этом, в отличие от категории «SDD», соответствует обычно достигаемой концентрации АМП в крови и тканях, но чувствительность данной категории штаммов может быть ниже, чем в категории «S» (чувствительный) [74].

Таким образом, основными препятствиями на пути к клиническому успеху в случае со штаммами категории «SDD», являются особенности фармакокинетики пациента, а в случае со штаммами категории «I» — пониженная чувствительность микроорганизма [74].

В некоторых случаях при оценке чувствительности комбинаций микроорганизмов с АМП результат не может быть интерпретирован однозначно (зона технической неопределенности). Зона технической неопределенности (ЗТН) — это диапазон значений диаметров зон задержки роста (ЗЗР), в котором клиническая интерпретация вызывает сомнения. При соответствии результата исследования ЗТН следует выполнить альтернативное исследование — в т.ч., определение МПК к данному АМП [34].

Руководящие документы рекомендуют проводить количественную оценку уровня резистентности изолятов, которые относятся к ЗТН, а в случае с высокотоксичными АМП, а также с целью выявления резистентности низкого уровня — для категории «I» [34, 74].

1.6.2 Определение резистентности к β -лактамным антибиотикам

Для некоторых микроорганизмов сложно определить механизм устойчивости и выбрать оптимальные варианты лечения, основываясь только на данных качественного характера [94, 169]. Это наблюдается при определении резистентности к β -лактамам у штаммов *Streptococcus pneumoniae*, устойчивых к

оксациллину и у штаммов *Haemophilus influenzae*, устойчивых к аминопенициллинам. В первом случае, резистентность *S. pneumoniae* связана с изменениями в пенициллинсвязывающих белках (ПСБ), которые снижают аффинность антибиотика к ПСБ [153]. Поскольку геном *S. pneumoniae* кодирует шесть вариантов ПСБ, и каждый β -лактамыный антибиотик связывает разные ПСБ, модификация ПСБ приводит к увеличению МПК всех β -лактамов, но степень этого увеличения варьирует в зависимости от конкретного антибиотика [102]. В случае *H. influenzae*, два основных механизма резистентности к аминопенициллинам приводят к снижению чувствительности к этому классу антибиотиков либо за счет продукции β -лактамазы, либо за счет модификации ПСБ [172, 173].

1.6.3 Выявление антибиотикорезистентности низкого уровня

Резистентность штаммов сальмонелл к фторхинолонам чаще обусловлена хромосомными мутациями в локусах, которые отвечают за устойчивость к хинолонам (QRDR) и проявляется резистентностью к налидиксовой кислоте (МПК > 16 мкг/мл) и значениями МПК ципрофлоксацина выше 0,12 мкг/мл [138]. Устойчивость к хинолонам, опосредованная плазмидами (PMQR), понижает чувствительность к ципрофлоксацину (МПК от 0,125 мкг/мл до 1,0 мкг/мл), чувствительность к налидиксовой кислоте при этом умеренно повышается или не изменяется [125, 138, 161]. Механизмы PMQR клинически значимы, поскольку у пациентов, инфицированных *Salmonella Typhi* или нетифоидными изолятами *Salmonella enterica* с МПК ципрофлоксацина от 0,125 мкг/мл до 1,0 мкг/мл, наблюдается больше неблагоприятных исходов терапии, а купирование лихорадки более длительное, чем у пациентов с изолятами, полностью чувствительными к ципрофлоксацину (МПК < 0,06 мкг/мл) [80]. При использовании данных о чувствительности к ципрофлоксацину качественного характера, обнаружение низкого уровня устойчивости не представляется возможным [72].

1.6.4 Возбудители с повышенным значением МПК

Препаратом выбора для лечения инфекций, вызванных инвазивным метициллин-резистентным *S. aureus* (MRSA), является ванкомицин. Однако во всем мире регистрируется рост числа изолятов MRSA с высокими значениями МПК ванкомицина, тем не менее, находящимися в пределах диапазона чувствительности. С другой стороны, безопасное лечение не возможно при МПК ванкомицина более 1 мкг/мл, вследствие высокого риска развития острой почечной недостаточности [152]. Неудовлетворительные клинические результаты и смертность, связанные с повышенным значением МПК ванкомицина, описаны во многих исследованиях [85, 115].

1.6.5 Терапия инфекций, вызванных карбапенемазопродуцирующими энтеробактериями

Основным методом лечения инфекций, которые связаны с множественной резистентностью к АМП, до появления АМП, сочетающих β -лактамы антибиотики с ингибиторами β -лактамаз, была комбинация антибиотиков различных фармакологических групп [156]. Кроме того, было продемонстрировано, что такие новые комбинации (например, азтреонам с цефтазидимом/авибактамом) эффективны независимо от механизмов резистентности [139, 158]. В случае исследования комбинаций АМП, наиболее простой способ определения эффективности данных комбинаций основан на методе суперпозиции тест-полосок E-тест (кросс-тест), который, как было показано, особенно эффективен для комбинаций азтреонам/ингибитор β -лактамаз [19]. Отсутствие вышеуказанных антибиотиков во многих странах подчеркивает возможность использования карбапенемов в комбинации у пациентов с инфекциями, вызванными микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью, с МПК меропенема 8 мкг/мл или комбинации эртапенема с меропенемом в случае инфекций, вызванных штаммами *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующими карбапенемазу (KPC) [139, 149].

1.7 Особенности применяемого АМП, требующие количественного определения чувствительности

1.7.1 Сохранение эффективности антибиотиков широкого спектра действия

Карбапенемы рассматривались как препарат выбора при тяжелом течении инфекций, вызванных БЛРС-продуцирующими штаммами [136]. Растущая во всем мире заболеваемость инфекциями, связанными с БЛРС, привела к более широкому использованию карбапенемов, что способствовало селекции по признаку устойчивости к карбапенемам [61, 128]. Чтобы избежать применения карбапенемов, ряд авторов предложили использовать антибиотики, активные согласно исследованию их чувствительности, несмотря на то, что они гидролизуются β -лактамазами [76]. Также, если исследуемый штамм является чувствительным, можно использовать β -лактам/ингибитор β -лактамазы комбинации (BLBLI) или цефалоспорины в качестве альтернативы карбапенемам [142]. Клинический результат при использовании этих АМП зависит от нескольких факторов, включая вид возбудителя, локализацию очага инфекции и МПК [111, 140, 146, 150]. Исследования показывают большую вероятность клинического успеха в отношении инфекций мочевых или желчевыводящих путей, вызванных *E. coli* [150], и более низкую летальность для штаммов со значением МПК 4 мкг/мл при использовании комбинации BLBLI, чем для изолятов с более высокой МПК [111, 146]. Применение цефалоспоринов 3-го поколения следует ограничить изолятами *E. coli* или инфекциями, вызванными *K. pneumoniae* со значением МПК ниже 1 мкг/мл, поскольку многие изоляты, продуцирующие БЛРС, являются резистентными [59].

1.7.2 Ситуации, связанные с риском возникновения токсических осложнений

Большинство антибиотиков выводятся почками [118]. Нефротоксические осложнения могут возникнуть при применении β -лактамов, аминогликозидов, колистина, для линезолида характерна гематотоксичность, для даптомицина – миотоксичность. В случае узкого терапевтического окна АМП возможности варьирования дозы снижаются. Наибольшую опасность среди β -лактамных антибиотиков из-за неврологической токсичности представляет цефепим, с

порогом $C_{\min} < 22$ мкг/мл при периодической инфузии и равновесной концентрацией $C_{ss} < 35$ мкг/мл при непрерывной инфузии [104, 117]. Например, в случае инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, клинический порог устойчивости EUCAST составляет 8 мкг/мл, что подразумевает терапевтический целевой уровень между 32 мкг/мл (из-за целевого показателя фармакокинетики и фармакодинамики (ФК/ФД) в 4 раза больше МПК) и 35 мкг/мл при непрерывной инфузии [76, 90, 100]. В этом случае информация о МПК возбудителя, если она ниже клинического порога устойчивости EUCAST, позволит использовать более низкие концентрации, тем самым снижая риск токсических осложнений. Аналогичные риски существуют в отношении колистина и микроорганизмов порядка *Enterobacterales*, для которых концентрации должны быть выше 2 мкг/мл, но ниже 2,4 мкг/мл [76, 90, 170].

1.8 Особенности фармакокинетики пациентов, требующие количественного определения чувствительности к АМП

1.8.1 Ситуации, связанные с риском недостаточного воздействия АМП

Использование рекомендуемых доз может быть связано с субтерапевтическим воздействием, особенно у пациентов ОРИТ [148]. В этой группе был описан специфический фармакокинетический профиль с очень высокой межиндивидуальной вариабельностью, повышенным объемом распределения и потенциально увеличенным почечным клиренсом (ARC) [118, 148]. ARC определяется клиренсом креатинина ($CrCl$) выше 130 мл/мин/1,73м², встречается у 20%–65% пациентов в ОРИТ и соответствует увеличению почечного кровотока, которое часто возникает при септическом шоке [69, 118, 167]. Это вызывает значительное увеличение клиренса антибиотиков, элиминируемых почками, что повышает вероятность несоответствия достигаемых показателей фармакокинетики пациента/фармакодинамики препарата (ФК/ФД) целевым. Например, популяционная ФК пиперациллина была исследована у 110 пациентов ОРИТ [84]. Было показано, что у пациентов с $CrCl > 90$ мл/мин высокая доза 24 г в день при непрерывной инфузии не обеспечивает достижение уровня ФК/ФД в 4 раза выше МПК при инфекциях, вызванных возбудителями с

МПК 4 мкг/мл [84]. В этом случае использование более высокой суточной дозы и/или длительных прерывистых или непрерывных инфузий является лучшим способом повысить вероятность достижения целевого показателя ФК/ФД [118]. При этом низкое значение МПК позволяет избежать значительного увеличения дозы.

1.8.2 Труднодоступные очаги инфекции

Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) в основном выполняется на образцах плазмы и может не отражать воздействие АМП в очаге инфекции, особенно при эндокардитах, медиастинитах, инфекциях центральной нервной системы, пневмопатиях или инфекциях протезного материала [100]. Таким образом, важно учитывать диффузию антибиотиков в тканях и соответствующим образом корректировать целевую концентрацию АМП в плазме [93, 178]. Например, при рассмотрении диффузии в легких информативным критерием является отношение концентрации АМП в жидкости эпителиальной выстилки (ELF) к концентрации АМП в плазме (соотношение ELF/плазма). Антибиотики классифицируются в зависимости от их диффузии по соотношению ELF/плазма: соотношение $ELF/плазма < 1$ — ванкомицин, меропенем и пиперациллин; соотношение $ELF/плазма \sim 1$ — цефепим и линезолид; соотношение $ELF/плазма > 1$ — фторхинолоны и азитромицин [93, 178]. Антибиотики с самым высоким коэффициентом диффузии могут быть применимы для микроорганизмов с высоким значением МПК [44]. Прямое измерение в очаге инфекции также представляет интерес и позволяет напрямую сравнивать концентрацию АМП с МПК возбудителя. Это было описано, например, для цефотаксима в перитонеальной жидкости, меропенема в спинномозговой жидкости и колистина в дренажной жидкости при инфекции протеза [58, 92, 155].

Как следует из приведённых выше данных, в клинической практике существует значительное количество ситуаций, в которых чувствительность к АМП необходимо определять количественно, получая значение МПК [13, 14, 132].

1.9 Количественные методы определения чувствительности к антимикробным препаратам

Количественные методы изучения чувствительности позволяют, кроме определения клинической категории и/или механизма резистентности микроорганизма к АМП, получить значение МПК [38, 107, 166]. Количественные методы с точки зрения технологии проведения делятся на диффузионные и последовательных серийных разведений [31].

1.9.1 Метод серийных разведений

В основе методов серийных разведений лежит определение величины МПК в жидкой или плотной питательной среде [116, 117]. Оба варианта метода предполагают внесение различных концентраций АМП в питательную среду с последующим посевом стандартизированного инокулюма, инкубацией и учётом результатов (Рисунок 7) [87, 183].

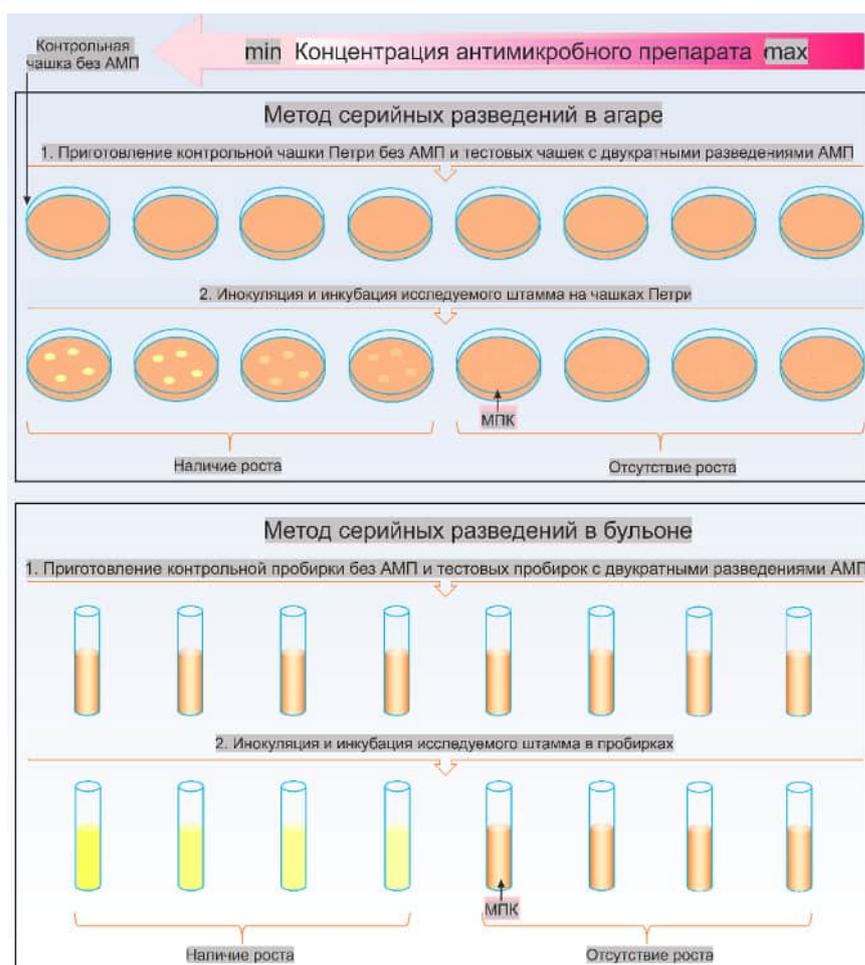


Рисунок 7 — Методы серийных разведений в агаре и бульоне, адаптировано из [103]

Проведение исследования также включает обязательный контроль чистоты культуры и контроль роста микроорганизмов на среде без АМП [160].

В зависимости от конечного объёма питательной среды различают микрометод (объём среды на каждое разведение составляет 0,2 мл или менее) и макрометод (объём среды на каждое разведение составляет более 0,2 мл). По причине низкой производительности, область использования макрометода ограничена необходимостью определения чувствительности единичных штаммов [105].

Концентрация исследуемой культуры в питательной среде составляет 5×10^5 КОЕ/мл для каждого разведения АМП. Инкубацию производят при $35 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 18 ± 2 ч. После инкубации, инокулированные пробирки просматривают в проходящем свете для установления наличия или отсутствия роста. Рост культуры в присутствии АМП сравнивают с референтными пробирками, которые служат отрицательным контролем (питательная среда без инокулюма) и положительным контролем (инокулированная питательная среда без АМП). За МПК принимается первая наименьшая концентрация АМП, где визуально или инструментально (спектрофотометрия) не определяется рост микроорганизмов [9, 15].

Микрометод проводят при конечном объеме питательной среды 0,2 мл и менее в плоскодонных микротитровальных планшетах.

Существуют коммерческие наборы, состоящие из стандартных 96-луночных плоскодонных планшетов или отдельных стрипов, содержащих высушенные АМП в различных концентрациях. При проведении исследования в лунки стрипов добавляют по 0,1 мл суспендированных в питательной среде микроорганизмов. Результаты определения антибиотикочувствительности допускается учитывать визуально (видимое невооруженным глазом помутнение среды) или при помощи спектрофотометра, регистрирующего изменение оптической плотности среды.

Основными преимуществами коммерческих наборов являются: высокая производительность, стандартизованность и простота в работе [29]. Применение таких тест-систем позволяет получить достоверные результаты без трудозатратных и плохо поддающихся стандартизации подготовительных этапов

[48]. Сокращённым вариантом метода серийных разведений являются автоматизированные системы типа VITEK или Phoenix, однако с их помощью нельзя получить точное значение МПК.

В настоящее время наборы реагентов для определения антибиотикочувствительности микроорганизмов методом серийных микроразведений с определением МПК выпускают следующие производители: MIKROLATEST SensiLaTest MIC (Erba Lachema, Чешская Республика), Sensitre plate (Thermo Fisher Scientific, Великобритания), MICRONAUT-S и MICRONAUT MIC-Strip (MERLIN, Германия), SensiTest (Liofilchem, Италия) и UMIC (Biocentric Франция).

Методы серийных разведений в агаре и бульоне стандартизованы такими международными организациями, как Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI) и EUCAST. Метод серийных разведений в агаре считается «золотым стандартом» для тестирования антимикробной восприимчивости из-за его точности и воспроизводимости. Одним из преимуществ данного метода является более простое визуальное определение наличия роста по сравнению с методом серийных разведений в бульоне [99]. Кроме этого, метод серийных разведений в агаре лучше подвергается автоматизации. Также, он позволяет оценивать чувствительность нескольких культур в одном эксперименте [113]. Оба метода серийных разведений позволяют получить количественные данные в виде значений МПК [176]. Метод серийных микроразведений обеспечивает большую гибкость, скорость, минимизацию затрат и удобство использования [112]. К преимуществам данного метода относится возможность продолжительного хранения ёмкостей с АМП (заранее сорбированных планшетов или стрипов) и высокая производительность [5]. Поскольку микрометод проводят при конечном объеме 0,2 мл и меньше, его применение способствует значительному сокращению количества расходуемых материалов.

С другой стороны, методы серийных разведений являются трудоёмкими, поскольку они требуют приготовления чашек с агаром или пробирок с бульоном с различными концентрациями АМП [49, 106]. Кроме этого, чашки с АМП должны

быть использованы в течение недели после приготовления. Методы серийных разведений могут не подходить для определения чувствительности к некоторым веществам, например, эфирным маслам. Так, при добавлении в агар гидрофобных экстрактов, не происходит их равномерного смешивания с агаром, а внесённые в бульон эфирные масла могут испариться из раствора до момента окончания исследования. Применение эмульгаторов и растворителей, при этом, снижает точность результатов анализа [185]. Несмотря на наличие вышеперечисленных недостатков, методы серийных разведений остаются ценными и часто рекомендуются в качестве стандартизованного метода определения чувствительности к АМП [37, 78].

1.9.2 Метод градиентной диффузии (Е-тест)

Метод градиентной диффузии предполагает альтернативный подход к оценке чувствительности микроорганизмов к АМП путём объединения фундаментальных принципов диффузионных методов и методов серийных разведений. Разработанный в 1980-х годах, он приобрёл популярность как альтернатива методу серийных разведений [68]. Чувствительность микроорганизмов с использованием Е-теста определяют аналогично ДДМ.

Е-тест представляет собой полоску из полимерной плёнки или бумаги (средний размер 0,5 x 6,0 см), на одну из сторон которой нанесён градиент АМП, а на другую — изображение шкалы с концентрациями. Диффузия АМП в плотную питательную среду с тест-полоски вызывает ингибирование роста исследуемого штамма в зоне, где концентрация АМП превышает значение МПК. Значение МПК учитывают в том месте, где к полоске вплотную подходит граница зоны подавления роста [48, 51]. На сегодняшний день, коммерческие тест-полоски применяются во многих микробиологических лабораториях [98, 143].

При сравнительной простоте использования, Е-тест позволяет получать количественные данные, т.е. определять значение МПК. Подробные инструкции по определению антибиотикочувствительности микроорганизмов при помощи Е-теста прилагаются изготовителем к набору реагентов [48].

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

Преимущества применения метода градиентной диффузии заключаются в скорости и удобстве тестирования чувствительности к АМП [176]. Он демонстрирует хорошую воспроизводимость и точность при количественной оценке МПК. Исследования показали удовлетворительную корреляцию между результатами, полученными методом градиентной диффузии и значениями МПК, полученными с помощью МСР [101, 121]. Одним из ключевых преимуществ E-теста является стабильность градиента концентрации [130], что позволяет использовать его для оценки чувствительности к АМП различных типов бактерий, включая прихотливые и медленно растущие микроорганизмы, а также широкий спектр клинически значимых микроорганизмов [109].

К недостаткам метода градиентной диффузии можно отнести затруднительный учёт результатов, обусловленный появлением перистых или роящихся краёв зоны роста, создаваемых некоторыми штаммами на пересечении с тест-полоской. Кроме этого, E-тест предназначен для тестирования чувствительности к АМП и может не подходить для других типов антимикробных веществ или новых соединений. Стоимость коммерческих тест-полосок может быть выше по сравнению с некоторыми другими методами тестирования чувствительности, что делает его менее экономически целесообразным для крупномасштабного тестирования или условий с ограниченными ресурсами [108]. Также было отмечено, что методу свойственны систематические смещения в сторону более высоких или более низких значений МПК для определенных комбинаций микроорганизма и АМП [108, 144].

Руководящие документы рекомендуют проводить количественную оценку уровня резистентности изолятов, которые относятся к ЗГН, а в случае с высокотоксичными АМП, а также с целью выявления резистентности низкого уровня — для категории «I» [34, 74].

Определение чувствительности к некоторым АМП диско-диффузионным методом вызывает трудности из-за особенностей их физико-химических свойств [157]. Например, гликопептидные антибиотики, такие как ванкомицин, вследствие высокой молекулярной массы хуже диффундируют в агар. Медленная диффузия препарата и нелинейный градиент концентрации вокруг диска с ванкомицином обуславливают незначительную разницу в диаметре зоны задержки роста между чувствительными и резистентными штаммами, что может привести к недостоверным результатам.

Чтобы избежать этого, рекомендуется использовать методы определения МПК, такие, как Е-тест, для определения чувствительности к ванкомицину у стафилококков. Е-тест позволяет определить МПК ванкомицина даже у тех штаммов, которые, при исследовании ДДМ, могут не показывать значительной разницы в диаметре зоны задержки роста.

Методы серийных разведений эффективны для обнаружения штаммов с высокой устойчивостью к ванкомицину ($\text{МПК} \geq 8$ мкг/мл), однако, штаммы с более низкими значениями МПК (4-8 мкг/мл), называемые штаммами с промежуточной устойчивостью (гетерогенно устойчивые), лучше обнаруживаются при использовании модифицированных питательных сред методом градиентной диффузии [157].

1.10 Заключение по главе 1

Определение чувствительности микроорганизмов к АМП – одна из важнейших задач микробиологической диагностики [46, 52, 97, 134]. При соответствии результатов определения чувствительности к АМП промежуточным категориям чувствительности (I, SDD) или ЗТН, в некоторых клинических случаях, для выбора оптимального препарата и схемы лечения в клинической практике, а также в целях анализа резистентности микробных популяций, необходимы данные количественного характера, к которым относится значение МПК [28, 30, 171]. МПК до настоящего времени считается наиболее информативным количественным показателем, определяющим степень устойчивости микроорганизма к АМП [28].

Определять МПК рекомендовано у пациентов с особенностями фармакокинетики (например, пациенты отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), пациентов с почечной недостаточностью, увеличенным почечным клиренсом, ожирением, муковисцидозом) и при наличии труднодоступных очагов локализации инфекции (менингит, эндокардит, остеомиелит) [41]. Кроме этого, количественное определение чувствительности необходимо при использовании АМП с узким терапевтическим окном (карбапенемы, аминогликозиды, ванкомицин, линезолид, колистин) [41, 42]. Если штамм возбудителя является продуцентом БЛРС, обладает множественной лекарственной устойчивостью, и/или отсутствуют данные об уровне резистентности возбудителя к β -лактамным антибиотикам, также следует определять значение МПК [149]. Существуют АМП, для которых пока не определены пограничные значения МПК и зон задержки роста, позволяющие интерпретировать результаты исследования чувствительности к антибиотикам в виде клинических категорий. В таких случаях, отечественные и международные стандарты предписывают определять значение МПК [91].

Для определения МПК в настоящее время наиболее часто используют два метода — серийных разведений и градиентной диффузии (Е-тест). Метод серийных разведений является «золотым стандартом» определения МПК, однако Е-тест обладает рядом преимуществ, которые обуславливают его высокую востребованность в микробиологической диагностике. К ним относятся простота и скорость выполнения исследования, возможность использования модифицированных плотных питательных сред, применение суперпозиции тест-полосок (кросс-тест) для изучения чувствительности к комбинациям АМП [9, 68, 157]. В то же время, высокая стоимость тест-полосок Е-теста и отсутствие их производства в Российской Федерации ограничивает использование данного метода. [108]. Таким образом, разработка отечественной тест-системы для определения чувствительности к АМП методом градиентной диффузии является актуальной задачей.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ ДИСКО-ДИФФУЗИОННЫМ МЕТОДОМ

Чувствительность исследуемых изолятов к АМП оценивали 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).

С целью оценки практической востребованности тест-системы, была поставлена задача изучить распространённость случаев, в которых количественное определение чувствительности к АМП представляется актуальным. Для этого 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. Критерии интерпретации зон задержки роста (ЗЗР) представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Критерии интерпретации ЗЗР для порядка *Enterobacterales*

АМП; нагрузка на диск, мкг	Пограничные значения ЗЗР, мм					
	EUCAST 14.0				CLSI M100-ED34	
	$S^1 \geq$	$R^2 <$	ЗТН $\min^3 >$	ЗТН $\max^4 \leq$	$S \geq$	$R \leq$
Амикацин; 30	18	18	-	-	20	16
Амоксициллин/ клавулановая кислота; 20/10	19	19	19	20	18	13

Продолжение таблицы 7

Ампициллин; 10	14	14	-	-	17	13
Гентамицин; 10	17	17	-	-	18	14
Меропенем; 10	22	16	-	-	23	19
Налидиксовая кислота; 30	-	-	-	-	19	13
Нитрофурантоин; 300	-	-	-	-	17	14
Тетрациклин; 30	-	-	-	-	15	11
Тобрамицин 10;	16	16	-	-	17	12
Триметоприм/ сульфаметоксазол; 1,25/23,75	14	11	-	-	16	10
Хлорамфеникол; 30	17	17	-	-	18	12
Цефепим; 30	27	24	-	-	25	18
Цефотаксим; 5	20	17	-	-	-	-
Цефтазидим 10;	22	19	-	-	-	-
Ципрофлоксацин 5; (кроме <i>Salmonella</i> <i>spp.</i>)	25	22	22	24	26	21
Ципрофлоксацин; 5 (для <i>Salmonella spp.</i>)	-	-	-	-	31	20
Эртапенем; 10	23	23	-	-	22	18

Примечание: ¹ – Чувствительный; ² – Резистентный; ³ - Зона технической неопределённости (минимальная граница); ⁴ - Зона технической неопределённости (максимальная граница); «-» - отсутствие критериев для данной комбинации микроорганизм/АМП

2.1 Оценка чувствительности изолятов согласно стандарту EUCAST 14.0

Распределение изолятов по категориям чувствительности в абсолютных значениях представлено в таблице 8.

Таблица 8 – Абсолютное количество штаммов различных категорий согласно EUCAST 14.0

Наименование АМП	Штаммы														
	<i>E. coli</i>					<i>Salmonella</i> spp.					<i>Klebsiella</i> spp.				
	S	R	I	ЗТ Н	Всего изучено	S	R	I	ЗТ Н	Всего изучено	S	R	I	ЗТ Н	Всего изучено
Пенициллины															
Ампициллин	711	491	0	0	120	58	9		0	67	–	–	–	–	–
Амоксициллин/ клавулановая кислота	895	307	0	206	120	63	4		0	68	8	1			10
Цефалоспорины															
Цефотаксим	1005	189	8	0	120	63	1		0	65	9	1		0	10
Цефтазидим	1031	129	4	0	120	61	4	2		68	9	1		0	10
Цефепим	964	191	3	0	119	64	1	1		66	8	1		0	10
Карбапенемы															
Меропенем	346	1	1	0	348	20				20	9				
Эртапенем	840	14	0	0	854	47				48	–	–	–	–	–
Фторхинолоны															
Ципрофлоксацин	943	198	6	60	120	–	–	–	–	–	8	1		64	10
Аминогликозиды															
Гентамицин	836	292	0	0	112	61	6		0	67	8	1		0	10
Тобрамицин	841	289	0	0	113	60	6		0	66	9	1		0	10
Амикацин	1068	72	0	0	114	67	1		0	68	9	1		0	10
Сульфаниламиды															
Триметоприм/ сульфаметокса зол	790	339	9	0	113	61	6		0	68	8	1		0	10
Амфениколы															
Хлорамфеникол	1081	116	0	0	119	62	5		0	67	9			0	10

Примечание: «–» – не определяли

2.1.1 Характеристика чувствительности изолятов *E. coli*

Распределение изолятов *E. coli* по категориям чувствительности представлено на рисунке 8. Наибольшее количество резистентных изолятов выявлялось по отношению к АМП групп пенициллинов (41% резистентных изолятов при 95 % ДИ 38,1-43,7% для ампициллина), сульфаниламидов, цефалоспоринов и аминогликозидов первых поколений, более эффективно действовали карбапенемы (не более 1,7% резистентных изолятов при 95% ДИ 1,0-2,8%), ципрофлоксацин, цефепим, амикацин и хлорамфеникол.

При интерпретации результатов определения чувствительности к цефтазидиму и цефепиму (группа цефалоспоринов) 3,6 % (95% ДИ 2,7-4,8%) и 3,2 % (95% ДИ 2,3-4,4%) изолятов *E. coli* относились к категории «I», к триметоприм/сульфаметоксазолу — 0,8 % (95% ДИ 0,4-1,5%) (группа сульфаниламидов). Зона технической неопределенности встречалась по отношению к амоксициллин/клавулановой кислоте (группа пенициллинов) и к ципрофлоксацину (группа фторхинолонов) у 17,1 % (95% ДИ 15,1-19,4%) и 5 % изолятов (95% ДИ 3,9-6,4%) соответственно.

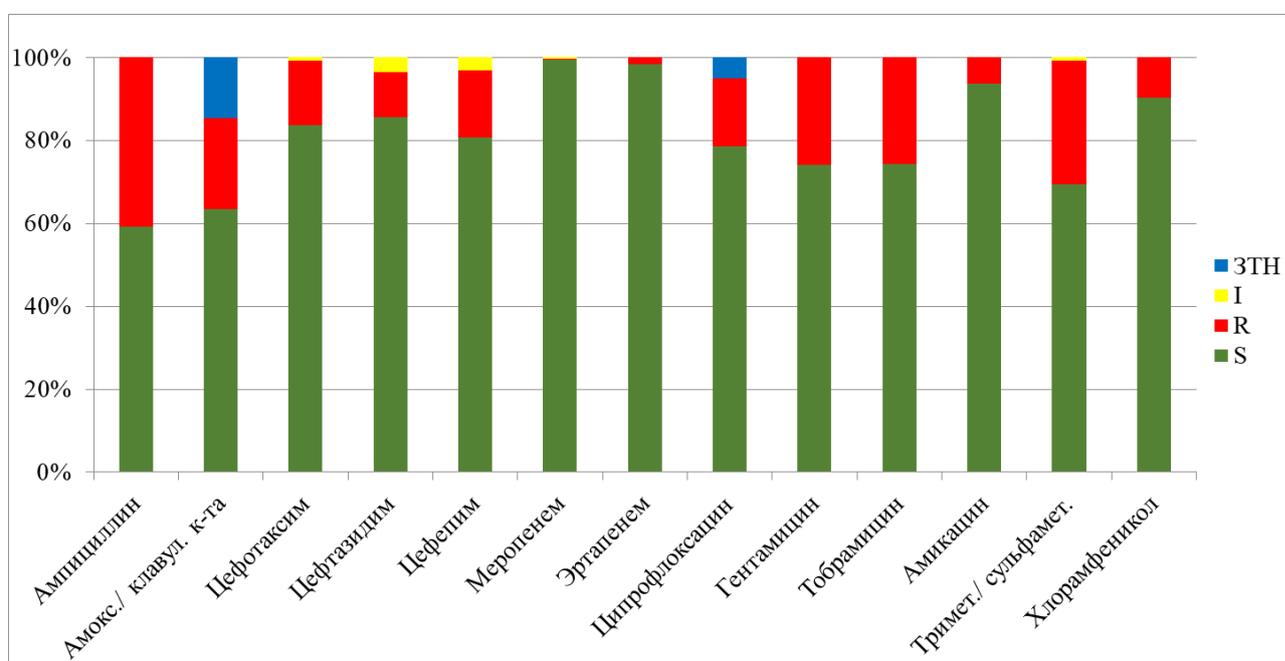


Рисунок 8 – Интерпретация результатов определения чувствительности изолятов *E. coli* согласно EUCAST 14.0

2.1.2 Характеристика чувствительности изолятов *Salmonella* spp.

Распределение изолятов *Salmonella* по категориям чувствительности согласно EUCAST 14.0 представлено на рисунке 9.

Эффективность по отношению к изолятам *Salmonella* демонстрировали пенициллины, сульфаниламиды, цефалоспорины и аминогликозиды первых поколений, практически не было выявлено штаммов, резистентных к карбапенемам, высокую активность показали цефотаксим и амикацин — 96,9% (95% ДИ 95,3-98,0%) и 98,2% (95% ДИ 96,9-99,9%) чувствительных изолятов соответственно.

Наибольшее количество штаммов категории «I» было выявлено по отношению к цефотаксиму 15,7% (95% ДИ 13,8-17,9%), при этом для цефтазидима и цефепима (группа цефалоспоринов) доля таких изолятов составила 3,6 % (95% ДИ 2,7-4,8%) и 2,3 % (95% ДИ 1,3-3,7%) соответственно. Чувствительными при увеличенной экспозиции к триметоприм/сульфаметоксазолу (группа сульфаниламидов) были 0,6 % штаммов (95% ДИ 0,2-1,6%). Штаммов *Salmonella* spp., относящихся к ЗТН, выявлено не было.

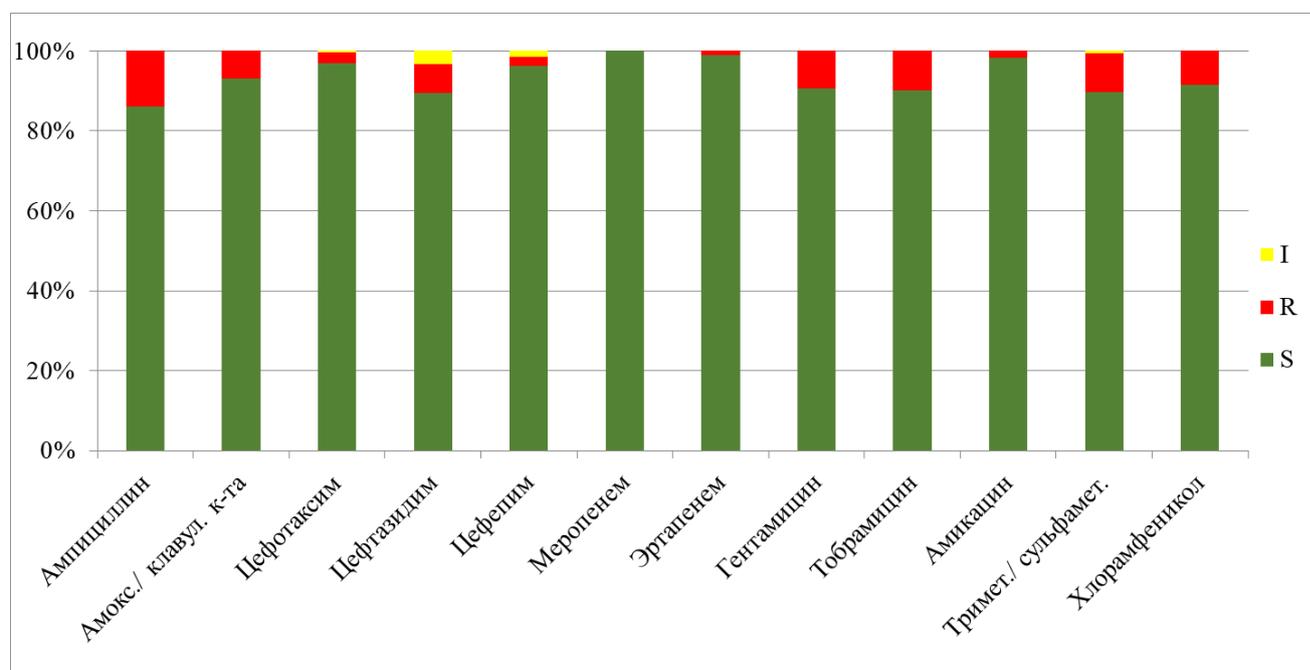


Рисунок 9 – Интерпретация результатов определения чувствительности изолятов *Salmonella* spp. согласно EUCAST 14.0

2.1.3 Характеристика чувствительности изолятов *Klebsiella* spp.

Распределение изолятов *Klebsiella* spp. по категориям чувствительности представлено на рисунке 10. Наибольшее количество чувствительных изолятов *Klebsiella* spp. было выявлено к меропенему — 94,8 % (95% ДИ 88,1-98,1%), амикацину 90,1% (95% ДИ 82,6-94,7%) и хлорамфениколу — 93,1% (95% ДИ 86,2-96,8%). Наименьшую активность показали амоксициллин/клавулановая кислота, цiproфлоксацин, тобрамицин и триметоприм/сульфаметоксазол (Рисунок 10). Чувствительными при повышенной экспозиции к цефтазидиму и цефепиму (группа цефалоспоринов) были 1,0 % (95% ДИ 0,0-5,9%) и 4,0 % (95% ДИ 1,2-10,1%) штаммов *Klebsiella* spp. соответственно; к цiproфлоксацину (группа фторхинолонов) - 4,0 % (95% ДИ 1,2-10,1%). Достоверно реже данная категория встречалась по отношению к цефотаксиму, меропенему и триметоприм/сульфаметоксазолу.

Частота встречаемости ЗТН для амоксициллин/клавулановой кислоты (группа пенициллинов) и цiproфлоксацина (группа фторхинолонов) составляла 23,8 % (95% ДИ 16,5-33,0%) и 63,4 % (95% ДИ 53,6-72,1%) исследованных штаммов соответственно.

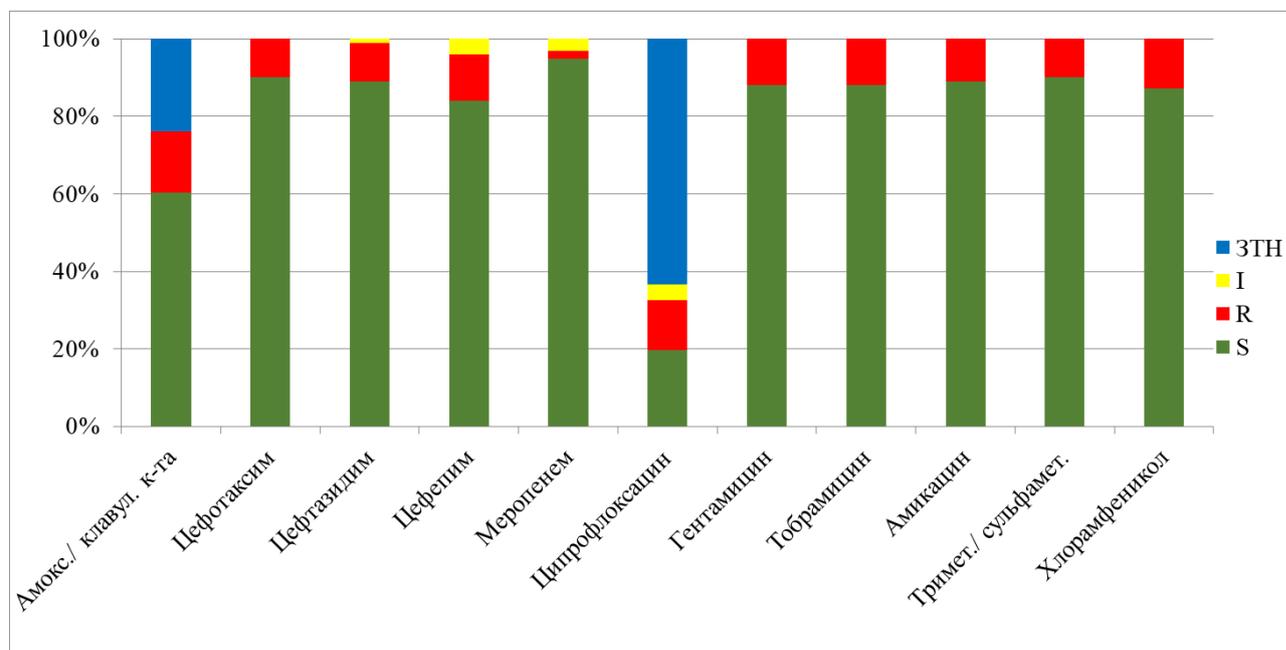


Рисунок 10 – Интерпретация результатов определения чувствительности изолятов *Klebsiella* spp. согласно EUCAST 14.0

2.1.4 Распространённость изолятов, отнесенных к категории «I» и ЗТН

Распространённость изолятов, принадлежащих категории «I», и частота встречаемости данной категории для различных АМП представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Распространённость изолятов, отнесенных к категории «I», согласно EUCAST 14.0

Наименование АМП		Доля для данного АМП от всех изолятов с результатом "I"	Распределение категории "I" по изолятам для данного АМП			Доля результата "I" от всех результатов для данного АМП
			<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.	
Цефотаксим	%	6,7	80,0	20,0	0,0	0,51
	95 % ДИ	2,7-10,7	47,9-95,4	4,6-52,0	0,0-32,0	0,2-0,8
Цефтазидим	%	44,7	64,2	34,3	1,5	3,37
	95 % ДИ	36,7-52,6	52,2-74,6	24,0-46,3	0,0-8,7	2,6-4,2
Цефепим	%	34,7	73,1	19,2	7,7	2,65
	95 % ДИ	27,0-42,3	61,0-85,1	8,5-29,9	2,5-18,7	1,9-3,4
Меропенем	%	2,7	25,0	0,0	75,0	0,62
	95 % ДИ	1,0-6,7	3,4-71,0	0,0-54,6	28,9-96,6%	0,2-1,6
Ципрофлоксацин	%	2,7	0,0	0,0	100,0	0,21
	95 % ДИ	1,0-6,7	0,0-54,6	0,0-54,6	45,4-100,0	0,0-0,4
Триметоприм/сульфаметоксозол	%	8,7	69,2	30,8	0,0	0,68
	95 % ДИ	4,2-13,2	42,0-87,6	12,3-58,0	0,0-26,6	0,3-1,0

Наиболее часто категория «I» встречалась при определении чувствительности к цефтазидиму и цефепиму (44,7% и 34,7% от всех изолятов с категорией «I»). Для остальных исследованных комбинаций АМП/микроорганизм, Распространённость данной категории была ниже и достоверно не отличалась. Наиболее часто чувствительными при увеличенной экспозиции по отношению к цефтазидиму и цефепиму являлись штаммы *E. coli* — 64,2% (95% ДИ 52,2-74,6%) и 73,1% (95% ДИ 61,0-85,1%) изолятов соответственно.

Зона технической неопределённости встречалась достоверно чаще при определении чувствительности к амоксициллину/клавулановой кислоте, чем при исследовании чувствительности к ципрофлоксацину (Таблица 10).

Таблица 10 – Распространённость изолятов, отнесенных к категории «ЗТН» согласно EUCAST 14.0

Наименование АМП		Доля для данного АМП от всех изолятов с результатом "ЗТН"	Распределение категории "ЗТН" по изолятам для данного АМП		Доля результата "ЗТН" от всех результатов в для данного АМП
			<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	
Амоксициллин/ клавулановая кислота	%	65,0	89,6	10,4	11,6
	95% ДИ	60,0-69,9	85,6- 93,5	6,5-14,4	10,2-13,0
Ципрофлоксацин	%	35,03	48,4	51,6	6,59
	95% ДИ	30,0-40,0	39,6- 57,1	42,8-60,4	5,5-7,7

По отношению к ципрофлоксацину, частота встречаемости ЗТН достоверно не различалась для *E. coli* и *Klebsiella*, при определении чувствительности к амоксициллину/клавулановой кислоте ЗТН чаще встречалась по отношению к штаммам *E. coli*.

2.2 Оценка чувствительности изолятов согласно стандарту CLSI M100-ED34

Распределение изолятов по категориям чувствительности в абсолютных значениях представлено в таблице 11.

Таблица 11 – Абсолютное количество штаммов различных категорий согласно CLSI M100-ED34

Наименование АМП	Штаммы											
	<i>E. coli</i>				<i>Salmonella</i> spp.				<i>Klebsiella</i> spp.			
	S	R	I	Всего для АМП	S	R	I	Всего для АМП	S	R	I	Всего для АМП
Пенициллины												
Ампициллин	–	–	–	–	573	92	14	679	–	–	–	–
Амоксициллин/ клавулановая кислота	931	64	207	1202	639	13	30	682	89	10	2	101
Цефалоспорины												
Цефепим	993	120	80	1193	647	11	9	667	89	7	5	101
Карбапенемы												
Меропенем	345	2	1	348	201	0	1	202	91	2	3	96
Эртапенем	842	8	4	854	475	4	1	480	–	–	–	–
Хинолоны и фторхинолоны												
Налидиксовая кислота	905	262	34	1201	–	–	–	–	84	12	5	101
Ципрофлоксацин	911	183	107	1201	–	–	–	–	82	13	6	101
Аминогликозиды												
Гентамицин	807	98	223	1128	0	0	0	675	87	9	5	101
Тобрамицин	790	64	276	1130	0	0	0	667	88	9	4	101
Амикацин	862	25	253	1140	632	8	44	684	79	9	13	101
Нитрофураны												
Нитрофурантоин	997	22	46	1065	226	260	95	581	–	–	–	–
Тетрациклины												
Тетрациклин	798	394	6	1198	536	140	4	680	96	5	0	101
Сульфаниламиды												
Триметоприм/ сульфаметоксазол	783	337	18	1138	608	66	6	680	88	13	0	101
Амфениколы												
Хлорамфеникол	1079	109	9	1197	621	54	4	679	93	4	4	101

Примечание: «–» – не определяли

2.2.1 Характеристика чувствительности изолятов *E. coli*

Распределение изолятов *E. coli* по категориям чувствительности представлено на рисунке 11.

Эффективно в отношении исследованных изолятов действовали карбапенемы (99,1% при 95% ДИ 97,4-99,8% чувствительных изолятов для меропенема и 98,6% при 95% ДИ 97,5-99,2% для эртапенема) и нитрофурантоин (93,6% при 95 % ДИ 92,0-94,9%).

Наибольшее количество резистентных изолятов выявлено по отношению к тетрациклину (32,9% при 95% ДИ 30,3-35,6%, триметоприм/сульфаметоксазолу (29,6% при 95% ДИ 27,0-32,3) и налидиксовой кислоте (21,8% при 95% ДИ 19,6-24,2%).

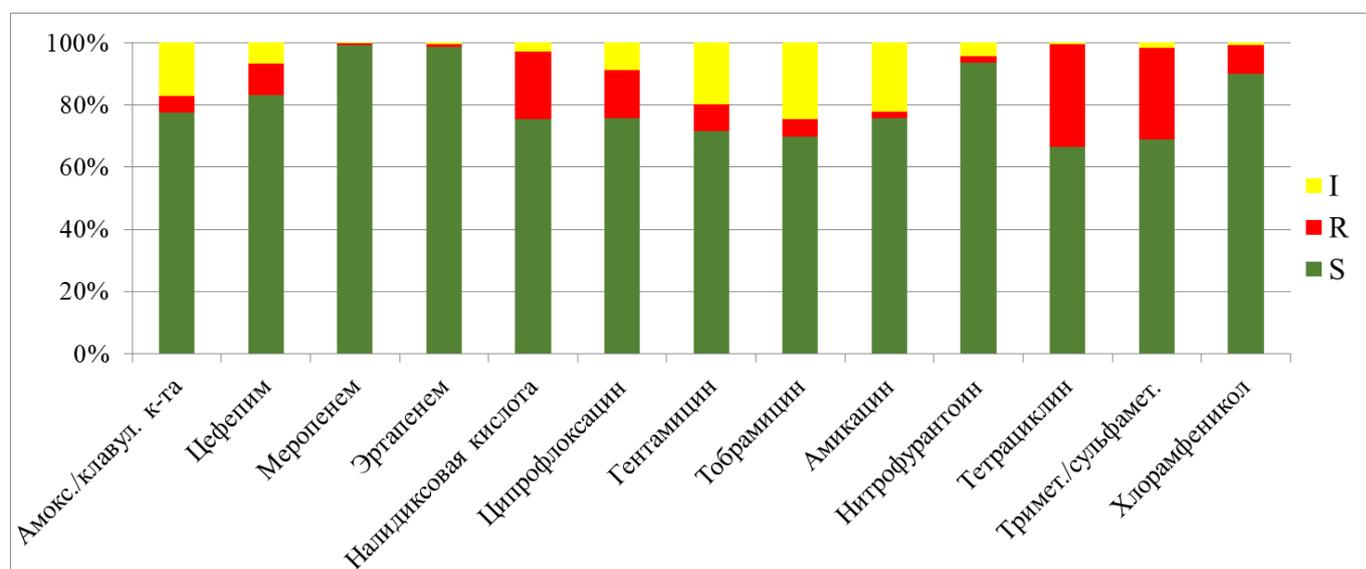


Рисунок 11 – Интерпретация результатов определения чувствительности изолятов *E. coli* согласно CLSI M100-ED34

2.2.2 Характеристика чувствительности изолятов *Salmonella* spp.

Распределение изолятов *Salmonella* по категориям чувствительности согласно CLSI M100-ED34 представлено на рисунке 12.

Эффективно в отношении исследованных изолятов действовали карбапенемы (99,5% при 95% ДИ 97,0-100,0% чувствительных изолятов для меропенема и 99,0% при 95% ДИ 97,5-99,6% для эртапенема) и цефепим (97,0% при 95 % ДИ 95,4-98,1%).

Наибольшее количество резистентных изолятов выявлено по отношению к пefфлоксацину (60,9% при 95% ДИ 56,9-64,8%), нитрофурантоину (44,7% при 95% ДИ 40,8-48,8%), и тетрациклину (20,6% при 95% ДИ 17,7-23,8%).

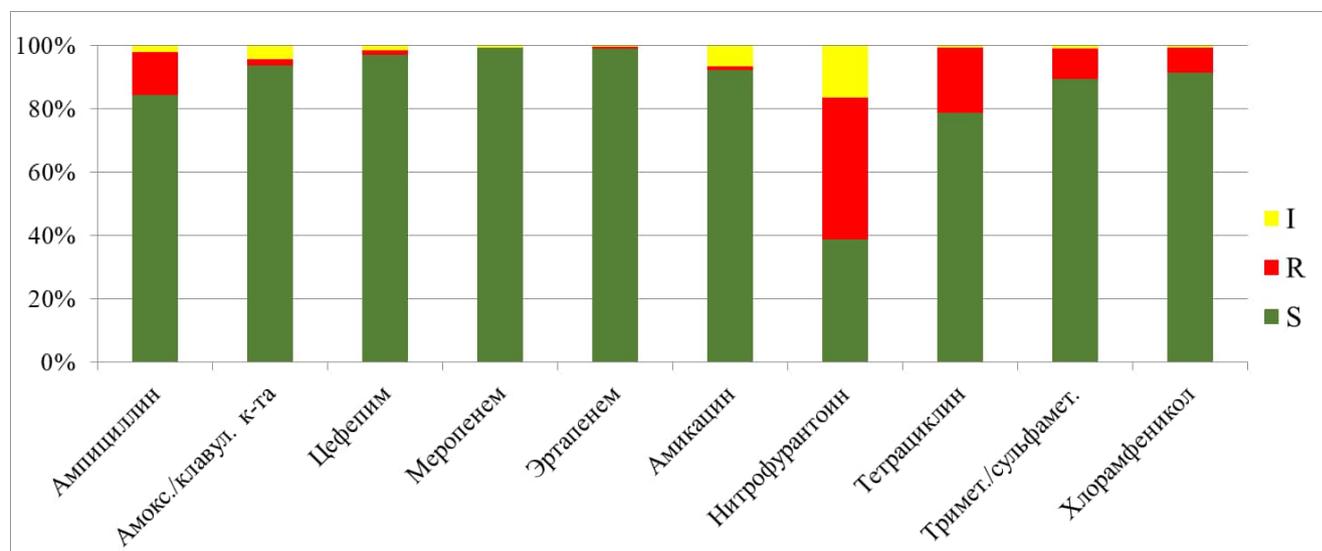


Рисунок 12 – Интерпретация результатов определения чувствительности изолятов *Salmonella* spp. согласно CLSI M100-ED34

2.2.3 Характеристика чувствительности изолятов *Klebsiella* spp.

Результаты распределения изолятов *Klebsiella* spp. по категориям чувствительности согласно CLSI M100-ED34 представлены на рисунке 13.

Высокую эффективность в отношении *Klebsiella* spp. демонстрировал меропенем (94,8% при 95% ДИ 88,1-98,1%), тетрациклин (95,0% при 95 % ДИ 88,6-98,2%) и хлорамфеникол (92,0% при 95% ДИ 84,9-96,1%).

Резистентные изоляты наиболее часто выявлялись при определении чувствительности к ципрофлоксацину (12,9% при 95% ДИ 7,5-20,9%) и налидиксовой кислоте, нитрофурантоину (69,2% при 95% ДИ 42,0-87,6%) (11,9% при 95% ДИ 6,8-19,8%) и триметоприм/сульфаметоксазолу (12,9% при 95% ДИ 7,5-20,9%).

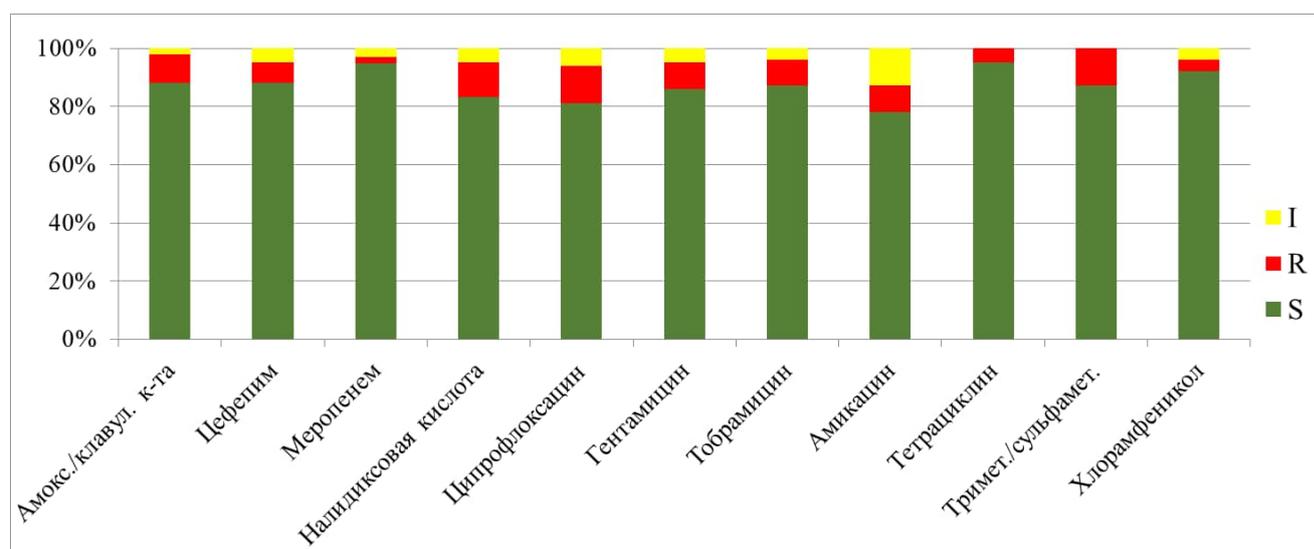


Рисунок 13 – Интерпретация результатов определения чувствительности изолятов *Klebsiella* spp. согласно CLSI M100-ED34

2.2.4 Распространённость изолятов, отнесенных к категории чувствительных при увеличенной экспозиции для разных АМП

Распределение изолятов по категориям чувствительности в абсолютных значениях представлено в таблице 12.

Таблица 12 – Распространённость изолятов, отнесенных к категории «I» согласно CLSI M100-ED34

Наименование АМП		Доля для данного АМП от всех изолятов с результатом "I", %	Распределение категории "I" по изолятам для данного АМП, %			Доля результата "I" от всех результатов в для данного АМП, %
			<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.	
Ампициллин	%	0,9	0,0	100,0	0,0	0,7
	95% ДИ	0,5-1,5	0-25,1	74,8-100	0-25,1	0,4-1,2
Амоксициллин/ клавулановая кислота	%	15,7	86,6	12,6	0,8	12,0
	95% ДИ	13,9-17,6	81,7-90,4	8,9-17,4	0,03-3,2	10,7-13,5
Цефепим	%	6,2	85,1	9,6	5,3	4,8
	95% ДИ	5,0-7,5	76,4-91,0	4,9-17,4	2,0-12,1	3,9-5,8
Меропенем	%	0,3	20,0	20,0	60,0	0,8
	95% ДИ	0,1-0,8	2,0-64,0	2,0-64,0	22,9-88,4	0,3-1,8

Продолжение таблицы 12

Эртапенем	%	0,3	80,0	20,0	0,0	0,4
	95% ДИ	0,1-0,8	36,0-98,0	2,0-64,0	0,0-48,9	0,1-0,9
Налидиксовая кислота	%	2,6	87,2	0,0	12,8	2,0
	95% ДИ	1,9-3,5	72,8-94,9	0,0-10,7	5,1-21,2	1,4-2,7
Ципрофлоксацин	%	7,4	94,7	0,0	5,3	8,7
	95% ДИ	6,2-8,8	88,7-97,8	0,0-4,0	2,2-11,3	7,3-10,3
Гентамицин	%	15,0	97,8	0,0	2,2	12,0
	95% ДИ	13,2-16,8	94,8-99,2	0,0-2,0	0,8-5,2	10,6-13,5
Тобрамицин	%	18,4	98,6	0,0	1,4	14,8
	95% ДИ	16,5-20,4	96,2-99,6	0,0-1,6	0,0-3,7	13,2-16,4
Амикацин	%	20,3	81,6	14,2	4,2	16,1
	95% ДИ	18,4-22,4	76,9-85,6	10,7-18,5	2,4-7,1	14,5-17,8
Нитрофурантоин	%	9,2	32,6	67,4	0,0	8,5
	95% ДИ	7,9-10,8	25,4-40,7	59,2-74,6	0,0-3,2	7,2-9,9
Тетрациклин	%	0,7	60,0	40,0	0,0	0,5
	95% ДИ	0,3-1,2	31,2-83,3	16,7-68,8	0,0-32,0	0,3-0,9
Триметоприм/ сульфаметоксазол	%	1,6	75,0	25,0	0,0	1,3
	95% ДИ	1,0-2,3	54,8-88,3	11,7-45,2	0,0-16,3	0,8-1,9
Хлорамфеникол	%	1,1	52,9	23,5	23,5	0,9
	95% ДИ	0,7-1,8	31,0-73,8	9,0-47,8	9,0-47,8	0,5-1,4

Наиболее часто категория «I» встречалась при определении чувствительности к аминогликозидам: гентамицину — 15,0 % (95% ДИ 13,2-16,8%), тобрамицину — 18,4% (95% ДИ 16,5-20,4%), амикацину — 20,3% (95% ДИ 18,4-22,4%) соответственно. Также, часто определялись штаммы категории «I» при исследовании чувствительности к амоксициллину/клавулановой кислоте — 15,7% (95% ДИ 18,4-22,4%), ципрофлоксацину — 7,4% (95% ДИ 6,2-8,8%) и нитрофурантоину — 9,2% (95% ДИ 7,9-10,8%). Наиболее часто чувствительными при увеличенной экспозиции по отношению к вышеуказанным АМП являлись

штаммы *E. coli*, в отношении нитрофурантоина чаще встречались штаммы *Salmonella*.

2.3 Заключение по главе 2

В результате проведенного исследования установлено:

1. Количество исследований с результатом «чувствительный при увеличенной экспозиции» или ЗТН зависит от применяемого стандарта интерпретации. В стандарте CLSI M100-ED34 отсутствует ЗТН, но критерии интерпретации предполагают наличие категории «чувствительный при увеличенной экспозиции» для аминогликозидов и нитрофурантоина (Таблицы 13, 14).

2. Согласно стандарту EUCAST 14.0, среди тестированных АМП, наиболее часто требуется количественное определение чувствительности к амоксициллину/клавулановой кислоте, цефалоспорином (цефотаксим, цефтазидим, цефепим), ципрофлоксацину и к триметоприм/сульфаметоксазолу (Таблица 13).

Таблица 13 – Частота встречаемости категории «I» И ЗТН согласно EUCAST 14.0

Частота встречаемости	Микроорганизмы/АМП		
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.
<1 %	цефотаксим, меропенем, триметоприм/сульфаметоксазол	цефотаксим, триметоприм/сульфаметоксазол	цефтазидим
1-10%	цефтазидим, цефепим, ципрофлоксацин	цефтазидим, цефепим	цефепим, меропенем
10-50%	амоксициллин/клавулановая кислота	—	амоксициллин/клавулановая кислота
>50%	—	—	ципрофлоксацин

Примечание: «—» – не встречались

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), что показано в таблице 14.

Таблица 14 – Частота встречаемости категории «I» согласно CLSI M100-ED34

Частота встречаемости	Микроорганизмы/АМП		
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Klebsiella spp.</i>
<1 %	хлорамфеникол, эртапенем, меропенем, тетрациклин	хлорамфеникол, эртапенем, меропенем, триметоприм/сульфаметоксазол, тетрациклин	-
1-10%	ципрофлоксацин, нитрофурантоин, цефепим, налидиксовая кислота, триметоприм/сульфаметоксазол	амикацин, амоксициллин/клавулановая кислота, ампициллин, цефепим	амоксициллин/клавулановая кислота, хлорамфеникол, ципрофлоксацин, цефепим, гентамицин, меропенем, налидиксовая кислота, тобрамицин
10-50%	амикацин, амоксициллин/клавулановая кислота, гентамицин, тобрамицин	нитрофурантоин	амикацин

Примечание: «←» – не встречались

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-ПОЛОСОК ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ МПК АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПЛОТНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ

3.1 Устройство и принцип действия тест-полосок Е-теста

Особенность метода градиентной диффузии (Е-тест) состоит в том, что, за счёт максимально близкого расположения зоны учёта результатов к носителю АМП (тест-полоске), особенности диффузионного процесса не оказывают значительного влияния на концентрацию АМП в плотной питательной среде. Ингибирование роста культуры исследуемого штамма происходит только в той области, где концентрация АМП, диффундирующего из носителя, превышает значение МПК исследуемого АМП для данного микроорганизма.

Для метода градиентной диффузии используют тест-полоски, на лицевой стороне которых располагается шкала со значениями концентраций АМП (Рисунок 14, А). На противоположную сторону нанесен градиент концентраций антимикробного препарата (Рисунок 14, Б). Таким образом, тест-полоска представляет из себя подложку, на которую наносится раствор АМП и типографское изображение. Диффузия АМП с тест-полоски в плотную питательную среду приводит к ингибированию роста исследуемого штамма микроорганизма в области, где концентрация АМП, диффундирующего из полоски, превышает значение МПК.

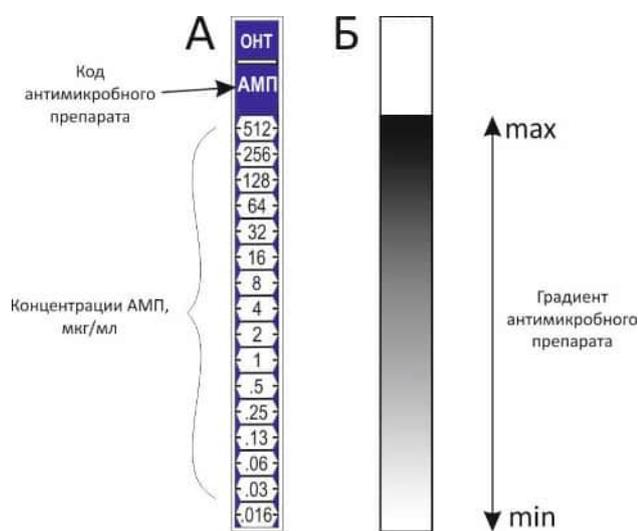


Рисунок 14 — Схема тест-полоски Е-теста

3.2 Краткое техническое задание на разработку

Требования к изделию, которые необходимо учитывать при разработке, были сформулированы на основании:

- изучения нормативной документации [3, 34, 91];
- изучения характеристик и опыта применения аналогичных тест-систем импортного производства (Biomerieux, Oxoid, Liofilchem, HiMedia).

Исходя из сформулированных требований, в техническое задание были включены следующие пункты:

- выбор материала подложки тест-полосок;
- разработка алгоритма расчёта концентрации АМП, наносимого на подложку;
- разработка методики нанесения АМП на подложку и устройства, предназначенного для выполнения этой задачи.

3.3 Выбор материала подложки изделия

Согласно классификации М. М. Дубинина [47] все адсорбенты, в зависимости от наличия и диаметра пор, подразделяются на микропористые, мезопористые, и непористые (имеющие только внешнюю адсорбирующую поверхность). В настоящее время в качестве подложки в импортных изделиях (E-test, МІС-полоски) производители используют две группы материалов: макропористые (далее – пористые) и непористые, каждая из которых обладает своими достоинствами и недостатками.

Способность материала смачиваться водными растворами и впитывать их, обусловлена двумя его свойствами – гидрофильностью и развитостью поверхности [24]. Гидрофильность определяется полярностью молекул вещества, из которого изготовлен данный материал. Чем больше полярных групп находится в составе материала, тем более он гидрофилен. Если материал состоит из нескольких веществ, его гидрофильность определяется относительным содержанием и гидрофильностью каждого составляющего этот материал вещества. Развитость поверхности можно определить как площадь доступной для

взаимодействия с внешней средой поверхности материала в единице объёма этого материала. Материал с более развитой поверхностью, при прочих равных параметрах, способен к впитыванию большего количества жидкости.

В качестве подложки для нанесения АМП лучше всего подходят гидрофильные материалы, что обусловлено следующими причинами:

1. Подложка должна иметь достаточную адгезию к поверхности агара, являющегося гелем на водной основе. При недостаточной адгезии возможно образование воздушных пузырей под тест-полоской, а также её отклеивание при инкубации чашки Петри кверху дном.

2. Большинство АМП растворяются в воде или водных растворах. Чтобы раствор при нанесении не перемещался с определённого участка тест-полоски под воздействием самых незначительных колебаний поверхности подложки, её поверхность должна хорошо смачиваться водными растворами.

3. На гидрофобные материалы невозможно наносить типографское изображение; требуется предварительная активация поверхности либо наклеивание другого материала с нанесённым изображением (каширование).

Преимуществами пористых материалов являются: невысокая стоимость (для фильтровальной бумаги), возможность использования доступной технологии непрерывного нанесения, а также снижение риска образования воздушных пузырей при аппликации тест-полоски. Основным недостатком пористых материалов является деформация при набухании волокон подложки (для фильтровальной бумаги) вследствие впитывания воды из питательной среды.

К преимуществам непористых материалов (плёнок) относятся: быстрая адгезия к поверхности питательной среды, происходящая в момент аппликации полоски, а также относительная химическая инертность, обусловленная более низким содержанием вспомогательных технологических составов. Недостатками таких материалов являются более высокая цена конечного изделия, обусловленная стоимостью технологии импрегнирования, а также возможное образование воздушных пузырей под поверхностью тест-полоски при аппликации на агар [141], способное приводить к неравномерному прилеганию тест-полоски с

АМП к поверхности питательной среды. При использовании полимерных плёнок, следует учитывать возможное взаимодействие органических растворителей (например, диметилсульфоксида) с данным материалом.

Таким образом, материалом подложки изделия может служить либо гидрофильная плёнка (непористый гидрофильный материал), либо гидрофильный материал с развитой поверхностью (пористые волокнистые материалы типа бумаги, или различные мембраны).

К наиболее доступным и широко применяемым в производстве тест-систем пористым подложкам (гидрофильным материалам с развитой поверхностью) относятся фильтровальная бумага (или картон) и фильтровальные мембраны с различным диаметром пор.

Непористыми подложками могут служить плёнки из различных полимеров. К наиболее распространённым и доступным полимерам, служащим сырьём для изготовления плёнок, относятся:

- поливинилхлорид (PVC);
- полистирол (PS);
- полипропилен (PP);
- полиэтилентерефталат (PET);
- полиамид (PA);
- полиэтилен (PE).

Совокупность требований к материалу подложки изделия отображена в таблице 15.

Таблица 15 — Требования к материалу подложки изделия

Параметр	Критерии приемлемости
Механическая прочность	Материал должен обеспечивать прочность изделия на разрыв, достаточную для извлечения изделия из первичной упаковки и его нанесение на поверхность плотной питательной среды без возникновения дефектов, которые могли бы повлиять на диффузию АМП из подложки в плотную питательную среду

Влагостойкость	Материал подложки должен сохранять целостность при нахождении на поверхности плотной питательной среды в течение всего периода инкубации исследуемой культуры микроорганизмов. Деформация материала при нахождении на поверхности плотной питательной среды должна отсутствовать, либо не оказывать значимого влияния на адгезию изделия к поверхности агара
Термическая устойчивость	Материал должен сохранять целостность в температурном интервале от $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $50\text{ }^{\circ}\text{C}$
Эластичность	Материал должен быть достаточно эластичным для обеспечения равномерной адгезии изделия к поверхности агара
Стойкость к методам стерилизации	Материал не должен изменять функциональные характеристики при обработке радиационным методом стерилизации в дозах, применяемых для аналогичных изделий
Взаимодействие с исследуемой культурой микроорганизмов	Материал подложки, его производные, потенциально образующиеся при помещении материала в водную среду, остатки технологических составов, используемых при его производстве, не должны прямо или косвенно оказывать воздействие на жизнедеятельность микроорганизмов и их чувствительность к АМП. Материал не должен разрушаться вследствие метаболизма исследуемой культуры микроорганизмов в течение всего периода инкубации
Взаимодействие с АМП	Материал подложки, а также остатки технологических составов, используемых при его производстве, не должны вступать в химическую реакцию с АМП или с веществом, в котором растворяется АМП при нанесении на подложку и не должны препятствовать диффузии АМП в питательную среду
Расход АМП	Потери АМП при производстве изделия и его использовании должны быть минимальны

Возможность резки в размер механическим режущим инструментом	Резка материала не должна требовать специфических инструментов и оборудования. Материал при нарезании не должен давать трещины, замятия и прочие механические дефекты
Возможность нанесения типографского изображения	Материал изделия должен позволять нанесение изображения шкалы концентраций и наименования АМП. Изображение должно хорошо читаться при расстоянии 30 см от глаз наблюдателя и сохраняться в неизменном виде в течение всего периода инкубации
Стоимость и доступность материала	Материал должен быть доступен на территории РФ, при этом его цена должна обеспечивать себестоимость изделия не выше, чем у импортных изделий аналогичного назначения
Утилизация	Не должна отличаться от утилизации медицинских отходов класса "Б"

Исходя из требований к материалам подложки, представленным в таблице 15, был составлен перечень требований, соответствие которым можно проверить, основываясь на известных характеристиках материала, без проведения эксперимента. Такие характеристики вышеперечисленных пористых и непористых материалов приведены в таблицах 14, 15. Путём анализа данных характеристик были отобраны материалы для дальнейшего экспериментального изучения.

На основании данных, приведённых в таблицах 16-17, для экспериментального исследования на пригодность в качестве подложки были выбраны следующие пористые материалы:

- картон фильтровальный плотностью 270 г/м² (марка КФБ-270);
- бумага фильтровальная плотностью 160 г/м² (марка ЛФБ-160).

Нитроцеллюлозная мембрана не рассматривалась в качестве материала вследствие недостаточной механической прочности, низкой химической и термической стойкости, а также невозможности нанесения типографского изображения.

Таблица 16 — Сравнительная характеристика рассматриваемых в качестве подложки тест-полосок пористых материалов

Параметр	Картон фильтровальный 270 г/м ²	Бумага фильтровальная 160 г/м ²	Мембрана нитроцеллюлозная, диаметр пор 0,45 мкм	Мембрана нейлоновая, диаметр пор 0,45 мкм	Критерий приемлемости
Термическая стойкость	До 120 °С*	До 120 °С*	До 40 °С*	От –30 °С до 180 °С	От –20 °С до 45 °С
Механическая прочность	++	++	+	+++	++
Влагостойкость	+	+	++	+++	+
Эластичность	+	++	+++	++	+
Взаимодействие с исследуемой культурой микроорганизмов	–	–	–	–	–
Взаимодействие с АМП	–	–	–	–	–
Взаимодействие с растворителями АМП	–	–	Низкая устойчивость к кислым и щелочным растворам	–	–
Возможность нанесения типографского изображения	++	+++	–	–	+
Доступность материала	+++	+++	+	+	+
Утилизация после применения	Отходы класса «Б»	Отходы класса «Б»	Отходы класса «Б»	Отходы класса «Б»	Отходы класса «Б»

Примечание: «+» — степень выраженности признака: «+» — низкая, «++» — средняя, «+++» — максимальная, «–» — отсутствует, * — нижний температурный предел эксплуатации для данных материалов не определен

Таблица 17 — Сравнительная характеристика рассматриваемых в качестве подложки тест-полосок непористых материалов

Параметр	Материал плёнки						Критерий приемлемости
	PS	PE	PP	PA	PET	PVC	
Термическая стойкость	От –40 °С до 60 °С	От – 0 °С до 60 °С	От –30 °С до 120 °С	От –30 °С до 180 °С	От –60 °С до 120 °С	От –15 °С до 66 °С	От –20 °С до 45 °С
Механическая прочность	++	++	++	+++	+++	++	++
Влагостойкость	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Эластичность	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Смачиваемость	++	+	+	++	++	+++	++
Взаимодействие с исследуемой культурой микроорганизмов	–	–	–	–	–	–	–
Взаимодействие с АМП	–	–	–	–	–	–	–
Взаимодействие с растворителями АМП	Низкая устойчивость к кислым и щелочным растворам, органическим растворителям	–	–	–	–	Низкая устойчивость к кислым и щелочным растворам	–
Возможность нанесения типографского изображения	+	–	–	–	++	+++	+
Доступность материала	++	+++	+++	+	+++	+++	+
Утилизация после применения	Отход класса «Б»	Отход класса «Б»	Отход класса «Б»	Отход класса «Б»	Отход класса «Б»	Отход класса «Б»	Отход класса «Б»

Примечание: «+» — степень выраженности признака: «+» — низкая, «++» — средняя, «+++» — максимальная, «–» — отсутствует

Такой вариант материала решено было проверить потому, что печать на фильтровальном картоне значительно сложнее печати на самоклеящейся плёнке, и данное решение упрощает процесс изготовления. Выбранные варианты подложки проверяли на адгезивные свойства по отношению к поверхности агара в чашке Петри. Полученная подложка с типографским изображением нарезалась на тест-полоски, как показано на рисунке 16.

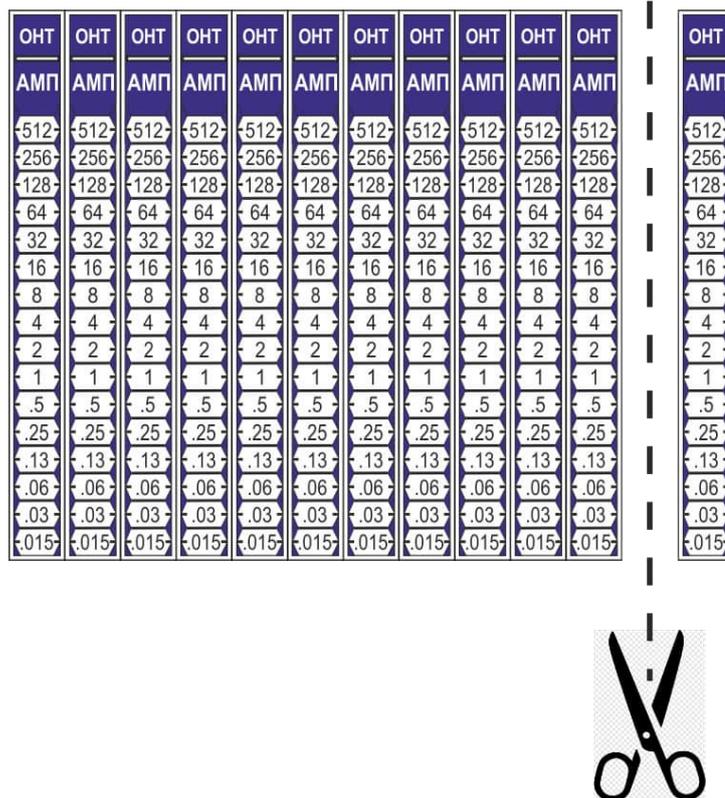


Рисунок 16 — Нарезание подложки на тест-полоски

Тест-полоски каждого варианта помещали на поверхность питательной среды в чашку Петри (две полоски на чашку, три чашки на каждый вариант подложки), аналогично определению МПК методом градиентной диффузии. Адгезию полосок к поверхности питательной среды оценивали сразу после аппликации и после периода инкубации в течение 18 ч при 35 °С. Результаты сравнительного анализа адгезивных свойств подложек представлены в таблице 18. Наилучшую адгезию демонстрировали полоски, изготовленные из PET-плёнки. Сразу после аппликации полоска надёжно прикреплялась к поверхности

агара и не отклеивалась после переворачивания чашки кверху дном при инкубации.

Таблица 18 — Сравнение адгезивных свойств различных вариантов подложек

Параметр	Картон фильтровальный 270 г/м ²	Картон фильтровальный 270 г/м ² с наклеенной шкалой	Бумага фильтровальная 160 г/м ²	Плѐнка PET
Первоначальная адгезия	+	+	++	+++
Необходимость разглаживания полоски пинцетом после аппликации	+	+	+	—
Деформация тест-полоски вследствие набухания	+	++	—	—

Примечание: «+» — степень выраженности признака: «+» — низкая, «++» — средняя, «+++» — максимальная, «—» — отсутствует

Деформация отсутствовала вследствие того, что данный материал не впитывает воду. Тест-полоски, изготовленные из картона фильтровального плотностью 270 г/м², требовали тщательного раглаживания по поверхности питательной среды, как и полоски из этого же материала с наклеенной шкалой. Тест-полоски из картона с наклеенной шкалой сильно деформировались вследствие набухания, отклеиваясь от поверхности агара. Такой же эффект присутствовал, в меньшей степени, и у тест-полосок из картона без наклеенной шкалы. Полоски из фильтровальной бумаги плотностью 160 г/м² демонстрировали хорошую первоначальную адгезию, требовали минимального разглаживания после аппликации, не отклеивались и не деформировались в течение всего периода инкубации.

Для дальнейших экспериментов в качестве материала подложки была выбрана фильтровальная бумага плотностью 160 г/м². Плѐнка PET обладает

лучшими адгезивными свойствами, но процесс нанесения АМП на данный материал хуже подвергается автоматизации (вследствие отсутствия впитывающих свойств, технология непрерывного нанесения не подходит). Поэтому, изготовление тест-полосок из РЕТ-плёнки является предметом дальнейшего изучения.

3.4 Разработка методики расчёта концентрации АМП и способа нанесения АМП на пористую подложку

Метод градиентной диффузии основан на диффузии АМП из носителя, содержащего ряд концентраций данного вещества, в плотную питательную среду. Диффузия — это процесс взаимопроникновения молекул веществ в результате их теплового движения. Параметры диффузии описываются законами Фика.

Одной из первых работ, посвящённых теории диффузии в агар, была статья Соорег К.Е. [77]. В данной работе авторами предложена формула, являющаяся следствием закона Фика, определяющая соотношение изначальной концентрации вещества в источнике диффузии и концентрации на определённом расстоянии от него по прошествию времени:

$$\log c_0 - \log c_t = \frac{x^2}{4Dt} \quad (1)$$

где c_0 — изначальная концентрация вещества в источнике диффузии,
 c_t — концентрация вещества на расстоянии x от источника по прошествию времени t ,

D — коэффициент диффузии вещества в среде.

Из формулы (1) следует, что при $x = 0$, $c_0 = c_t$. Таким образом, при минимальном расстоянии от источника диффузии, концентрация АМП в среде будет стремиться к концентрации АМП в носителе (источнике диффузии). В работе М. L. Delignette-MuUer [83] авторами предложено простое соотношение, позволяющее рассчитать концентрацию АМП в источнике диффузии (бумажном диске толщиной 1 мм):

$$C_0 = \frac{m_0}{e \pi \frac{d^2}{4}} \quad (2)$$

где C_0 — концентрация АМП в диске,
 m_0 — нагрузка АМП на диск,
 e и π — математические константы,
 d — диаметр диска.

Поскольку выражение $\pi \frac{d^2}{4}$ соответствует объёму V носителя (бумажного диска толщиной 1 мм), применительно к носителю в форме полоски, т.е. параллелипипеда, данная формула принимает вид:

$$C_0 = \frac{m_0}{exyz} \quad (3)$$

где x , y , z — длина, ширина и высота полоски.

Соответственно, массу АМП в носителе, имеющем форму полосы, можно вычислить следующим образом:

$$m_0 = C_0 \times e \times xyz \quad (4)$$

или

$$m_0 = C_0 \times e \times V \quad (5)$$

Из формулы (1) было установлено, что при минимальном расстоянии от источника диффузии, концентрация АМП в среде будет стремиться к концентрации АМП в носителе ($C = C_0$). Следовательно, для того чтобы получить требуемую концентрацию АМП (C) в плотной питательной среде в непосредственной близости от носителя, на носитель нужно нанести АМП в количестве m_0 .

Например, требуется изготовить тест-полоски с амикацином с максимальной концентрацией 512 мкг/мл (0,512 мкг/мкл). При размере участка тест-полоски с одной концентрацией (как представлено на рисунке 15), равном 6×3 мм, расположенном на бумаге толщиной 0,5 мм, подставив значения в формулу (2), получим $m_0 = 0,512 \times 2,71828 \times 6 \times 3 \times 0,5 = 12,525$ мкг. Это означает, что на участок тест-полоски, в непосредственной близости от которого в плотной питательной среде должна находиться концентрация АМП, равная 512 мкг/мл, необходимо нанести 12,525 мкг АМП (в данном примере – амикацина).

Для вычисления концентрации раствора, который следует нанести, требуется значение объёма жидкости, которым будет пропитываться носитель. Обозначим этот объём $V_{\text{нанесения}}$. Данный объём определяется экспериментально следующим образом: при нанесении жидкости в этом объёме на носитель, она равномерно пропитывает участок нанесения, доходя до границ соседних участков, но не пересекая их. В примере с использованной в данной работе бумагой (бумага фильтровальная 160 г/м²), объём нанесения составил 1,8 мкл.

Определение концентрации антимикробного препарата ($C_{1\text{-го разведения}}$), сорбируемого на первой полосе разведения (участок тест-полоски с максимальной концентрацией АМП), осуществляли по формуле (6):

$$C_{1\text{-го разведения, мг/мл}} = \frac{m_{\text{АМП, мг}}}{V_{\text{нанесения, мл}}} \quad (6)$$

Подставив значения $m_{\text{АМП}}$ и $V_{\text{нанесения}}$ в формулу (6), получим $C_{1\text{-го разведения}} = 6,9$ мг/мл. Таким образом, концентрация амикацина в растворе для нанесения на участок с максимальной концентрацией составляет 6,9 мг/мл.

Если подставить значения переменных из формул (3), (4), (5) в формулу (6), получим обобщающую формулу (7), удобную для практического применения:

$$C_{1\text{-го разведения, мг/мл}} = \frac{C_0 \times e \times xuz}{V_{\text{нанесения, мл}}} \quad (7)$$

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

e — математическая константа,

xuz — длина, ширина и высота участка нанесения одной концентрации на подложке,

$V_{\text{нанесения}}$ — объём жидкости, наносимый на участок полоски с одной концентрацией (определяется экспериментально в зависимости от впитывающих свойств подложки).

3.5 Приготовление раствора АМП и нанесение на подложку

Готовили раствор АМП в концентрации, вычисленной согласно формуле (3). В приведённом выше примере — это раствор амикацина в концентрации 6,9 мг/мл. Затем готовили ряд серийных двукратных разведений в количестве, равном требуемому количеству концентраций на тест-полоске (16 концентраций).

Приготовленные растворы АМП наносили на сеточную сторону подложки таким образом, что первое разведение наносилось с сеточной стороны подложки напротив обозначения с максимальной концентрацией, второе разведение — напротив обозначения второй концентрации (в порядке убывания) и т. д. Для нанесения использовался механический дозатор переменного объёма с диапазоном дозирования 1-10 мкл.

После нанесения растворов АМП импрегнированные полосы сушили в сушильном шкафу при 40 °С в течение 40 мин. Высушенные полосы затем нарезались в боксе абактериальной воздушной среды на тест-полоски и фасовались в стерильные флаконы ёмкостью 100 мл, содержащие осушитель (индикаторный силикагель). Флаконы герметично укупоривали стерильными резиновыми пробками и завальцовывали алюминиевыми колпачками. Хранили тест-полоски при температуре 2-8 °С.

3.6 Разработка устройства для нанесения АМП на тест-полоски

В ходе изготовления тест-полосок было выявлено, что наиболее трудоёмким технологическим процессом является нанесение АМП на подложку механическим дозатором, поэтому было принято решение разработать лабораторную установку, способную значительно ускорить и стандартизовать данный процесс.

Среди изготавливаемых в настоящее время медицинских изделий наиболее близкими по устройству к Е-тестам являются тест-полоски для проведения иммунохроматографических тестов. Они представляют собой подложку, обычно изготовленную из нитроцеллюлозной мембраны, с нанесёнными специфическими компонентами (антигенами или антителами) и помещённую в какой-либо ложемент.

Наиболее близким и выбранным за прототип изделием является устройство, применяющееся для нанесения реагентов на мембрану при изготовлении иммунохроматографических тестов (автоматический диспенсер для нанесения реагентов на иммунохроматографические мембраны, например, устройство Automated Lateral Flow Reagent Dispenser (ALFRD), производства ClaremontBio). Устройство состоит из двух основных узлов:

1. Блок перемещения подложки относительно капилляров — стол с дозирующей головкой, перемещающейся параллельно поверхности стола при помощи электропривода.
2. Блок подачи раствора в капилляры — шприцевая помпа, посредством капилляров соединённая с дозирующей головкой.

Внешний вид описываемого устройства представлен на рисунке 17.

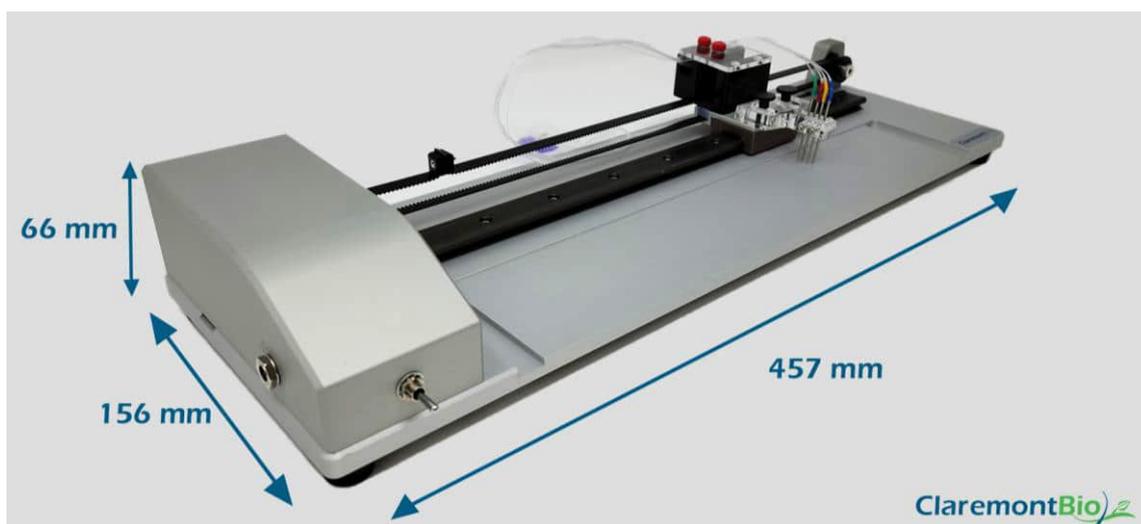


Рисунок 17 — Пример устройства для нанесения растворов на иммунохроматографическую мембрану

Данное изделие используется для нанесения реагентов на мембрану, являющуюся основным компонентом иммунохроматографических тест-систем, и имеет от 2 до 4 каналов дозирования. Тест-полоски с АМП содержат 16 концентраций, следовательно, использовать данное устройство для их изготовления не представляется возможным.

Сущность разработанной для изготовления тест-полосок Е-теста лабораторной установки сводится к следующему. Установка представляет собой устройство, состоящее из блока перемещения подложки относительно капилляров

и блока подачи раствора в капилляры. Блок подачи раствора 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, а блок перемещения подложки выполнен в виде стола с парой обрезиненных валиков, приводимых в движение электроприводом. Использование 16-канальной шприцевой помпы с роликовой подачей позволяет применять устройство с целью изготовления тест-полосок на подложке пористого типа толщиной от 0,2 мм до 1,0 мм, выполненной в виде полосы или рулона.

Отличительные особенности разработанного устройства заключаются в следующем:

— устройство позволяет выполнять непрерывное равномерное распределение раствора АМП вдоль подложки, что повышает однородность градиента АМП на производимых тест-полосках;

— регулировка наклона и высоты расположения дозирующей головки, а также использование гибких наконечников, позволяет подбирать оптимальные параметры нанесения для различных типов подложки;

— за счёт использования роликового механизма подачи устройство позволяет выполнять сорбцию раствора АМП на подложку, нарезанную в виде рулона;

— устройство имеет регулировки скорости подачи раствора и подачи подложки, обеспечивающие возможность настройки параметров нанесения под характеристики используемой подложки.

Сущность устройства установки поясняется чертежами, которые приведены в Приложении 1.1-1.5. Работа с устройством производилась следующим образом: шприцы, содержащие 16 концентраций растворов АМП, заправляли в шприцевую помпу (Приложение 1.4, 1). Подложку для нанесения АМП помещали на стол роликовой подачи (Приложение 1.4, 2), между направляющими (Приложение 1.5, 5) как показано на рисунке 18.

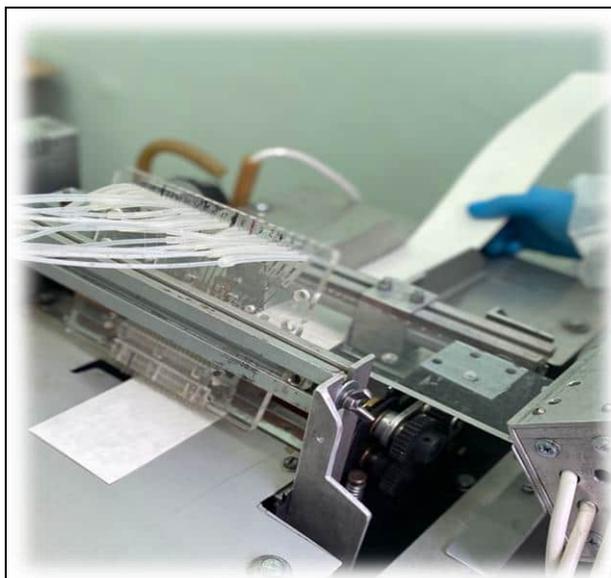


Рисунок 18 — Помещение подложки в роликую подачу

Включали роликую подачу, при этом обрезающие валики (Приложение 1.5, 3), вращаемые электроприводом (Приложение 1.5, 4), перемещали подложку. Добивались расположения головного конца подложки (Приложение 1.4, 3) под наконечниками дозирующей головки. Затем, одновременно производили включение шприцевой помпы и роликую подачи. После прохождения подложки, помпу и роликую подачу выключали.

Настройку устройства под применяемую подложку осуществляли при помощи пультов управления: регулировкой скорости роликую подачи, которая показана на рисунке 19, и шприцевой помпы, представленной на рисунке 20. Соотношение этих скоростей задавалось таким образом, чтобы на участок нанесения, который изображен на рисунке 15, при подаче раствора приходился объём, ранее определённый экспериментально (при использовании в качестве подложки фильтровальной бумаги плотностью 160 г/м^2 , наносимый на подложку объём равнялся 3 мкл на 1 см). Соотношение объёмной скорости подачи раствора и линейной скорости подачи подложки составляло 3 мкл/см.



Рисунок 19 — Пульт управления роликовой подачей, назначение органов управления

Примечание: 1 — подъем планки помпы; 2 — роликовая подача; 3 — управление роликовой подачей (подать подложку влево/вправо); 4 — индикатор напряжения (значение напряжения определяет скорость подачи подложки); 5 — пуск, включение/выключение устройства



Рисунок 20 — Пульт управления шприцевой помпой, назначение органов управления

Примечание: 1 — направление движения шприцевой помпы: вперед/назад; 2 — переключатель скорости движения шприцевой помпы; 3 — точная и грубая регулировки скорости движения шприцевой помпы; 4 — включение привода шприцевой помпы; 5 — разблокировка блока управления шаговым двигателем

3.7 Изготовление тест-полосок

С помощью собранной лабораторной установки были изготовлены тест-полоски на основе подложки из фильтровальной бумаги плотностью 160 г/м². Перечень АМП, которые были нанесены на тест-полоски, сформирован таким образом, чтобы в нём максимально были представлены используемые в

настоящее время фармакологические группы АМП [9, 10, 18, 20, 21, 39, 53, 55]. Список и параметры изготовленных тест-полосок представлены в таблице 19.

Таблица 19 — Характеристика изготовленных тест-полосок

№ 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	
4	Ванкомицин	0,016 – 512	Гликопептиды
5	Имипинем	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	Левофлоксацин	0,008 – 256	Фторхинолоны
22	Ципрофлоксацин	0,004 – 128	

3.8 Заключение по главе 3

Результаты исследования показали, что наиболее подходящий пористый материал для изготовления тест-полосок - это однокомпонентная подложка из фильтровальной бумаги марки ЛФБ-160. Двухкомпонентные подложки (с наклеенной шкалой) за счёт разности капиллярных свойств материалов обладают свойством деформации при нанесении на поверхность плотной питательной среды. Тест-полоски из фильтровального картона, за счёт его большей толщины и

плотности, хуже прилегают к поверхности агара. В качестве подложки из невпитывающего материала, по совокупности свойств (адгезия к поверхности агара, нанесение типографского изображения, прочность и инертность материала) наиболее перспективным представляется использование плёнки из полиэтилентерефталата (PET). Непрерывное нанесение АМП на пористую подложку можно осуществлять, применяя комбинацию шприцевой помпы и роликовой подачи. Установлена зависимость в виде формулы, связывающей концентрацию АМП в наносимом на подложку растворе, толщину подложки, размер участка нанесения раствора с одной концентрацией и впитывающие свойства подложки, от которых зависит объём наносимого раствора.

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК РАЗРАБОТАННЫХ ТЕСТ-ПОЛОСОК

4.1 Планирование исследования

Изготовленные тест-полоски проверяли по функциональным характеристикам, которые представлены в таблице 20, на эталонных штаммах и клинических изолятах.

Таблица 20 — Функциональные характеристики разработанных тест-полосок

Показатели	Определение показателей
Правильность	Принадлежность результатов определения значения МПК с использованием исследуемого изделия интервалу допустимых значений МПК на эталонных штаммах микроорганизмов
Воспроизводимость	Доля результатов определения МПК с помощью исследуемого изделия для одного АМП, находящихся в интервале ± 1 разведение друг от друга
Категорийное согласование (СА)	Доля проверенных с помощью исследуемого изделия и референтного метода штаммов, относящихся к одной и той же клинической категории чувствительности
Существенное согласование (ЕА)	Доля результатов определения МПК для одного АМП, находящихся в интервале ± 1 разведение от результата определения МПК референтным методом
Большое расхождение (MD)	Доля проверенных с помощью исследуемого изделия штаммов, попадающих в категорию "резистентные", но относящихся к категории "чувствительные" согласно результатам, полученным референтным методом
Очень большое расхождение (VMD)	Доля проверенных с помощью исследуемого изделия штаммов, попадающих в категорию "резистентные", но относящихся к категории "чувствительные" согласно результатам, полученным референтным методом

Алгоритмы оценки функциональных характеристик (дизайн исследования) представлены на рисунках 21–23, пример учёта результатов продемонстрирован на рисунках 24-25.



Рисунок 21 — Оценка показателя воспроизводимости тест-полосок



Рисунок 22 — Оценка показателя правильности тест-полосок



Примечание: EA – существенное согласование, MD – большое расхождении, VMD – очень большое расхождение

Рисунок 23 — Оценка показателей качества тест-полосок

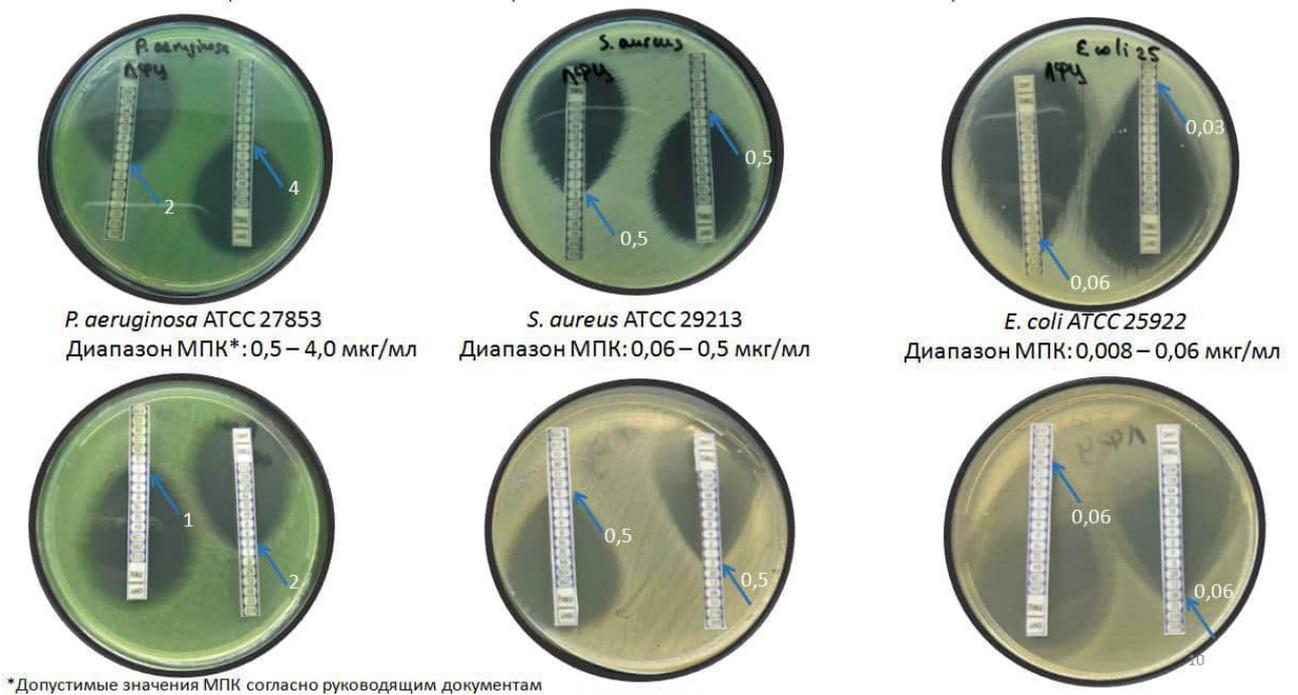


Рисунок 24 — Определение МПК с помощью тест-полосок

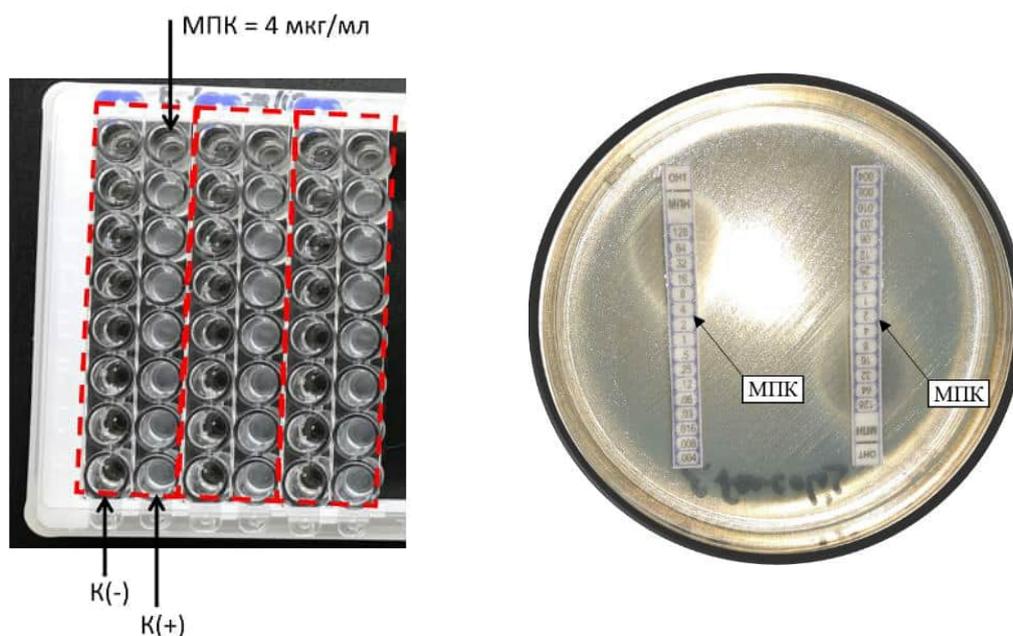


Рисунок 25 — Определение МПК с помощью тест-полосок и МСР

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

Для определения минимального количества единиц наблюдения использовали методику, приведённую в работе Jason J. Z. Liao [120]. Работа посвящена определению размера выборки при изучении согласования между двумя методами измерения. Автором показана зависимость минимально необходимого числа наблюдений от требуемого уровня статистической значимости (Discordance rate, α) и статистической мощности (Tolerance probability, β).

Для определения согласования диагностических тестов общепринятыми достаточными считаются уровень статистической значимости α не более 0,05, а статистическая мощность не менее 80%. В таблице 21 представлен размер выборки при парном определении согласования [120].

Таким образом, минимально допустимое количество единиц наблюдения составляет 59. В данном исследовании, при проверке тест-полосок было проведено исследование 660 (22×30) комбинаций АМП-изолят попарно с референтным методом. Таким образом, результаты статистического исследования можно считать достоверными.

Таблица 21 — Размер выборки при парном определении согласования (степень свободы $k = 1$) [120]

Уровень статистической значимости α	Статистическая мощность, β				
	80%	85%	90%	95%	99%
0,01	299	337	388	473	662
0,05	59	67	77	93	130
0,1	29	33	38	46	64
0,15	19	22	25	30	42
0,2	14	16	18	22	31

4.2 Оценка воспроизводимости результатов на эталонных штаммах

Воспроизводимостью называется степень близости друг к другу независимых результатов измерений. Эта характеристика зависит от случайных факторов и не имеет отношения к истинному значению измеряемой величины [6].

Воспроизводимость результатов, полученных при помощи разработанных тест-полосок, оценивали на основании тройного параллельного исследования каждого наименования тест-полосок. Исследование проводили с использованием эталонных штаммов *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *S. pneumoniae* ATCC 49619 на основании значений МПК, установленных EUCAST (версия 14.0) [91] и институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI M100) [74]. 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. Результаты определения МПК методом градиентной диффузии для эталонных штаммов микроорганизмов при помощи разработанных полосок представлены в таблице 22.

Таблица 22 — Исследование воспроизводимости. Значения МПК, полученные на эталонных штаммах при помощи изготовленных тест-полосок

АМП	Диапазон концентраций, мкг/мл	Штамм (эталонный)	Значения МПК, мкг/мл		
			1-я постановка	2-я постановка	3-я постановка
Аминогликозиды					
Амикацин	0,016 – 512	<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,0	1,0	2,0
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1,0	1,0	2,0
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,0	2,0	1,0
Гентамицин	0,016 – 512	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,5	0,25	1,0
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,25	0,5	0,5
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,5	0,5	0,5
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	8,0	4,0	4,0
Амфениколы					
Хлорамфеникол	0,016 – 512	<i>E. coli</i> ATCC 25922	4,0	4,0	8,0
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8,0	4,0	8,0
Гликопептиды					
Ванкомицин	0,016 – 512	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1,0	1,0	2,0
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,25	0,25	0,5
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	2,0	1,0	1,0
Карбапенемы					
Имипинем	0,004 – 128	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,125	0,25	0,25
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,5	1,0	2,0
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,03	0,03	0,06
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2,0	1,0	2,0

Меропенем	0,004 – 128	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,06	0,03	0,06
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,03	0,03	0,03
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,03	1,0	0,5
Линкозамиды					
Клиндамицин	0,016 – 512	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,25	0,25	0,25
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,06	0,06	0,03
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	8,0	16,0	16,0
Макролиды					
Азитромицин	0,008 – 256	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,06	0,06	0,125
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5	0,5	1,0
Эритромицин	0,016 – 512	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1,0	0,5	1,0
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,06	0,06	0,06
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1,0	1,0	2,0
Монобактамы					
Азтреонам	0,008 – 256	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,06	0,25	0,25
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2,0	4,0	2,0
Нитрофураны					
Нитрофурантоин	0,031 – 1024	<i>E. coli</i> ATCC 25922	8,0	4,0	8,0
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8,0	16,0	8,0
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4,0	4,0	8,0
Пенициллины					
Амоксициллин / клавулановая кислота	0,016 – 512	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,03	0,06	0,06
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	4,0	4,0	2,0
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5	0,25	0,5

Оксациллин	0,016 – 512	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,125	0,125	0,25
Бензилпенициллин	0,016 – 512	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,25	2,0	0,25
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,5	0,5	0,25
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	2,0	2,0	2,0
Сульфаниламиды					
Триметоприм / сульфаметоксазол	0,0008/0,016 – 26,9/512	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,25	0,25	0,25
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,25	0,25	0,5
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,125	0,25	0,25
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,5	0,25	0,5
Тетрациклины					
Тетрациклин	0,016 – 512	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,5	1,0	1,0
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,25	0,5	0,5
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,125	0,125	0,06
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	8,0	16,0	8,0
Цефалоспорины					
Цефепим	0,008 – 256	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,06	0,03	0,06
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,06	0,06	0,06
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,0	1,0	1,0
Цефотаксим	0,004 – 128	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,125	0,06	0,125
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	4,0	2,0	2,0
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,03	0,03	0,03
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	16,0	32,0	16,0

Цефтриаксон	0,004 – 128	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,125	0,06	0,125
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2,0	1,0	1,0
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,06	0,03	0,06
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	16,0	8,0	16,0
Цефтазидим	0,016 – 512	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,25	0,25	0,25
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,0	1,0	2,0
Фторхинолоны					
Левифлоксацин	0,008 – 256	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,08	0,08	0,016
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,25	0,5	0,5
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	1,0	0,5	1,0
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2,0	1,0	2,0
Ципрофлоксацин	0,004 – 128	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,004	0,004	0,016
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5	0,25	0,25
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,5	1,0	0,5

Совпадение результатов в пределах \pm одно двукратное разведение было достигнуто в 69 комбинациях АМП/штамм микроорганизма из 69, что соответствует 100 % в относительном выражении.

Согласно стандарту ГОСТ Р ИСО 20776–1-2022 [3], значения МПК должны быть воспроизводимыми в пределах плюс-минус одного двукратного разведения для не менее чем 95 % комбинаций АМП/штамм микроорганизма, что и было получено в результате исследования.

4.3 Оценка правильности на эталонных штаммах

Правильность (trueness) — степень близости среднего значения, полученного из большой серии результатов измерений, к истинному значению [6]. На практике вместо истинного значения используется действительное

значение величины, то есть такое значение, которое получено экспериментально и настолько близкое к истинному значению, что может быть использовано вместо него в данной измерительной задаче [33]. За действительные значения принимался диапазон значений МПК, указанный в руководящих документах для каждого сочетания АМП-эталонный штамм.

Поскольку не существует общепринятой методики вычисления среднего значения МПК, оценивались значения, полученные в каждом из экспериментов. Таким образом, правильность считалась доказанной при соответствии всех полученных значений МПК диапазону допустимых значений МПК. Соответствие полученных значений МПК допустимым диапазонам МПК для эталонных штаммов микроорганизмов представлено в таблице 23.

Таблица 23 — Исследование правильности. Соответствие результатов определения МПК с помощью изготовленных тест-полосок диапазонам допустимых значений

АМП	Диапазон концентрации АМП, мкг/мл	Эталонный штамм	Допустимый диапазон МПК для штамма, мкг/мл	Соответствие полученных значений допустимому диапазону
Аминогликозиды				
Амикацин	0,016 – 512	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,5 – 4,0	+
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1,0 – 4,0	+
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,0 – 4,0	+
Гентамицин	0,016 – 512	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,25 – 1,0	+
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,125 – 1,0	+
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,5 – 2,0	+
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4,0 – 16,0	+
Амфениколы				
Хлорамфеникол	0,016 – 512	<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,0 – 8,0	+
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2,0 – 16,0	+
Гликопептиды				
Ванкомицин	0,016 – 512	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5 – 2,0	+
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1,0 – 4,0	+

Карбапенемы				
Имипинем	0,004 – 128	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,06 – 0,25	+
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,5 – 2,0	+
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,0 – 4,0	+
Меропенем	0,004 – 128	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,008 – 0,06	+
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,25 – 1,0	+
Линкозамиды				
Клиндамицин	0,016 – 512	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,06 – 0,25	+
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4,0 -16,0	+
Макролиды				
Азитромицин	0,008 – 256	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5 – 2,0	+
Эритромицин	0,016 – 512	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,25 – 1,0	+
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1,0 - 4,0	+
Монобактамы				
Азтреонам	0,008 – 256	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,06 – 0,25	+
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2,0 – 8,0	+
Нитрофураны				
Нитрофурантоин	0,031 – 1024	<i>E. coli</i> ATCC 25922	4,0 – 16,0	+
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8,0 – 32,0	+
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4,0 - 16,0	+
Пенициллины				
Амоксициллин / клавулановая кислота	0,016/2 – 512/2	<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,0 – 8,0	+
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,125 - 0,5	+
Оксациллин	0,016 – 512	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,125 - 0,5	+
Бензилпенициллин	0,016 – 512	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,25 – 2,0	+
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1,0 – 4,0	+
Сульфаниламиды				
Триметоприм / сульфаметоксазол	0,0008/0,01 6 – 26,9/512	<i>E. coli</i> ATCC 25922	≤ 0,5	+
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	≤ 0,5	+
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	≤ 0,5	+
Тетрациклины				
Тетрациклин	0,016 – 512	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,5 – 2,0	+
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,125 – 1,0	+
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	8,0 – 32,0	+

Цефалоспорины				
Цефепим	0,008 – 256	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,016 – 0,125	+
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,5 – 4,0	+
Цефотаксим	0,004 – 128	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,03 – 0,125	+
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1,0 – 4,0	+
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	8,0 – 32,0	+
Цефтриаксон	0,004 – 128	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,03 – 0,125	+
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1,0 – 8,0	+
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	8,0 – 64,0	+
Цефтазидим	0,016 – 512	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,06 – 0,5	+
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,0 – 4,0	+
Фторхинолоны				
Левифлоксацин	0,008 – 256	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,008 – 0,06	+
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,06 – 0,5	+
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,5 – 4,0	+
Ципрофлоксацин	0,004 – 128	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,004 – 0,016	+
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,125 – 0,5	+
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,25-2,0	+

Примечание: диапазон значений МПК, указан в соответствии со следующими руководящими документами: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 14.0, 2024. <http://www.eucast.org>; CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100S. Wayne/ PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024

Как следует из таблицы 23, значения МПК находились в диапазонах допустимых значений, указанных в руководящих документах [74, 91].

4.4 Оценка показателей качества на клинических изолятах

При оценке показателей качества (CA, EA, MD, VMD) клинических изолятов с использованием разработанных тест-полосок и референтного метода серийных разведений, за истинные значения принимались значения МПК, полученные при помощи МСР. Исследование проводилось на клинических изолятах *E. coli* (n = 12), *Enterococcus* spp. (n = 12), *S. aureus* (n = 30), *K. pneumoniae* (n = 12), *A. baumannii* (n = 12), *P. aeruginosa* (n = 12), *Enterobacter* spp.

(n = 12) с использованием МСР в бульоне Мюллера-Хинтон в 96-ти луночных полистироловых планшетах («Медполимер», РФ). Для определения показателей СА и ЕА сравнивались значения МПК, полученные с помощью разработанного изделия и референтного метода.

Для определения показателей MD и VMD сравнивались клинические категории, соответствующие полученным значениям МПК. Пограничные значения МПК для клинических штаммов микроорганизмов в соответствии со стандартами EUCAST v. 14.0 и CLSI M100S представлены в таблице 24.

Результаты определения МПК различных АМП на клинических штаммах с использованием МСР и разработанных тест-полосок в виде значений показателей качества и их соответствие критериям приемлемости приведены в таблице 25.

Таблица 24 — Пограничные значения МПК для клинических штаммов микроорганизмов

№ п/п	Наименование АМП	Диапазон концентраций АМП, мкг/мл	<i>Enterobacteriales</i>		<i>Pseudomonas</i> spp.		<i>Acinetobacter</i> spp.		<i>Staphylococcus</i> spp.		<i>Enterococcus</i> spp.	
			S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
1	Амикацин	0,016 – 512	8,0	8,0	1,0	32,0	8,0	8,0	16,0	16,0	–	–
2	Гентамицин	0,016 – 512	2,0	2,0	4,0	8,0	4,0	4,0	2,0	2,0	–	–
3	Хлорамфеникол	0,016 – 512	16,0	16,0	–	–	–	–	8,0	16,0	–	–
4	Ванкомицин	0,016 – 512	–	–	–	–	–	–	2,0	2,0	4,0	4,0
5	Имипинем	0,004 – 128	2,0	4,0	0,001	4,0	2,0	4,0	–	–	0,001	4,0
6	Меропенем	0,004 – 128	2,0	8,0	2,0	8,0	2,0	8,0	–	–	–	–
7	Клиндамицин	0,016 – 512	–	–	–	–	–	–	0,25	0,25	–	–
8	Азитромицин	0,008 – 256	–	–	–	–	–	–	2,0	4,0	–	–
9	Эритромицин	0,016 – 512	–	–	–	–	–	–	1,0	1,0	0,5	4,0
10	Азтреонам	0,008 – 256	1,0	4,0	0,001	16,0	–	–	–	–	–	–
11	Нитрофурантоин	0,031 – 1024	64,0	64,0	–	–	–	–	64,0	64,0	64,0	64,0
12	Амоксициллин / клавулан. кислота	0,016 – 512	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	Бензилпенициллин	0,016 – 512	–	–	–	–	–	–	0,125	0,125	8,0	8,0
14	Оксациллин	0,016 – 512	–	–	–	–	–	–	0,125	0,5	–	–
15	Триметоприм/ сульфаметоксазол	0,0008/0,016 – 26,9/512	2,0	4,0	–	–	2,0	4,0	2,0	4,0	–	–
16	Тетрациклин	0,016 – 512	–	–	–	–	4,0	8,0	1,0	1,0	–	–
17	Цефепим	0,008 – 256	1,0	4,0	0,001	8,0	8,0	16,0	–	–	–	–
18	Цефотаксим	0,004 – 128	1,0	2,0	–	–	8,0	32,0	–	–	–	–
19	Цефтриаксон	0,004 – 128	1,0	2,0	–	–	8,0	32,0	–	–	–	–
20	Цефтазидим	0,016 – 512	1,0	4,0	0,001	8,0	8,0	16,0	–	–	–	–
21	Левофлоксацин	0,008 – 256	0,5	1,0	0,001	2,0	0,5	1,0	0,001	1,0	4,0	4,0
22	Ципрофлоксацин	0,004 – 128	0,25	0,5	0,001	0,5*	0,001	1,0	0,001	1,0	4,0	4,0

Примечание: «–» – пограничные значения МПК для данной комбинации микроорганизм/АМП отсутствуют

Таблица 25 — Значения показателей качества разработанных тест-полосок

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

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

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

С использованием метода градиентной диффузии на бактериях группы ESKAPE было исследовано соответствие значений МПК и клинических категорий чувствительности, которые получали с помощью разработанных тест-полосок и референтных наборов (M.I.C.E. полоски, Oxoid, Великобритания).

В ходе работы оценивали чувствительность следующих клинических изолятов (n=101): *Enterococcus* spp. (15 изолятов), *S. aureus* (10 изолятов), *K. pneumoniae* (28 изолятов), *Acinetobacter* spp. (15 изолятов), *P. aeruginosa* (13 изолятов), *Enterobacter* spp. (20 изолятов). Использовали изготовленные по разработанной методике тест-полоски с нанесёнными АМП из следующих фармакологических групп: пенициллины (оксациллин), цефалоспорины (цефотаксим), карбапенемы (меропенем), аминогликозиды (гентамицин, амикацин), гликопептиды (ванкомицин), макролиды (азитромицин).

Все полученные на разработанной тест-системе и референтных наборах значения МПК различались не более, чем в два раза, из чего следует, что показатель существенного согласования (essential agreement, EA) составил 100 % (критерий приемлемости EA \geq 90%).

Клинические категории чувствительности изолятов, определенные с использованием разработанных и референтных E-тестов, были тождественны для всех изученных комбинаций микроорганизм/антибиотик. Таким образом, показатель СА составил 100% (критерий приемлемости — СА \geq 90%), а показатели MD и VMD – 0% (критерий приемлемости — MD, VMD \leq 3%).

4.6 Оценка возможности использования разработанных тест-полосок для проведения исследований методом кросс-теста

Для исследования использовали тест-полоски, которые были изготовлены по разработанной методике. В виду актуальности поиска новых веществ, обладающих потенциальным синергетическим эффектом с используемыми АМП, было принято решение исследовать сочетанное воздействие веществ, не являющихся антибиотиками, с классическими антимикробными препаратами.

Для этого были изготовлены тест-полоски, импрегнированные азидотимидином и байкалином. На другие четыре варианта полосок наносили АМП (гентамицин, цефотаксим, ципрофлоксацин и хлорамфеникол). Вещества азидотимидин (аналог тимидина, применяющийся для лечения ВИЧ) и байкалин (вещество класса флавоноидов) исследовали как потенциальные синергисты АМП. Азидотимидин активен в отношении *Enterobacterales*, включая *K. pneumoniae*. Механизм действия азидотимидина основан на способности к включению в бактериальный геном с последующей фрагментацией ДНК [89, 126, 129, 133]. Байкалин, выделяемый из шлемника байкальского, обладает способностью к потенцированию антимикробного действия тетрациклина, гентамицина и ципрофлоксацина [95, 119].

Определение эффективности комбинаций азидотимидина и байкалина с антибиотиками проводили методом кросс-теста (модифицированный метод градиентной диффузии). Концентрации АМП, которые подавляли рост 50% и 90% исследуемых изолятов, определяли, как МПК₅₀ и МПК₉₀ соответственно.

Внутренний контроль качества изготовленных Е-тестов производили на эталонных штаммах коллекции АТСС согласно рекомендациям руководящих документов [74, 91]. Материалом исследования служили клинические базовые изоляты *K. pneumoniae* (n = 20), обладающие резистентностью ко всем тестируемым АМП. Для данных штаммов методом градиентной диффузии определяли значения МПК₅₀ и МПК₉₀ в отношении хлорамфеникола, гентамицина, цефотаксима и ципрофлоксацина.

Сравнение эффективности комбинаций данных АМП с байкалином и азидотимидином в отношении исследованных изолятов *K. pneumoniae* представлено в таблице 26. Рассчитывали индекс фракционной подавляющей концентрации (ΣФПК) для оценки эффективности комбинированного действия АМП и исследуемых соединений в соответствии с формулой (8).

$$\Sigma\text{ФПК} = \text{МПК}_{\text{АВ}} / \text{МПК}_{\text{А}} + \text{МПК}_{\text{БА}} / \text{МПК}_{\text{Б}} \quad (8),$$

где:

ΣФПК — индекс фракционной подавляющей концентрации;

Таблица 26 – Эффективность комбинаций АМП с исследуемыми соединениями в отношении изолятов *K. pneumoniae*

Наименование АМП	Присутствие соединения в комбинации с АМП, +/-		МПК ₅₀	МПК ₉₀
	Азидотимидин	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: «+» - наличие соединения в комбинации; «-» – отсутствие соединения в комбинации

МПК_А — МПК антибиотика А;

МПК_Б — МПК вещества Б;

МПК_{АБ} — МПК антибиотика А в присутствии вещества Б;

МПК_{БА} — МПК вещества Б в присутствии антибиотика А.

Схема постановки и учета результатов при использовании метода кросс-теста представлена на рисунке 26.

При значении $\Sigma\text{ФПК} > 4,0$ эффект комбинации оценивали как антагонистический, при $1,0 < \Sigma\text{ФПК} \leq 4,0$ как нейтральный, при $0,5 < \Sigma\text{ФПК} \leq 1,0$ как аддитивный, и при $\Sigma\text{ФПК} \leq 0,5$ – как синергидный [50].

В ходе исследования была подтверждена самостоятельная антибактериальная активность азидотимидина в отношении изолятов *K. pneumoniae* — МПК₅₀ и МПК₉₀ составили 1 мкг/мл 2 мкг/мл соответственно. Самостоятельной антибактериальной активности байкалина выявлено не было.

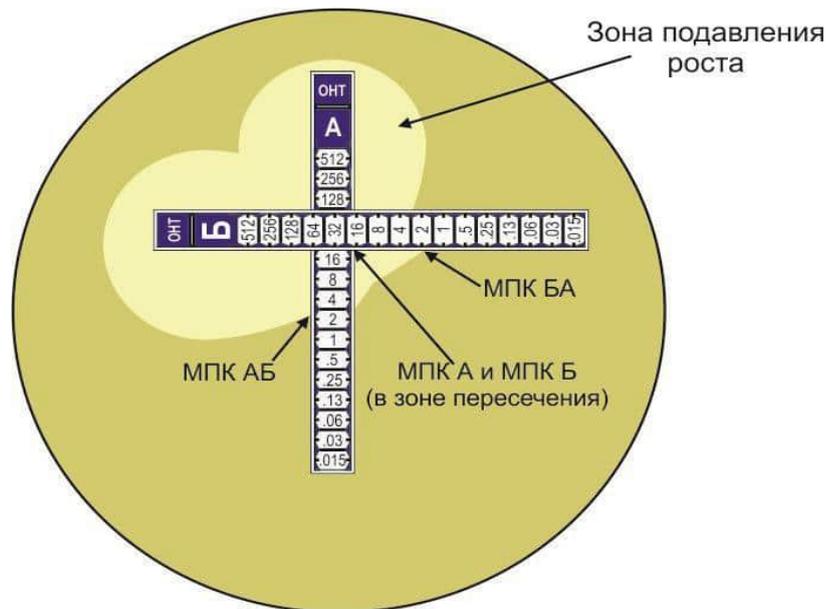


Рисунок 26 — Схема постановки и учета результатов кросс-теста

4.7 Заключение по главе 4

По результатам исследования, при оценке на эталонных штаммах и клинических изолятах, показатели воспроизводимости, правильности и показатели качества тест-системы (СА, ЕА, МD, VMD) находились в пределах диапазонов допустимых значений. При сравнительном исследовании разработанной и референтных тест- систем показано соответствие категорий чувствительности для всех комбинаций микроорганизм/АМП с точностью \pm одно двукратное разведение.

Изучением чувствительности к комбинациям различных АМП с азидотимидином и байкалином показана возможность использования разработанной тест-системы при проведении исследований модифицированным методом градиентной диффузии (кросс-тест).

Снижение значений МПК₅₀ и МПК₉₀ наблюдалось в комбинациях азидотимидина с ципрофлоксацином и азидотимидина с гентамицином. Обнаружен синергический эффект для комбинации азидотимидин + ципрофлоксацин и подтверждён аддитивный эффект (Σ ФПК 0,65–0,84) для комбинации азидотимидин + гентамицин (диапазон Σ ФПК 0,33–0,50). Изменения значений МПК антибиотиков не наблюдалось в комбинациях азидотимидина с хлорамфениколом или азидотимидина с цефотаксимом.

Байкалин не оказывал влияния на эффективность хлорамфеникола и ципрофлоксацина в отношении исследованных изолятов. Синергизм был обнаружен в комбинации байкалина с цефотаксимом (диапазон Σ ФПК 0,52 – 0,75 - аддитивный эффект).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое распространение резистентных штаммов микроорганизмов представляет серьёзную угрозу для здравоохранения во всем мире [46, 52]. Поэтому, всё большую значимость приобретают мероприятия, направленные на снижение появления и распространения устойчивости к АМП. Одним из основных способов сдерживания резистентности является соблюдение правил рациональной антибиотикотерапии, невозможной без определения чувствительности к АМП. [18, 25, 27]. Во многих клинических случаях, а также в целях надзора за антибиотикорезистентностью, результаты определения чувствительности к АМП должны быть выражены количественно, т.е. в значении МПК, считающимся высокоинформативным показателем [27, 43, 171].

Наиболее распространёнными методами количественной оценки чувствительности к АМП являются методы серийных разведений и градиентной диффузии (Е-тест). Несмотря на ряд ограничений, метод градиентной диффузии, является наиболее удобным из количественных способов определения чувствительности к АМП [176]. Е-тест обладает рядом преимуществ, которые обуславливают его высокую востребованность в микробиологической диагностике. К ним относятся простота и скорость выполнения исследования, возможность использования модифицированных плотных питательных сред, применение суперпозиции тест-полосок (кросс-тест) для изучения чувствительности к комбинациям АМП [9, 68, 157]. В то же время, высокая стоимость тест-полосок Е-теста и отсутствие отечественного производства ограничивает использование данного метода в Российской Федерации [108].

Стоимость одного количественного определения чувствительности к АМП методом серийных разведений или градиентной диффузии эквивалентна 50-100 определениям при помощи дисков. Таким образом, разработка методики изготовления тест-полосок Е-теста представляется актуальной задачей, особенно в рамках реализации программы импортозамещения.

Отечественные и зарубежные руководящие документы рекомендуют тестирование МПК для изолятов, чувствительность которых находится в зоне технической неопределённости. В отношении категории «I» предписывается количественное определение чувствительности у высокотоксичных АМП и с целью выявления резистентности низкого уровня [32, 74].

По результатам проведённого диско-диффузионным методом изучения чувствительности к АМП, до 11,2% из 2212 штаммов *E. coli*, *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp. относятся к зоне технической неопределённости. В таких случаях, чувствительность рекомендуется оценивать количественными методами. Среди исследованных штаммов энтеробактерий, наиболее часто зона технической неопределённости встречалась при изучении чувствительности к амоксициллину/клавулановой кислоте и ципрофлоксацину. Самая высокая частота встречаемости штаммов категории «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» («I»), согласно стандарту EUCAST 14.0 [90], наблюдалась при определении чувствительности к цефтазидиму (3,4%) и цефепиму (2,6%). Реже встречались штаммы данной категории по отношению к триметоприму/сульфаметоксазолу (0,7%), меропенему (0,6%), цефотаксиму (0,5%) и ципрофлоксацину (0,5%). Следует отметить, что последние версии стандартов EUCAST и CLSI рекомендуют определять чувствительность *Salmonella* spp. к ципрофлоксацину только количественными методами. В отечественных клинических рекомендациях KMAX-2024 чувствительность *Salmonella* spp. к ципрофлоксацину предписывается определять исключительно количественными методами. Согласно стандарту CLSI M100-ED34 [74] наиболее часто встречались штаммы категории «I» по отношению к аминогликозидам — амикацину (16,1%), тобрамицину (14,8%), и гентамицину (12,0%) и пенициллинам — 12,0% изолятов для амоксициллина/клавулановой кислоты. Менее распространёнными были изоляты категории «I» в отношении ципрофлоксацина (8,7%), нитрофурантоина (8,5%), цефепима (4,8%), налидиксовой кислоты (2,0%) и триметоприма/сульфаметоксазола (1,3%). Не более 1% составила частота встречаемости категории «I» для хлорамфеникола

(0,9%), меропенема (0,8%), ампициллина (0,7%), тетрациклина (0,5%) и эртапенема (0,4%).

Доля количественных определений для карбапенемов по микробиологическим критериям относительно невелика (до 1 %), но частота применения АМП данной группы у пациентов ОРИТ, а также уровень их токсичности, делает разработку тест-систем для определения МПК карбапенемов не менее актуальной, чем для остальных АМП.

В результате проделанной работы предложена методика изготовления Е-тестов. Создание методики включало в себя выбор материала подложки для тест-полосок, разработку алгоритма расчёта концентрации АМП, сорбируемого на подложку, процесса нанесения АМП на подложку и устройства, предназначенного для выполнения этой задачи.

В качестве подложки для изготовления тест-полосок были рассмотрены листовые пористые и непористые материалы [47]. 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/м^2 , бумага фильтровальная плотностью 160 г/м^2 , мембрана нитроцеллюлозная (диаметр пор $0,45 \text{ мкм}$) и мембрана нейлоновая (диаметр пор $0,45 \text{ мкм}$), из непористых — плёнки из полистирола, полиэтилена, полипропилена, полиамида, полиэтилентерефталата и поливинилхлорида. Из пористых материалов наиболее подходящей по совокупности параметров являлась бумага фильтровальная плотностью 160 г/м^2 , из непористых — плёнка из полиэтилентерефталата. Для изготовления тест-полосок в данной работе использовалась фильтровальная бумага плотностью 160 г/м^2 , поскольку при сорбции АМП на данный материал

можно использовать более производительную технологию непрерывного нанесения.

Исходя из предложенных в работах Cooper К.Е. [77] и M. L. Delignette-MuUer [83] методик расчёта скорости диффузии АМП в плотной питательной среде и закона Фика, была выведена формула, применимая для приготовления растворов АМП, сорбируемых на полоски Е-теста. По данной формуле рассчитывали концентрацию раствора АМП для изготовления тест-полосок, которые получали нанесением раствора АМП на подложку при помощи механического дозатора. После проверки тест-полосок на эталонных штаммах и получения положительных результатов, для ускорения и стандартизации процесса нанесения растворов АМП, была разработана лабораторная установка. В качестве прототипа выбрали устройство, применяющееся для нанесения реагентов на мембрану при изготовлении иммунохроматографических тестов (Automated Lateral Flow Reagent Dispenser, производства ClaremontBio). Данное изделие состоит из блока перемещения подложки относительно капилляров и блока подачи раствора в капилляры и имеет от 2 до 4 каналов дозирования раствора. Разработанная лабораторная установка представляла собой 16-канальную шприцевую помпу с роликовой подачей.

На установке были изготовлены тест-полоски с 22 АМП из групп аминогликозидов (амикацин, гентамицин), амфениколов (хлорамфеникол), гликопептидов (ванкомицин), карбапенемов (меропенем, имипенем), линкозамидов (клиндамицин), макролидов (азитромицин, эритромицин), монобактамов (азтреонам), нитрофуранов (нитрофурантоин), пенициллинов (амоксициллин/клавулановая кислота, бензилпенициллин, оксациллин), сульфаниламидов (триметоприм/сульфаметоксазол), тетрациклинов (тетрациклин), цефалоспоринов (цефепим, цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим), фторхинолонов (левофлоксацин, ципрофлоксацин), а также с азидотимидином и байкалином. Изготовленные полоски оценивали по следующим функциональным характеристикам: правильность,

воспроизводимость, категорийное согласование (CA), существенное согласование (EA), большое расхождение (MD), очень большое расхождение (VMD).

Изучение воспроизводимости и правильности результатов определения МПК на эталонных штаммах (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619) показало соответствие полученных значений МПК диапазону допустимых значений и 100% воспроизводимость результатов в пределах \pm одно двукратное разведение для всех АМП.

Оценка показателей качества (CA, EA, MD, VMD) разработанных тест-полосок на клинических изолятах микроорганизмов группы ESKAPE проводилась в сравнении с референтным методом серийных разведений. Категорийное согласование (CA) составило 96,67 % для 27,27% АМП, 100% для 72,73% АМП. Существенное согласование (EA) составило 90,00% для 27,27% АМП, 93,34% для 40,91% АМП, 96,67% для 27,27% АМП и 100% для 4,55% АМП. Показатель большого расхождения (MD) составил 3,33% для 22,73% АМП, 0% - для 77,27% АМП. Показатель очень большого расхождения (VMD) составил 0% для всех АМП.

Сравнение МПК, выявленных при помощи разработанного изделия и референтной тест-системы (М.І.С.Е.-полоски Oxoid) подтвердило тождественность категорий чувствительности для всех комбинаций клинический изолят/АМП. При этом показатели большого и очень большого расхождения были равными 0%, а категорийное согласование составило 100% для всех изученных препаратов. Все значения МПК находились в пределах \pm одно двукратное разведение друг от друга, что удовлетворяло требованиям руководящей документации [4].

С целью оценки возможности применения разработанных тест-полосок для проведения исследований методом кросс-теста, изучали эффективность комбинированного действия антибиотиков с веществами, не применяющимися для антибактериальной терапии (азидотимидин, байкалин). Данное исследование выявило, что азидотимидин проявлял синергетический эффект в комбинации с

гентамицином (диапазон Σ ФПК 0,33–0,50), а также с ципрофлоксацином (Σ ФПК 0,65–0,84) в отношении исследуемых изолятов *K. pneumoniae*. Байкалин проявлял синергетическую активность в сочетании с цефотаксимом (Σ ФПК 0,52 – 0,75 — аддитивный эффект) и не влиял на чувствительность исследуемых штаммов к ципрофлоксацину и хлорамфениколу.

Результаты определения МПК, полученные при помощи изготовленных по разработанной методике тест-полосок на эталонных штаммах и клинических изолятах, соответствуют критериям приемлемости. Следовательно, тест-полоски Е-теста, изготовленные по разработанной методике, могут применяться для количественного определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и для выявления эффективности воздействия комбинаций АМП методом кросс-теста.

ВЫВОДЫ

1. Для штаммов *E. coli*, *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp., наиболее часто требуется количественное определение чувствительности к амоксициллину/клавулановой кислоте, цефалоспорином (цефотаксим, цефтазидим, цефепим), ципрофлоксацину и триметоприму/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:

$$C_{\text{мг/мл}} = \frac{C_0 \times e \times xuz}{V_{\text{нанесения,мл}}}$$

где $C_{\text{мг/мл}}$ – концентрация раствора антимикробного препарата, C_0 – концентрация антимикробного препарата, которую необходимо достичь в непосредственной близости от тест-полоски (значение, нанесённое на шкале тест-полоски), e – математическая константа, $хуз$ – длина, ширина и высота участка нанесения одной концентрации на подложке, $V_{\text{нанесения,мл}}$ – объём жидкости, 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 $\Sigma\text{ФПК}$ 0,33–0,50), аддитивный эффект (Σ ФПК 0,65–0,84) — при сочетании азидотимидина с ципрофлоксацином и в комбинации байкалин-цефотаксим ($\Sigma\text{ФПК}$ 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 микроорганизмов 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 E-тесты позволяют изучать потенциально перспективные комбинации антибиотиков, а также комбинации антибиотиков и веществ, не обладающих выраженным самостоятельным антибактериальным эффектом.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АБР — Антибиотикорезистентность
- АЗТ — Азидотимидин
- АМП — Антимикробный препарат
- БЛА — β -лактамы антибиотики
- БЛРС — β -лактамазы расширенного спектра
- ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
- ВАК — Всероссийская аттестационная комиссия
- ДДМ — Диско-диффузионный метод
- ДНК — Дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЕВРАЗЭС — Евразийское экономическое сообщество
- ЗТН — Зона технической неопределённости
- ИСМП — Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
- КДЛ — Клинико-диагностические лаборатории
- МБЛ — Металло- β -лактамазы
- МПК — Минимальная подавляющая концентрация
- МСР — Метод серийных разведений
- МХА — Агар Мюллера-Хинтон
- МХБ — Бульон Мюллера-Хинтон
- МХ-П — бульон и агар Мюллера-Хинтон для прихотливых микроорганизмов
- ОРИТ — Отделение реанимации и интенсивной терапии
- ПСБ — Пенициллинсвязывающие белки
- РФ — Российская Федерация
- ТЛМ — Терапевтический лекарственный мониторинг
- ФБР — Фосфатный буферный раствор
- ФК/ФД — Фармакокинетика и фармакодинамика
- ФПК — Фракционная подавляющая концентрация
- ЦПМ — Цитоплазматическая мембрана
- AmpC — Цефалоспорины молекулярного класса C

ARC — Augmented renal clearance; Увеличенный почечный клиренс

ATCC — American Type Culture Collection; Американская коллекция типовых культур

BLBLI — β -lactam/ β -lactamase inhibitor; β -лактам/ингибитор β -лактамазы

CA — Categorical agreement; Категорийное согласование

CDC — Centers for Disease Control and Prevention; Центр по контролю и профилактике заболеваний

CrCl — Creatinine Clearance; Клиренс креатинина

CLSI — Clinical and Laboratory Standards Institute; Институт клинических и лабораторных стандартов

EA — Essential agreement; Существенное согласование

ECOFF — Epidemiological cut-off values; Эпидемиологические точки отсечения

ELF — Epithelial lining fluid; Жидкость эпителиальной выстилки

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

hGISA — Штаммы *S. aureus*, отличающиеся нестабильностью свойств и значительной гетерогенностью микробной популяции по уровню устойчивости к гликопептидам, считающиеся одним из этапов формирования GISA-штаммов

IDSA — Infectious Diseases Society of America; Американское общество инфекционных болезней

KPC — *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; Карбапенемаза *Klebsiella pneumoniae*

MALDI-TOF — времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией

MD — Major discrepancy; Большое расхождение

MRSA — Метициллин-резистентный *S. aureus*

NCTC — National Collection of Type Cultures; Национальная коллекция типовых культур

PA — Polyamide; Полиамид

PE — Polyethylene; Полиэтилен

PET — Polyethylene terephthalate; Полиэтилентерефталат

PP — Polypropylene; Полипропилен

PS — Polystyrene; Полистирол

PVC — Polyvinyl chloride; Поливинилхлорид

PMQR — Plasmid-mediated quinolone resistance; Плазмидо-опосредованная устойчивость к хинолонам

QRDR — Quinolone resistance-determining regions; Области, определяющие устойчивость к хинолонам

VMD — Very major discrepancy; Очень большое расхождение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л.Б. Борисов. – М.: Медицинское информационное агентство, 2005. – 736 с.
2. Воробьев, А.В. Микробиология: Учебник / А.В. Воробьев, А.С. Быков, Е.П. Пашков, А.М. Рыбакова / 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2003. – 336 с.
3. ГОСТ Р ИСО 20776–1-2022. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам : нац. стандарт Российской Федерации : утвержден и введен в действие Приказом Федер. агентства по техн. регулированию и метрологии от 10 ноября 2022 г. № 1266-ст : введен взамен ГОСТ Р ИСО 20776-1— 2010 : дата введения 2023-10-01. Москва : Российский институт стандартизации, 2022, 24 с. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200194021> (дата обращения: 24.08.2024).
4. ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам : нац. стандарт Российской Федерации : утвержден и введен в действие Приказом Федер. агентства по техн. регулированию и метрологии от 23 ноября 2010 г. N 493-ст : введен впервые : дата введения 2012-03-01. Москва : Стандартиформ, 2011. 32 с. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200083431> (дата обращения: 22.08.2024).
5. ГОСТ Р ИСО 3534-1— 2019. Словарь и условные обозначения. Часть 1. Общие статистические термины и термины, используемые в теории вероятностей : нац. стандарт Российской Федерации : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 5 сентября 2019 г. № 636-ст : введен взамен ГОСТ Р 50779.10—2000 (ИСО 3534-1— 93) : дата введения 2020-01-01. Москва : Стандартиформ, 2019, 70 с. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200167574> (дата обращения: 30.08.2024).

6. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений : гос. стандарт Российской Федерации : принят и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 23 апреля 2002 г. N 161-ст : введен впервые : дата введения 2002-11-01. Москва : Стандартиформ, 2006, 33 с. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200029975> (дата обращения: 30.08.2024).

7. Данилов, А.И. Начало эры антимикробной химиотерапии / А.И. Данилов, А.В. Литвинов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 163–169.

8. Кафтырева, Л.А. Глобальные эпидемиологические и микробиологические тенденции брюшного тифа / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова // Инфекция, иммунитет и фармакология. – 2017. – Ч. 2. – С. 89-95.

9. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых респираторных заболеваний (ОРЗ); лечению пневмонии у детей / Союз педиатров России и Ассоциацией медицинских обществ по качеству // М.: Минздрав, 2015. – 20 с.

10. Клинические рекомендации «Гнойно-воспалительные заболевания и сепсис в акушерстве» Приняты Российским обществом акушеров-гинекологов, 27 мая 2015 года. URL: <https://www.mrckb.ru/files/gnojno-vozpалitelnye-zabolevaniya-v-akusherstve.pdf> (дата обращения: 10.06.2024).

11. Козлов, Р.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль / Р.С. Козлов // КМАХ. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 16-30.

12. Колбин, А.С. Социально-экономические аспекты приобретенной бактериальной резистентности / А.С. Колбин, С.В. Сидоренко, Ю.Е. Балыкина // Клиническая фармакология и терапия. – 2010. – Т. 5, № 19. – С. 16–22.

13. Кулмагамбетов, И.Р. Современные подходы к контролю и сдерживанию антибиотикорезистентности в мире / И.Р. Кулмагамбетов, С.С. Сарсенбаева, Ш.Х. Рамазанова, Н.К. Есимова // Медицинские науки. – 2015. – № 9. – С. 54–59.

14. Кулмагамбетов, И.Р. Эффективность программ борьбы с антибиотикорезистентностью / И.Р. Кулмагамбетов, С.С. Сарсенбаева, Ф.Н. Нурманбетова // Медицинские науки. – 2014. – № 10. – С. 1742–1747.

15. Лабинская, А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ещина. – М.: Медицина, 2004. – 576 с.

16. Лысенко, В.А. Практическое значение исследования антибиотикорезистентности / В.А. Лысенко, Е.В. Орлова, Т.И. Литвинова, М.В. Бабич // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2004. – № 18. – С. 17–20.

17. Мамедов, М.К. Пенициллин, как лекарственный препарат, положивший начало новой эре развития медицины / М.К. Мамедов, А.А. Кадырова // Биомедицина. – 2018. – № 2. – С. 31–36.

18. Маргиева, Т.В. Рекомендации по диагностике и лечению инфекций мочевыводящих путей у детей / Т.В. Маргиева, О.В. Комарова, Т.В. Вашурина, И.С. Костюшина, О.А. Зробок, Т.В. Сергеева, А.Н. Цыгин // Педиатрическая фармакология. – 2016. – Т. 13, № 1. – С. 17–21.

19. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология : практикум / Т. А. Канашкова, Д. А. Черношей, В. А. Горбунов, И. А. Крылов, Л. И. Каскевич. – 2-е изд., доп. Минск : БГМУ, 2010. – 91 с.

20. Методические рекомендации № 57. Инфекции мочевыводящих путей. / А.В. Зайцев, Т.С. Перепанова, М.Ю. Гвоздев, О.А. Арефьева. – М.: АБВ-пресс, 2017. – 26 с.

21. Методические рекомендации для врачей. Диагностика и лечение острых кишечных инфекций у детей / Л.Н. Мазанкова, С.Г. Горбунов. – М.: РМАПО, 2012. – 47 с.

22. Методические указания МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.2004. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

23. Намазова-Баранова, Л.С. Антибиотикорезистентность в современном мире / Л.С. Намазова-Баранова, А.А. Баранов // Педиатрическая фармакология. – 2017. – Т. 14, № 5. – С. 341–355.

24. ОФС.1.1.1.0013. Общая фармакопейная статья. Смачиваемость пористых твердых веществ : общая фармакопейная статья : утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 20.07.2023 N 377 : введена впервые : дата введения 2023-09-01. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания, 2023. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/1-1-2/smachivaemost-poristyx-tvyerdykh-veshchestv/> (дата обращения: 07.07.2024).

25. Патент № 2147610 Российская Федерация, МПК C12Q 1/02, C12Q 1/04, G01N 33/554, G01N 33/569. Способ оценки пороговой чувствительности бактериальных культур на биологические и химические препараты: № 98114223/13: заявл. 22.07.98: опубл. 20.04.00 / Кальной С.М., Ляпустина Л.В., Кальная Е.А., Онацкая Т.Г; заявитель: Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. – 5 с.: ил. – Текст: непосредственный.

26. Подсвинова, И.А. Микробиологический мониторинг в многопрофильном стационаре и пути оптимизации затрат на антибактериальные препараты / И.А. Подсвинова, В.А. Батулин, Е.В. Алиева // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2012. – Т. 27, № 3. – С. 77–79.

27. Поляк, М.С. Антибиотикотерапия. Теория и практика. / М.С. Поляк. – Спб.: ИнформМед, 2010. – 424 с.

28. Поляк, М.С. Роль микробиологической службы в обеспечении эффективной антибиотикотерапии на современном этапе / М.С. Поляк // Медицинский алфавит. Современная лаборатория № 2. – 2014. – Т. 12. – С. 27–31.

29. Поляк, М.С. Сочетанная антибиотикотерапия / М.С. Поляк. – СПб.: Нестор-История, 2020. – 200 с.

30. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л.С. Страчунский, Ю.Б. Белоусов, С.Н. Козлов. – М.: НИИАХ СГМА, 2002. – 420 с.

31. Решедько, Г.К. Определение чувствительности к антибиотикам: методы, результаты, оценка / Г.К. Решедько // Клиническая антимикробная химиотерапия. – 1999. – № 3. – С. 113–115.

32. Решедько, Г.К. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом / Г.К. Решедько, О.У. Стецюк // Клиническая микробиология и антимикробная терапия. – 2001. – Т. 3, № 4. – С. 348–354.

33. РМГ 29-2013. Государственная система обеспечения единства измерений. Метрология. Основные термины и определения : реком. по межгос. стандартизации : утверждены и введены в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 5 декабря 2013 г. N 2166-ст : взамен РМГ 29-99 : дата введения 2015-01-01. Москва : Стандартиформ, 2014, 60 с. URL: https://nd-gsi.ru/ntd/rmg/rmg_29-2013.pdf (дата обращения: 03.07.2024).

34. Российские рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2024-02. Год утверждения (частота пересмотра): 2024 (пересмотр ежегодно). — МАКМАХ, СГМУ: Смоленск, 2024. — 192 с.

35. Сидоренко, С.В. Исследования распространения антибиотикорезистентности: практическое значение для медицины / С.В. Сидоренко // Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. – Т. 4, № 2. – С. 38–41.

36. Сидоренко, С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С.В. Сидоренко, В.И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2004. – № 44. – С. 263–306.

37. Сизенцов, А.Н. Методы определения антибиотикопродуктивности и антибиотикорезистентности / А.Н. Сизенцов. – Оренбург: ГОУОГУ, 2009. – 102 с.

38. Стецюк, О.У. Сравнение результатов определения чувствительности к антибиотикам грамотрицательных аэробных бактерий диско-диффузионным методом на среде АГВ и агаре Мюллера–Хинтон / О.У. Стецюк, Г.К. Решедько //

Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т. 6, № 2. – С. 155–167.

39. Стратегия и тактика рационального применения антимикробных средств в амбулаторной практике: Евразийские клинические рекомендации / под ред. С. В. Яковлева, С. В. Сидоренко, В. В. Рафальского, Т. В. Спичак. – М.: Пре100 Принт, 2016. – 144 с.

40. Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года. [Электронный ресурс]. – URL: <https://static.government.ru> (дата обращения: 12.07.2024).

41. Страчунский, Л.С. Влияние фармакодинамики различных классов антибактериальных препаратов на режимы их дозирования / Л.С. Страчунский, А.А. Муконин // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – № 4. – С. 40–44.

42. Страчунский, Л.С. Постоянная инфузия β -лактамов как альтернатива традиционным методам введения / Л.С. Страчунский, А.Е. Мягков // Антимикробные препараты. – 2004. – Т. 6, № 1. – С. 32–50.

44. Страчунский, Л.С. Современная антимикробная химиотерапия: руководство для врачей / Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов. – М.: Медицинское информационное агентство, 2017. – 398 с.

45. Супотницкий, М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий / М. В. Супотницкий // Биопрепараты. – 2011. – № 2. – С. 4–44.

46. Сухорукова, М.В. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам: что стоит за результатом / М.В. Сухорукова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т.15, № 3. – С. 219-229.

47. Тагер, А.А. Пористая структура полимеров и механизм сорбции / А.А. Тагер, М.В. Цилипоткина // Успехи химии. – 1978. – Т. 47, № 1. – С. 152–175.

48. Тапальский, Д.В. Методы определения чувствительности к комбинациям антибиотиков грамотрицательных бактерий с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью / Д.В. Тапальский, Л.В. Лагун. – Гомель: Гомельский государственный медицинский университет, 2017. – 21 с.

49. Тапальский, Д.В. Определение чувствительности к антибиотикам методом микроразведений в бульоне: модификация, доступная для всех / Д.В. Тапальский, И.А. Бильский // Клиническая микробиология и антимикробная терапия. – 2018. – Т. 20, № 1. – С. 62–67.

50. Тапальский, Д.В. Потенцирование антибактериальной активности колистина в отношении множественно- и экстремально-резистентных клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* антибиотиками разных групп / Д.В. Тапальский, Т.А. Петровская, А.И. Козлова, М.В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2020. – Т. 22, № 2. – С. 128-136.

51. Тапальский, Д.В. Чувствительность к комбинациям антибиотиков продуцирующих карбапенемазы нозокомиальных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Беларуси / Д.В. Тапальский // Клиническая микробиология и антимикробная терапия. – 2018. – Т. 20, № 3. – С. 182-191.

52. Тумгоева, Р.А. Антибиотикорезистентность - угроза национальной безопасности / Р.А. Тумгоева // Научно-практический электронный журнал Аллея Науки. – 2017. – № 13. – С. 25–29.

53. Федеральные клинические рекомендации «Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем» / Российское общество дерматовенерологов и косметологов // Москва. – 2016. – 768 с.

54. Чёрненькая, Т.В. Чувствительность к антибиотикам микроорганизмов, выделенных из крови реанимационных больных многопрофильного стационара скорой помощи / Т.В. Чёрненькая, Л.А. Борисова, Т.Ю. Воробьёва, И.В. Александрова, Д.А. Косолапов // Антибиотики и химиотерапия. – 2011. – Т. 56, № 5-6. – С. 30–36.

55. Чучалин, А.Г. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике / А.Г. Чучалин, А.И. Синопальников, Р.С. Козлов, И.Е. Тюрин, С.А. Рачина // КМАХ. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 186-225.

56. Шаталова, Е.В. Микробиологический мониторинг — важнейший компонент системы эпидемиологического надзора за нозокомиальными инфекциями / Е.В. Шаталова, О.В. Парахина, С.А. Охотникова // Российский медицинский журнал. – 2016. – Т. 22, № 5. – С. 247—249.

57. Шульгина, Л.В. Антибиотики в объектах аквакультуры и их экологическая значимость / Л.В. Шульгина, Е.В. Якуш, Ю.П. Шульгин, В.В. Шендерюк, Н.Н. Чукалова, Л.П. Бахолдина // Известия ТИНРО. – 2015. – Т. 181, № 2. – С. 216–230.

58. Alshaer, M.H. Meropenem population pharmacokinetics and simulations in plasma, cerebrospinal fluid, and brain tissue / M.H. Alshaer, B. Barlow, N. Maranchick, M. Moser, L. Gramss, H. Burgmann, V.A. Jalali, M. Wöfl-Duchek, W. Jäger, S. Poschner, W. Plöchl, A. Reinprecht, K. Rössler, A. Gruber, M. Zeitlinger, C.A. Peloquin, A. Hosmann // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2022. – Vol. 66, № 8. – P. e0043822.

59. Andes, D. Treatment of infections with ESBL-producing organisms: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations / D. Andes, W.A. Craig // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2005. – Vol. 11. – P. 10–17.

60. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019. ECDC. [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019> (дата обращения: 06.07.2024).

61. Armand-Lefevre, L. Emergence of imipenem-resistant Gram-negative bacilli in intestinal flora of intensive care patients / L. Armand-Lefevre, C. Angebault, F. Barbier, E. Hamelet, G. Defrance, E. Ruppé, R. Bronchard, R. Lepeule, J.C. Lucet, A. El Mniai, M. Wolff, P. Montravers, P. Plésiat, A. Andremont // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57, № 3. – P. 1488–1495.

62. Aslam, B. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis / B. Aslam, W. Wang, M.I. Arshad, M. Khurshid, S. Muzammil, M.H. Rasool, M.A. Nisar, R.F. Alvi, M.A. Aslam, M.U. Qamar, M.K.F. Salamat, Z. Baloch // *Infection and Drug Resistance.* – 2018. – Vol. 11. – P. 1645-1658.

63. Baker, C.M. Beyond dose: pulsed antibiotic treatment schedules can maintain individual benefit while reducing resistance / C.M. Baker, M.J. Ferrari, K. Shea // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 58-66.

64. Bassett, M. New antibiotics and antimicrobial combination therapy for the treatment of gram-negative bacterial infections / M. Bassetti, E. Righi // *Current opinion in critical care*. – 2015. – Vol. 21, № 5. – P. 402-411.

65. Bauer, A.W. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method / A.W. Bauer, W.M. Kirby, J.C. Sherris, M. Turck // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1966. – Vol. 45, № 4. – P. 493–496.

66. Ben, Y. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review / Y. Ben, C. Fu, M. Hu, L. Liu, M.H. Wong, C. Zheng // *Environ. Res.* – 2019. – Vol. 169. – P. 483–493.

67. Benko, R. Prevalence and antibiotic resistance of ESKAPE pathogens isolated in the emergency department of a tertiary care teaching hospital in Hungary: A 5-Year Retrospective Survey / R. Benko, M. Gajdács, M. Matuz, G. Bodó, A. Lázár, E. Hajdú, E. Papfalvi, P. Hannauer, P. Erdélyi, Z. Petó // *Antibiotics*. – 2020. – Vol. 9, № 9. – P. 624.

68. Berghaus, L.J. Comparison of Etest, disk diffusion, and broth macrodilution for *in vitro* susceptibility testing of *Rhodococcus equi* / L.J. Berghaus, S. Giguère, K. Guldbeck, E. Warner, U. Ugorji, R.D. Berghaus // *J. Clin. Microbiol.* – 2015. – Vol. 53, № 1. – P. 314–318.

69. Bilbao-Meseguer, I. Augmented renal clearance in critically ill patients: a systematic review / I. Bilbao-Meseguer, A. Rodríguez-Gascón, H. Barrasa // *Clin. Pharm.* – 2018. – Vol. 57, № 9. – P. 1107–1121.

70. Blai, J.M. Molecular mechanisms of antibiotic resistance / J.M. Blai, M.A. Webber, A.J. Baylay, D.O. Ogbolu, L.J. Piddock // *Nat Rev Microbiol.* – 2015. – Vol. 13, № 1. – P. 42–51.

71. Blake, K.L. Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal

agents / K.L. Blake, A.J. O'Neill // *J Antimicrob Chemother.* – 2013. – Vol. 68, № 1. – P. 12–16.

72. Cavaco, L.M. Evaluation of quinolones for use in detection of determinants of acquired quinolone resistance, including the new transmissible resistance mechanisms *QnrA*, *QnrB*, *QnrS* and *Aac (60) Ib-Cr*, in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and determinations of wild-type distributions / L.M. Cavaco, F.M. Aarestrup // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47, № 9. – P. 2751–2758.

73. Czaplewski, L. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review / L. Czaplewski, R. Bax, M. Clokie, M. Dawson, H. Fairhead, V.A. Fischetti, S. Foster, B.F. Gilmore, R.E. Hancock, D. Harper, I.R. Henderson, K. Hilpert, B.V. Jones, A. Kadioglu, D. Knowles, S. Ólafsdóttir, D. Payne, S. Projan, S. Shaunak, J. Silverman, C.M. Thomas, T.J. Trust, P. Warn, J.H. Rex // *Lancet Infect Dis.* – 2016. – Vol. 16, № 2. – P. 239–251.

74. CLSI document M100. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. – Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024. – 381 p.

75. CLSI document M45-A2. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. – Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010. – 206 p.

76. Comité de L'antibiogramme de La Société Française de Microbiologie Recommendations. V.1.0, 2022. URL: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2022/05/CASFM2022_V1.0.pdf (дата обращения: 19.06.2024).

77. Cooper, K.E. The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin / K.E. Cooper, D. Woodman // *Journal of Pathological Bacteriology.* – 1946. – Vol. 58. – P. 75-84.

78. Copsy-Mawer, S. Fastidious anaerobe agar (FAA) as a suitable medium for antimicrobial susceptibility testing (AST) of anaerobes by agar dilution / S. Copsy-Mawer, S. Scotford, B. Copsy-Mawer, C. Davis, M. Perry, T. Morris, H. Hughes // *Access Microbiol.* – 2019. – Vol. 1, № 7. – P. 4.

79. Craig, W.A. Pharmacodynamics of antimicrobials: general concepts and applications / W.A. Craig // Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice. – CRC Press, 2002. – P. 1–22.

80. Crump, J.A. Reevaluating fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella enterica* serotype typhi and for non-typhi *Salmonellae* / J.A. Crump, T.J. Barrett, J.T. Nelson, F.J. Angulo // Clin. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 37, № 1. – P. 75–81.

81. da Cunha, B.R. Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go? / B.R. da Cunha, L.P. Fonseca, C.R.C. Calado // Antibiotics. – 2019. – Vol. 8, № 2. – P.45.

82. Davies, J. Origins and evolution of antibiotic resistance / J. Davies, D. Davies // Microbiology and molecular biology reviews. – 2010. – Vol. 74, № 3. – P. 417–433.

83. Delignette-MuUer, M.L. An accurate diffusion method for determining bacterial sensitivity to antibiotics / M.L. Delignette-MuUer, J.P. Flandrois // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1994. – Vol. 34, № 1. – P. 73-81.

84. Dhaese, S.A.M. Population pharmacokinetics of continuous infusion of piperacillin in critically ill patients / S.A.M. Dhaese, J.A. Roberts, M. Carlier, A.G. Verstraete, V. Stove, J.J. De Waele // Int. J Antimicrob. Agents. – 2018. – Vol. 51, № 4. – P. 594–600.

85. Dhand, A. Reduced vancomycin susceptibility among clinical *Staphylococcus aureus* isolates ('the MIC Creep'): implications for therapy / A. Dhand, G. Sakoulas // F1000 Med. Rep. – 2012. – Vol. 4. – P. 4.

86. Durand, G.A. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives / G.A. Durand, D. Raoult, G. Dubourg // Int J Antimicrob Agents. – 2019. – Vol. 53, № 4. – P. 371–382.

87. Duszynska, W. Therapeutic drug monitoring of amikacin in septic patients / W. Duszynska, F.S. Taccone, M. Hurkacz, B. Kowalska-Krochmal, A. Wiela-Hojeńska, A. Kübler // Crit Care. – 2013. – Vol. 17, № 4. – P. 165.

88. Economou, V. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria / V. Economou, P. Gousia // Infect Drug Resist. – 2015. – Vol. 8. – P. 49–61.

89. Elwell, L.P. Antibacterial activity and mechanism of action of 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A509U) / L.P. Elwell, R. Ferone, G.A. Freeman, J.A. Fyfe, J.A. Hill, P.H. Ray, C.A. Richards, S.C. Singer, V.B. Knick, J.L. Rideout // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1987. – Vol. 31, № 2. – P. 274–280.

90. EUCAST Version 14.0. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. – Introduced 2024-01-01. – Sweden : The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2024. – 115 p.

91. EUCAST Version 14.0. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST – Introduced 2024-01-01. – Sweden : The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2024. – 26 p.

92. Ferry, T. Gentamicin-vancomycin-colistin local antibiotherapy in a cement spacer in a 54-year-old haemophilic patient with relapsing plurimicrobial severe prosthetic joint infection / T. Ferry, R. Desmarchelier, S. Magréault, F. Valour, B.J.I. Lyon // *BMJ Case Rep.* – 2017. – № 1. – P. 1-2.

93. Finazzi, S. Tissue penetration of antimicrobials in intensive care unit patients: a systematic review-part I / S. Finazzi, G. Luci, C. Olivieri, M. Langer, G. Mandelli, A. Corona, B. Viaggi, A. Di Paolo // *Antibiotics.* – 2022. – Vol. 11, № 9. – P. 1164.

94. Fluit, A.C. Molecular detection of antimicrobial resistance/ A.C. Fluit, M.R. Visser, F. Schmitz // *Clinical Microbiology Reviews.* – 2001. – Vol. 14, № 4. – P. 836–871.

95. Gao, X. Plasma metabolomic profiling to reveal antipyretic mechanism of Shuang-huang-lian injection on yeast-induced pyrexia rats / X. Gao, M. Guo, Q. Li, L. Peng, H. Liu, L. Zhang, X. Bai, Y. Wang, J. Li, C. Cai // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 6. – P. 100017.

96. Giedraitiene, A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria / A. Giedraitienė, A. Vitkauskienė, R. Naginienė, A. Pavilonis // *Medicina.* – 2011. – Vol. 47, № 3. – P. 46–137.

97. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. [Электронный ресурс]. – URL: https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy.htm/en/ (дата обращения: 06.06.2024).

98. Goldstein, F.W. Comparison of Etest with agar dilution for testing the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and other multidrug-resistant bacteria to colistin / F.W. Goldstein, A. Ly, M.D. Kitzis // J. Antimicrob. Chemother. – 2007. – Vol. 59, № 5. – P. 1039–1040.

99. Golus, J. The agar microdilution method – a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts / J. Golus, R. Sawicki, J. Widelski, G. Ginalska // J. Appl. Microbiol. – 2016. – Vol. 121, № 5. – P. 1291–1299.

100. Guilhaumou, R. Optimization of the treatment with beta-lactam antibiotics in critically ill patients—guidelines from the french society of pharmacology and therapeutics (Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique—SFPT) and the French Society of Anaesthesia and Intensive Care Medicine (Société Française d'Anesthésie et Réanimation—SFAR) / R. Guilhaumou, S. Benaboud, Y. Bennis // Crit. Care. – 2019. – Vol. 23, № 1. – P. 1–20.

101. Gupta, P. Comparative evaluation of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution in susceptibility testing of amphotericin B, voriconazole and caspofungin against clinical *Aspergillus* isolates / P. Gupta, V. Khare, D. Kumar, A. Ahmad, G. Banerjee, M. Singh // J. Clin. Diagn. Res. – 2015. – Vol. 9, № 1. – P. 4-7.

102. Hakenbeck, R. Molecular mechanisms of β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* / R. Hakenbeck, R. Brückner, D. Denapate, P. Maurer // Future Microbiol. – 2012. – Vol. 7, № 3. – P. 395–410.

103. Hossain, T.J. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations / T.J Hossain // European Journal of Microbiology and Immunology. – 2024. – Vol. 14, №. 2. – P. 97-115.

104. Huwyler, T. Cefepime plasma concentrations and clinical toxicity: a retrospective cohort study / T. Huwyler, L. Lenggenhager, M. Abbas, K. Ing Lorenzini, S. Hughes, B. Huttner, A. Karmime, I. Uçkay, E. von Dach, P. Lescuyer, S. Harbarth, A. Huttner // Clin. Microbiol. Infect. – 2017. – Vol. 23, № 7. – P. 454–459.

105. Ingram, P.R. Risk factors for nephrotoxicity associated with continuous vancomycin infusion in outpatient parenteral antibiotic therapy / P.R. Ingram, D.C. Lye, P.A. Tambyah, W.P. Goh, V.H. Tam, D.A. Fisher // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2008. – Vol. 62, № 1. – P. 168–171.

106. Intra, J. In vitro activity of antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* spp. by E-test method and non-supplemented mueller–hinton agar plates / J. Intra, C. Sarto, S. Mazzola, C. Fania, N. Tiberti, P. Brambilla // *Mycopathologia.* – 2019. – Vol. 184, № 4. – P. 517–523.

107. Jorgensen, J.H. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices / J.H. Jorgensen, M.J. Ferraro // *Medical microbiology.* – 2009. – Vol. 49, №11. – P. 1749–1755.

108. Jorgensen, J.H. Detection of penicillin and extended-spectrum cephalosporin resistance among *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates by use of the E test / J.H. Jorgensen, M.J. Ferraro, M.L. McElmeel, J. Spargo, J.M. Swenson, F.C. Tenover // *J. Clin. Microbiol.* – 1994. – Vol. 32, № 1. – P. 159–163.

109. Jeverica, S. Evaluation of the routine antimicrobial susceptibility testing results of clinically significant anaerobic bacteria in a Slovenian tertiary-care hospital in 2015 / S. Jeverica, U. Kolenc, M. Mueller-Premru, L. Papst // *Anaerobe.* – 2017. – Vol. 47. – P. 64–69.

110. Kapoor, G. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians / G. Kapoor, S. Saigal, A. Elongavan // *Anaesthesiology Clinical Pharmacology.* – 2017. – Vol. 33, № 3. – P. 300–305.

111. Karaiskos, I. Carbapenem-sparing strategies for ESBL producers: when and how / I. Karaiskos, H. Giamarellou // *Antibiotics.* – 2020. – Vol. 9, № 2. – P. 61.

112. Khezripour, A.R. Serial dilution bioassay for the detection of antibacterial potential of ZnSe quantum dots and their Fourier transform infra-red spectroscopy / A.R. Khezripour, D. Souri, H. Tavafi, M. Ghabooli // *Measurement.* – 2009. – Vol. 148. – P. 106939.

113. Kosanić, M. Lichen secondary metabolites as potential antibiotic agents / M. Kosanić, B. Ranković // *Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*. - 2nd ed. – Switzerland: Cham, 2019. – P. 99–127.

114. Kristiansson, E. Pyrosequencing of antibioticcontaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements / E. Kristiansson, J. Fick, A. Janzon, R. Grabic, C. Rutgersson, B. Weijdegård, H. Söderström, D.G. Larsson // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 2. – P. e17038.

115. Kullar, R. Impact of vancomycin exposure on outcomes in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: support for consensus guidelines suggested targets / R. Kullar, S.L. Davis, D.P. Levine, M.J. Rybak // *Clin. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 52, № 8. – P. 975–981.

116. Lacy, M.K. The Pharmacodynamics of aminoglycosides / M.K. Lacy, D.P. Nicolau, C.H. Nightingale, R. Quintiliani // *Clin. Infect. Dis.* – 1998. –Vol. 27, № 1. – P. 23–27.

117. Lamoth, F. High cefepime plasmaconcentrations and neurological toxicity in febrile neutropenic patients with mild impairment of renal function / F. Lamoth, T. Buclin, A. Pascual, S. Vora, S. Bolay, L.A. Decosterd, T. Calandra, O. Marchetti // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54, № 10. – P. 4360–4367.

118. Landersdorfer, C.B. Key challenges in providing effective antibiotic therapy for critically ill patients with bacterial sepsis and septic shock / C.B. Landersdorfer, R.L. Nation // *Clin. Pharm.* – 2021. – Vol. 109, № 4. – P. 892–904.

119. Liao, H. The main bioactive compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi. for alleviation of inflammatory cytokines: A comprehensive review / H. Liao, J. Ye, L. Gao, Y. Liu // *Biomed Pharmacother.* – 2021. – Vol. 133. – P. 110917.

120. Liao, J.J.Z. Sample size calculation for an agreement study / J.J.Z. Liao // *Pharmaceutical statistics*. – 2010. – Vol. 9, №. 2. – P. 125-132.

121. Lo-Ten-Foe, J.R. Comparative Evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains / J.R. Lo-Ten-Foe, A.M.G.A. de Smet, B.M.W. Diederer, J.A.

Kluytmans, P.H. van Keulen // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – Vol. 51, № 10. – P. 3726–3730.

122. Lushniak, B.D. Antibiotic resistance: a public health crisis / B.D. Lushniak // *PublicHealth Rep.* – 2014. – Vol. 129, № 4. – P. 314–316.

123. Magréault, S. When and how to use MIC in Clinical Practice? / S. Magréault, F. Jauréguy, E. Carbonnelle, J.-R Zahar // *Antibiotics.* – 2022. – Vol. 11, № 12. – P. 1748.

124. Martínez, J.L. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials / J.L. Martínez // *Frontiers in Microbiology.* – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 1–3.

125. Martinez-Martinez, L. Quinolone resistance from a transferable plasmid / L. Martinez-Martinez, A. Pascual, G.A. Jacoby // *Lancet.* – 1998. – Vol. 51, № 1. – P. 797–799.

126. Mascellino, M.T. *In vitro* activity of zidovudine alone and in combination with ciprofloxacin against *Salmonella* and *Escherichia coli* / M.T. Mascellino, E. Iona, F. Iegri, P. De Gregoris, S. Farinelli // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 1993. – Vol. 7, № 1. – P. 23–28.

127. McGuinness, W.A. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* / W.A. McGuinness, N. Malachowa, F.R. DeLeo // *Yale J. Biol. Med.* – 2017. – Vol. 90, № 2. – P. 269–281.

128. McLaughlin, M. Correlations of antibiotic use and carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae* / M. McLaughlin, M.R. Advincula, M. Malczynski, C. Qi, M. Bolon, M.H. Scheetz // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57, № 10. – P. 5131–5133.

129. Mitsuya, H. Strategies for antiviral therapy in AIDS / H. Mitsuya, S. Broder // *Nature.* – 1987. – Vol. 325, № 6107. – P. 773–778.

130. Mohanty, S. Use of the cefepime-clavulanate ESBL Etest for detection of extended-spectrum beta-lactamases in *AmpC* co-producing bacteria / S. Mohanty, R. Gaiind, R. Ranjan, M. Deb // *J. Infect. Dev. Ctries.* – 2010. – Vol. 4, № 1. – P. 24–29.

131. Mohr, K.I. History of antibiotics research / K.I. Mohr / *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2016. – Vol. 398. – P. 237–272.

132. Moise-Broder, P.A. Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections / P.A. Moise-Broder, A. Forrest, M.C. Birmingham, J.J. Schentag // *Clin. Pharm.* – 2004. – Vol. 43, № 13. – P. 925–942.

133. Monno, R. *In vitro* antimicrobial properties of azidothymidine (AZT) / R. Monno, L. Marcuccio, M.A. Valenza, E. Leone, C. Bitetto, A. Larocca, P. Maggi, M. Quarto // *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* – 1997. – Vol. 44, № 2. – P.165–171.

134. Munita, M. Mechanisms of antibiotic resistance / M. Munita, A. Cesar // *Microbiology Spectrum.* – 2016. – Vol. 4, № 2. – P. 1–24.

135. Nicolaou, K.C. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis / K.C. Nicolaou, S. Rigol // *J Antibiot (Tokyo).* – 2018. – Vol. 71, № 2. – P. 153–184.

136. Nicolau, D.P. Carbapenems: A potent class of antibiotics / D.P. Nicolau // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 23–37.

137. Pallasch, T.J. Antibiotics: past, present, and future / T.J. Pallasch // *CDA J.* – 1986. – Vol. 14, № 5. – P. 65–68.

138. Parry, C.M. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal *Salmonellae* / C.M. Parry, E. Threlfall // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 21, № 5. – P. 531–538.

139. Paul, M. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine) / M. Paul, E. Carrara, P. Retamar, T. Tängdén, R. Bitterman, R.A. Bonomo, J. de Waele, G.L. Daikos, M. Akova, S. Harbarth, C. Pulcini, J. Garnacho-Montero, K. Seme, M. Tumbarello, P.C. Lindemann, S. Gandra, Y. Yu, M. Bassetti, J.W. Mouton, E. Tacconelli, J. Rodríguez-Baño // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2022. – Vol. 28, № 4. – P. 521–547.

140. Perez, F. Can we really use β -lactam/ β -lactam inhibitor combinations for the treatment of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria / F. Perez, R.A. Bonomo // Clin. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 54, № 2. – P. 175–177.

141. Périchon, B. Synergism between β -lactams and glycopeptides against VanA-type Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and heterologous expression of the *vanA* operon / B. Périchon, P. Courvalin // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2006. – Vol. 50, № 11. – P. 3622–3630.

142. Peterson, L.R. Antibiotic policy and prescribing strategies for therapy of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: the role of piperacillin-tazobactam / L.R. Peterson // Clin. Microbiol. Infect. – 2008. – Vol. 14. – P. 181–184.

143. Prabha, R. Phenotypic detection of Extended Spectrum Beta-Lactamase producing uropathogens using DDST, PCT, Chrom agar and E-test / R. Prabha, J. M. Easow, M. Swapna // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2016. – Vol. 5, № 4. – P. 565–577.

144. Prakash, V. Vancomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates differ based upon the susceptibility test method used / V. Prakash, I.I. JS Lewis, J.H. Jorgensen // Antimicrob. Agents Chemother. – 2008. – Vol. 52, № 12. – P. 4528.

145. Read, A.F. Antibiotic resistance management / A.F. Read, R.J. Woods // Evol Med Public Health. – 2014. – Vol. 147, № 1. – P.147.

146. Retamar, P. Impact of the MIC of piperacillin-tazobactam on the outcome of patients with bacteremia due to extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* / P. Retamar, L. López-Cerero, M.A. Muniain // Antimicrob. Agents Chemother. – 2013. – Vol. 57, № 7. –P. 3402–3404.

147. Reygaert, W.C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria / W.C. Reygaert / AIMS Microbiol. – 2018. – Vol. 4, № 3. – P. 482–501.

148. Roberts, J.A. DALI: defining antibiotic levels in intensive care unit patients: are current β -lactam antibiotic doses sufficient for critically ill patients? / J.A. Roberts, S.K. Paul, M. Akova, M. Bassetti, J.J. De Waele, G. Dimopoulos, K.M. Kaukonen, D.

Koulenti, C. Martin, P. Montravers, J. Rello, A. Rhodes, T. Starr, S.C. Wallis, J. Lipman // *Clin. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 58, № 8. – P. 1072–1083.

149. Rodríguez-Baño, J. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, ampc-, and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* / J. Rodríguez-Baño, B. Gutiérrez-Gutiérrez, I. Machuca, A. Pascual // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2018. – Vol. 31, № 2. – P. e00079-17.

150. Rodríguez-Bano, J. β -lactam/ β -lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts / J. Rodríguez-Bano, M.D. Navarro, P. Retamar, E. Picón, Á. Pascual // *Clin. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 54, № 2. – P. 167–174.

151. Rossolini, G.M. Update on the antibiotic resistance crisis / G.M. Rossolini, F. Arena, P. Pecile, S. Pollini // *Curr Opin Pharmacol.* – 2014. – Vol. 18. – P. 56–60.

152. Rybak, M.J. Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections / M.J. Rybak, J. Le, T.P. Lodise, D.P. Levine, J.S. Bradley, C. Liu, B.A. Mueller, M.P. Pai, A. Wong-Beringer, J.C. Rotschafer, K.A. Rodvold, H.D. Maples, B.M. Lomaestro // *Am. J. Health Syst. Pharm.* – 2020. – Vol. 77, № 11. – P. 835–864.

153. Sanbongi, Y. Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan / Y. Sanbongi, T. Ida, M. Ishikawa, Y. Osaki, H. Kataoka, T. Suzuki, K. Kondo, F. Ohsawa, M. Yonezawa // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48, № 6. – P. 2244–2250.

154. Sandner-Miranda, L. The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia* / L. Sandner-Miranda, P. Vinuesa, A. Cravioto, R. Morales-Espinosa // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 828.

155. Seguin, P. Plasma and peritoneal concentration following continuous infusion of cefotaxime in patients with secondary peritonitis / P. Seguin, M.C. Verdier, C. Chanavaz, C. Engrand, B. Laviolle, P.Y. Donnio, Y. Mallédant // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2009. – Vol. 63, № 3. – P. 564–567.

156. Schmid, A. Monotherapy versus combination therapy for multidrug-resistant gram-negative infections: systematic review and meta-analysis / A. Schmid, A.

Wolfensberger, J. Nemeth, P.W. Schreiber, H. Sax, S.P. Kuster // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 15290.

157. Schwalbe, R. Antimicrobial susceptibility testing protocols / R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A.C. Goodwin. – Crc Press, 2007. – 432 p.

158. Soriano, A. Ceftazidime-Avibactam for the treatment of serious Gram-negative infections with limited treatment options: a systematic literature review / A. Soriano, Y. Carmeli, A.S. Omrani, L.S.P. Moore, M. Tawadrous, P. Irani // *Infect. Dis.* – 2021. – Vol. 10, № 4. – P. 1989–2034.

159. Spellberg, B. New societal approaches to empowering antibiotic stewardship / B. Spellberg, A. Srinivasan, H.F. Chambers // *JAMA.* – 2016. – Vol. 315, № 12. – P. 1229–1230.

160. Stapleton, P.D. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation / P.D. Stapleton, P.W. Taylor // *Sci. Prog.* – 2002. – Vol. 85. – P. 57–72.

161. Strahilevitz, J. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat / J. Strahilevitz, G.A. Jacoby, D.C. Hooper, A. Robicsek // *Clinical Microbiology Reviews.* – 2009. – Vol. 22, № 4. – P. 664–689.

162. Subramaniam, G. Antibiotic resistance—a cause for reemergence of infections / G. Subramaniam, M. Girish // *Indian J Pediatr.* – 2020. – Vol. 87, № 11. – P. 937–944.

163. Sumi, C.D. What antibiotic exposures are required to suppress the emergence of resistance for Gram-Negative bacteria? / C.D. Sumi, A.J. Hefernan, J. Lipman, J.A. Roberts, F.B. Sime // *Clinical Pharmacokinetics.* – 2019. – Vol. 58, № 11. – P. 1407–1443.

164. Sun, D. Editorial: horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance / D. Sun, K. Jeannot, Y. Xiao, C.W. Knapp // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1933.

165. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018 - Surveillance report. ECDC. [Электронный ресурс]. – URL:

<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018> (дата обращения: 08.07.2024).

166. Syal, K. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests / K. Syal, M. Mo, H. Yu, R. Iriya, W. Jing, S. Guodong, S. Wang, T.E. Grys, S.E. Haydel, N. Tao // *Theranostics*. – 2017. – Vol. 7, № 7. – P. 1795–1805.

167. Tabah, A. Use of antimicrobials for bloodstream infections in the intensive care unit, a clinically oriented review / A. Tabah, J. Lipman, F. Barbier, N. Buetti, J.F. Timsit // *Antibiot*. – 2022. – Vol. 11, № 3. – P. 362.

168. Ten threats to global health in 2019. [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019> (дата обращения: 30.06.2024).

169. Tolmasky, M. Bacterial resistance to aminoglycosides and beta-lactams / M. Tolmasky // *Frontiers in Bioscience*. – 2000. – Vol. 5. – P. 9–20.

170. Tsuji, B.T. International consensus guidelines for the optimal use of the polymyxins: endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-Infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP) / B.T. Tsuji, J.M. Pogue, A.P. Zavascki, M. Paul, G.L. Daikos, A. Forrest, D.R. Jacobbe, C. Viscoli, H. Giamarellou, I. Karaiskos, D. Kaye, J.W. Mouton, V.H. Tam, V. Thamlikitkul, R.G. Wunderink, J. Li, R.L. Nation, K.S. Kaye // *Pharmacotherapy*. – 2019. – Vol. 39, № 1. – P. 10–39.

171. Turnidge, J. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values / J. Turnidge, G. Kahlmeter, G. Kronvall // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2006. – Vol. 12, № 3. – P. 418–425.

172. Ubukata, K. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* / K. Ubukata, Y. Shibasaki, K. Yamamoto, N. Chiba, K.

Hasegawa, Y. Takeuchi, K. Sunakawa, M. Inoue, M. Konno // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45, № 6. – P. 1693–1699.

173. Ubukata, K. Differentiation of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* from other *H. influenzae* strains by a disc method / K. Ubukata, N. Chiba, K. Hasegawa, Y. Shibasaki, K. Sunakawa, M. Nonoyama, S. Iwata, M. Konno // *J. Infect Chemother.* – 2002. – Vol. 8, № 1. – P. 50–58.

174. Van Boeckel, T.P. Global trends in antimicrobial use in food animals / T.P. van Boeckel, C. Brower, M. Gilbert, B.T. Grenfell, S.A. Levin, T.P. Robinson, A. Teillant, R. Laxminarayan // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2015. – Vol. 112, № 18. – P. 5649–5654.

175. Van Dyck, E. Comparison of E Test with agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* / E. Van Dyck, H. Smet, P. Piot // *Journal of clinical microbiology.* – 1994. – Vol. 32, № 6. – P. 1586-1588.

176. Varela, N.P. Comparison of Agar Dilution and E-test for antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter coli* isolates recovered from 80 Ontario swine farms / N.P. Varela, R. Friendship, C. Dewey, A. Valdivieso // *Can. J. Vet. Res.* – 2008. – Vol. 72, № 2. – P. 168–174.

177. Ventola, C.L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats / C.L. Ventola // *P T.* – 2015. – Vol. 40, № 4. – P. 277–283.

178. Viaggi, B. Tissue penetration of antimicrobials in intensive care unit patients: a systematic review-part II / B. Viaggi, A. Cangialosi, M. Langer // *Antibiotics.* – 2022. – Vol. 11, № 9. – P. 1193.

179. Voulgari, E. Carbapenemaseproducing *Enterobacteriaceae*: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? / E. Voulgari, A. Poulou, V. Koumaki, A. Tsakris // *Future Microbiol.* – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 27–39.

180. Watkins, R.R. Overview: global and local impact of antibiotic resistance / R.R. Watkins, R.A. Bonomo // *Infect Dis Clin North Am.* – 2016. – Vol. 30, № 2. – P. 313–322.

181. Wellington, E.M. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria / E.M. Wellington, A.B. Boxall, P.

Cross, E.J. Feil, W.H. Gaze, P.M. Hawkey, A.S. Johnson-Rollings, D.L. Jones, N.M. Lee, W. Otten, C.M. Thomas, A.P. Williams // *Lancet Infect Dis.* – 2013. – Vol. 13, № 2. – P. 155–165.

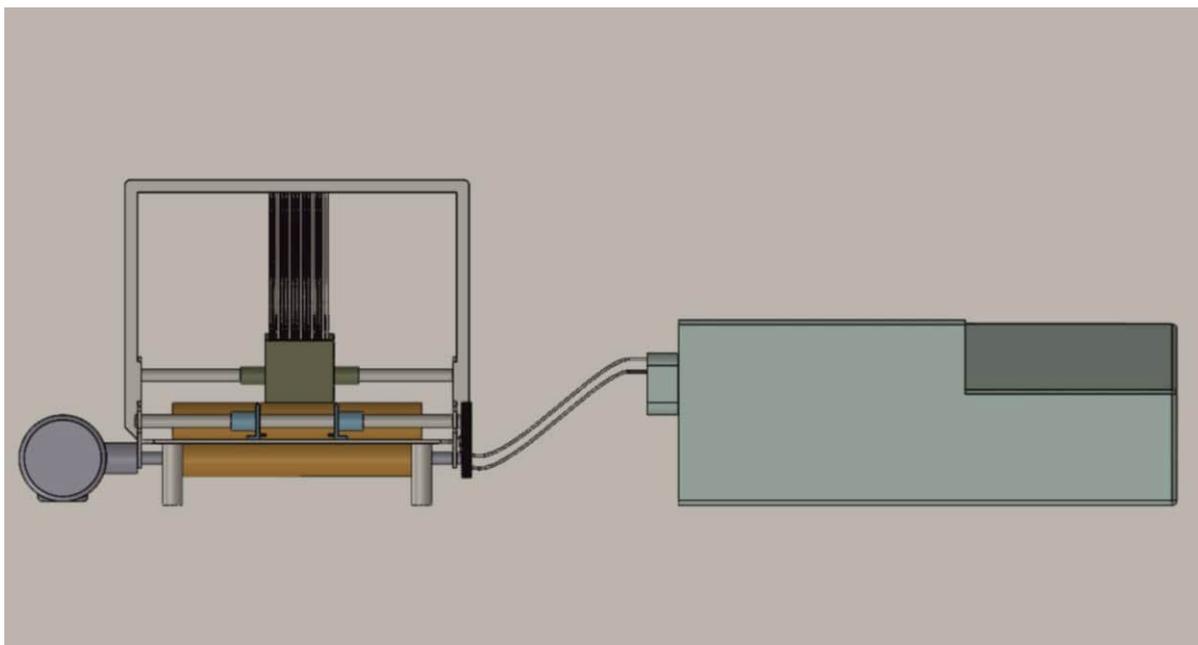
182. WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health. [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.who.int/southeastasia/news/detail/30-04-2014-who-s-first-global-report-on-antibiotic-resistance-reveals-serious-worldwide-threat-to-public-health> (дата обращения: 09.07.2024).

183. Wiegand, I. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances / I. Wiegand, K. Hilpert, R.E. Hancock // *Nature protocols.* – 2008. – Vol. 3, № 2. – P. 163–175.

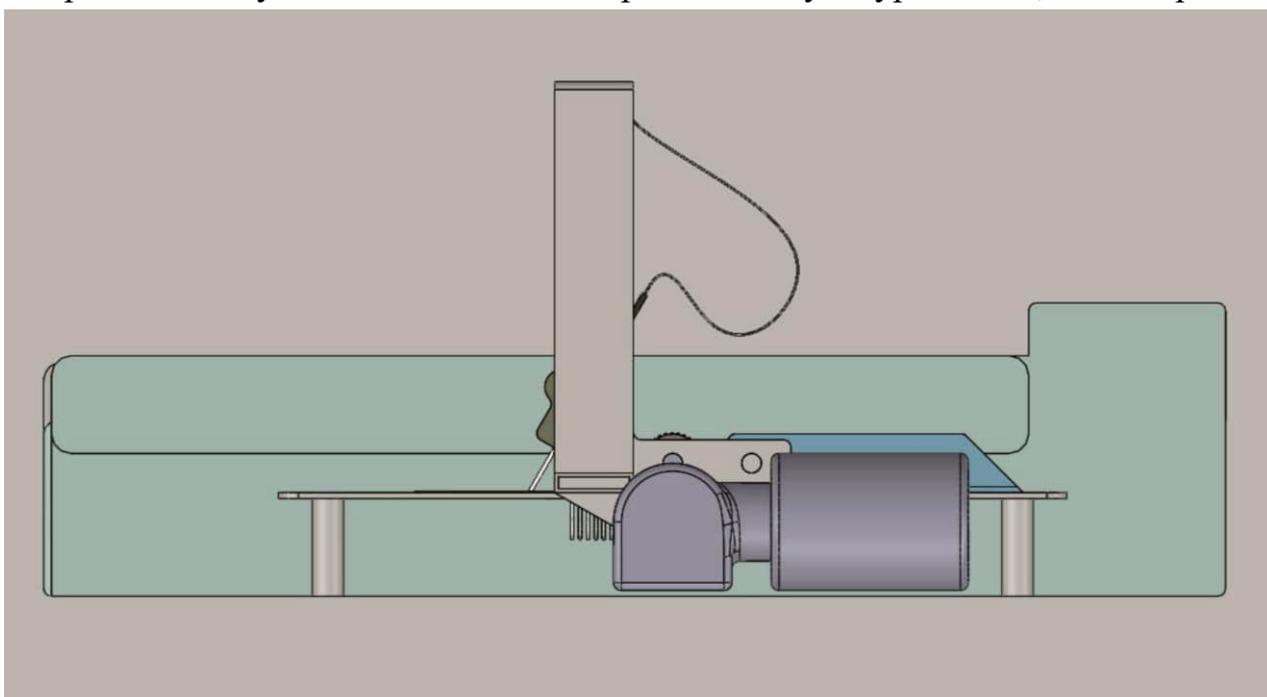
184. Wilcox, M. Reporting elevated vancomycin minimum inhibitory concentration in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: consensus by an International Working Group / M. Wilcox, S. Al-Obeid, A. Gales, R. Kozlov, J.A. Martínez-Orozco, F. Rossi, S. Sidorenko, J. Blondeau // *Future microbiology.* – 2019. – Vol. 14, № 4. – P. 345-352.

185. Wilkinson, J.M. Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts / J.M. Wilkinson // *Mod. Phytomedicine.* – John Wiley and Sons, Ltd, 2006. – P. 157–171.

186. Woodford, N. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance / N. Woodford, J.F. Turton, D.M. Livermore // *FEMS Microbiol Rev.* – 2011. – Vol. 35, № 5. – P. 736–755.

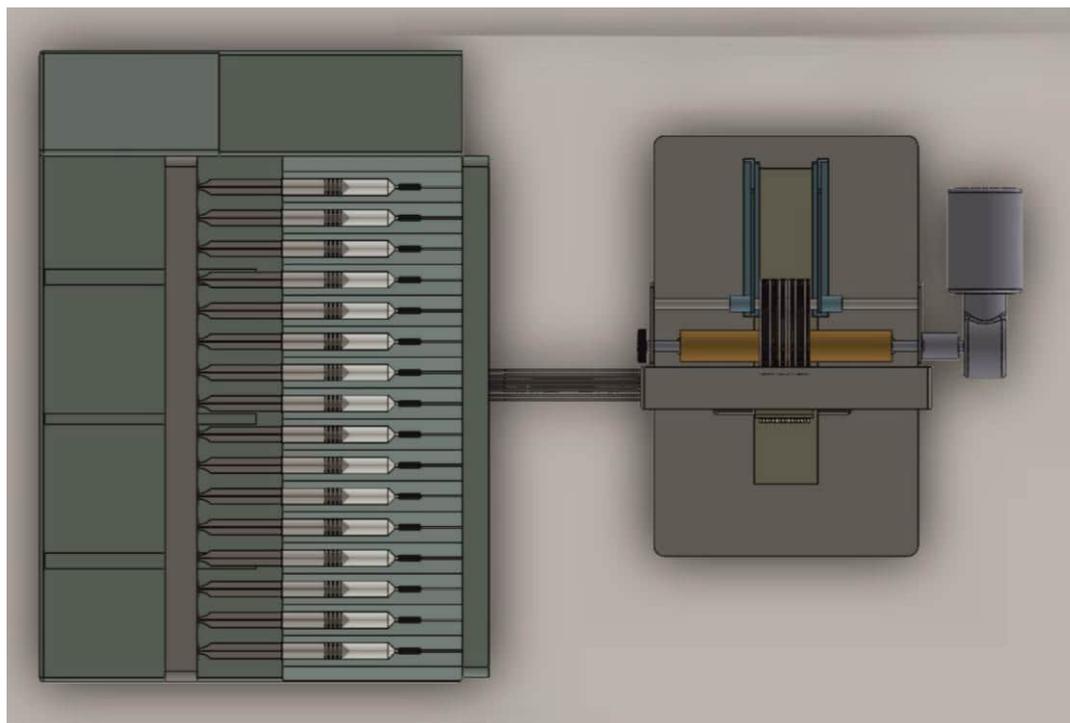
ПРИЛОЖЕНИЕ

1.1 — Устройство для изготовления тест-полосок для количественного определения чувствительности бактериальных культур к АМП, вид спереди

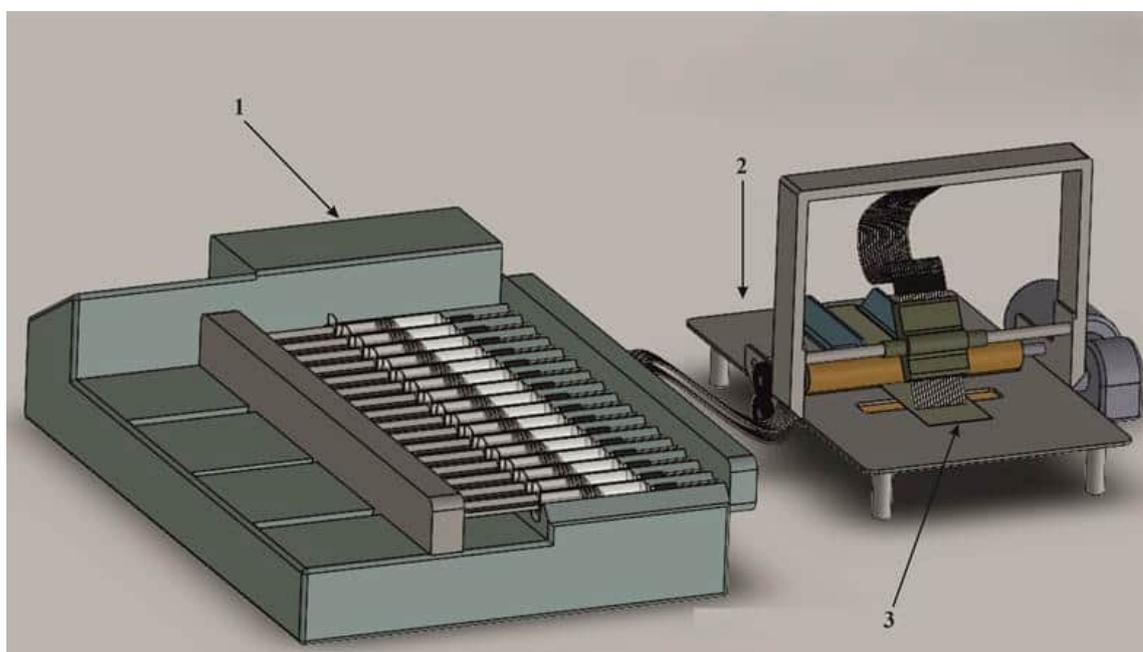


1.2 — Устройство для изготовления тест-полосок для количественного определения чувствительности бактериальных культур к АМП, вид сбоку

Продолжение приложения

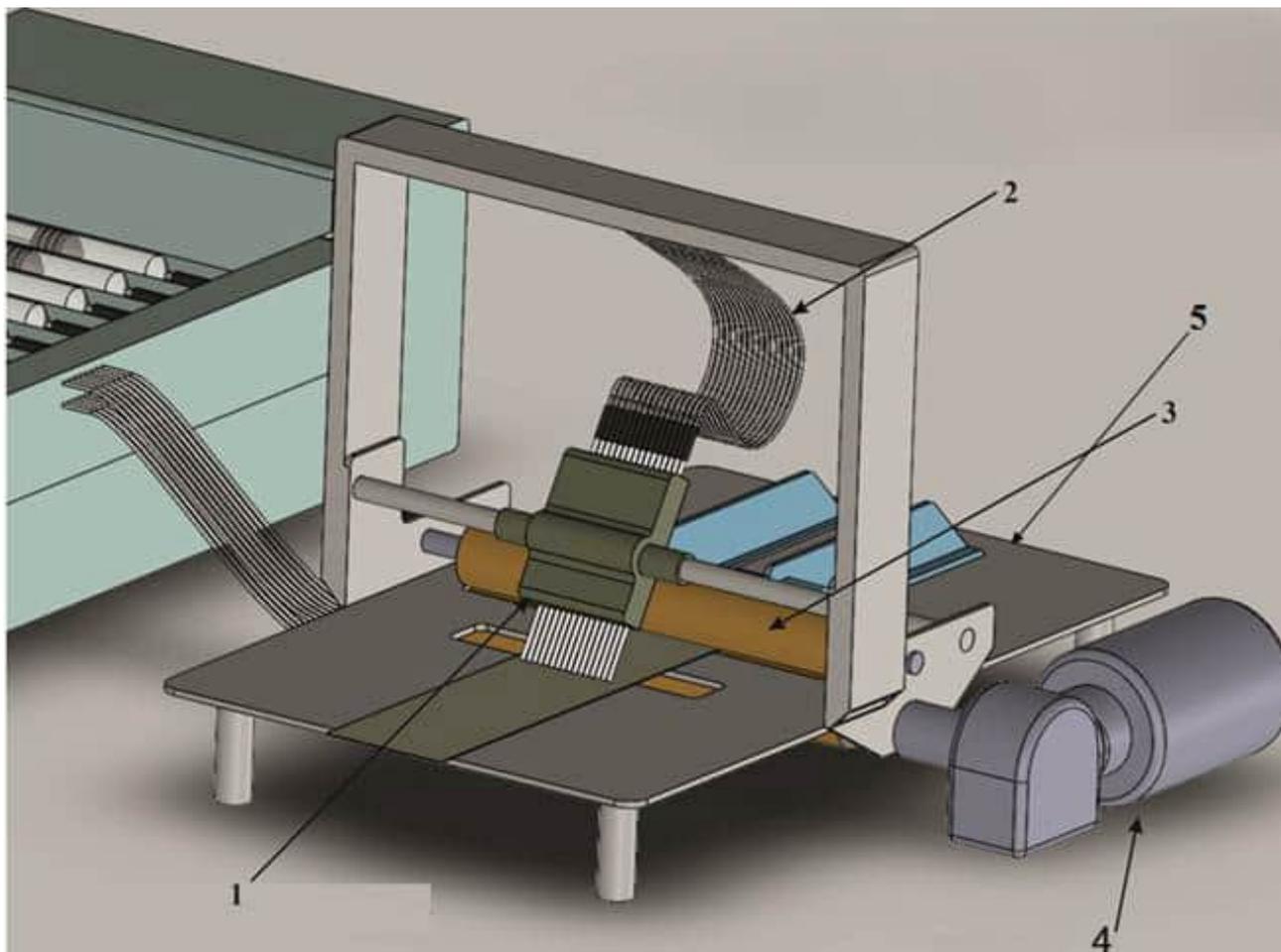


1.3 — Устройство для изготовления тест-полосок для количественного определения чувствительности бактериальных культур к АМП, вид сверху



1 — шприцевая помпа, 2 — роликовая подача, 3 — подложка

1.4 — Основные узлы устройства для изготовления тест-полосок для количественного определения чувствительности бактериальных культур к АМП

Продолжение приложения

1 — дозирующая головка, 2 — капилляры, 3 — обрезиненные валики, 4 — электропривод

1.5 — Основные узлы устройства для изготовления тест-полосок для количественного определения чувствительности бактериальных культур к АМП