

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Царева Виктора Николаевича на диссертационную работу Лихачева Ивана Владимировича на тему: «Разработка тест-системы для определения минимальной подавляющей концентрации антибиотиков методом градиентной диффузии», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология (медицинские науки).

Актуальность темы выполненной работы

Широкое распространение резистентных штаммов микроорганизмов представляет серьезную угрозу для здравоохранения во всем мире, а исследование чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам является одной из важнейших научно-практических задач современной микробиологии. Для решения этой проблемы Правительством РФ утверждена «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года», которая определяет необходимость углублённого изучения данной проблемы на молекулярно-генетическом уровне, а также создание новых средств и диагностических систем для выявления устойчивости и борьбы с инфекцией на этой основе.

Фенотипические методики, применяемые в современном здравоохранении, успешно конкурируют с молекулярно-генетическими методами, основанными на определении генов резистентности. Наиболее часто применяется диско-диффузионный метод, позволяющий получить результат в виде клинических категорий чувствительности. Однако, в ряде случаев такой результат не является достаточно информативным и требуется более точная оценка. Такая оценка необходима в некоторых клинических случаях, обусловленных особенностями фармакокинетики пациента, для эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью, а также в научных целях и предполагает определение минимальной подавляющей концентрации антимикробного препарата.

«Золотым стандартом» определения минимальной подавляющей концентрации остается метод серийных разведений, однако метод градиентной

диффузии (Е-тест) считается более удобным для практического применения. Кроме оценки значения минимальной подавляющей концентрации антимикробного препарата, Е-тест позволяет исследовать эффективность комбинированного применения двух антибиотиков при использовании его модификации (кросс-тест). Отсутствие отечественного производства Е-тестов, высокая стоимость зарубежных тест-систем и возможные ограничения импорта определяют разработку методики изготовления Е-тестов как востребованную и актуальную задачу.

Таким образом, тема диссертационного исследования Лихачева Ивана Владимировича является весьма актуальной, а сформулированная диссертантом цель исследования – разработка диагностической тест-системы для определения чувствительности к антимикробным препаратам методом Е-теста с последующей проверкой на эталонных и клинических штаммах – вполне обоснованной, как в теоретическом, так и научно-практическом плане.

Степень новизны, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертантом впервые получены собственные оригинальные данные об основных антимикробных препаратах, для которых в клинической практике наиболее часто требуется проводить оценку чувствительности и, соответственно, проводить коррекцию дозировки для применения при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. Материал получен при исследовании большой выборки – 2 212 изолятов *E. coli*, *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp. и при этом было установлено, что для штаммов данных видов наиболее часто требуется количественное определение чувствительности к амоксициллину/клавулановой кислоте, цефалоспорином (цефотаксим, цефтазидим, цефепим), ципрофлоксацину и триметоприму/сульфаметоксазолу, аминогликозидам (гентамицин, тобрамицин, амикацин) и нитрофурантоину.

В диссертационной работе впервые выведено соотношение, связывающее концентрацию антимикробного препарата, наносимого на пористую подложку, геометрические параметры подложки и концентрацию антимикробного препарата в плотной питательной среде.

Важным практическим аспектом исследования является проведённый диссертантом анализ разных вариантов подложек – пористых и полимерных, который может быть использован в дальнейших перспективных разработках.

В диссертационной работе также впервые представлен функциональный прототип лабораторной установки для нанесения растворов антимикробных препаратов на подложку тест-полосок, представляющий из себя 16-канальную помпу с роликовой подачей.

По описанной и разработанной в ходе исследования методике изготовлены Е-тесты с антимикробными препаратами из наиболее часто применяемых фармакологических групп. 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.

Впервые методом кросс-теста изучена активность комбинаций азидотимидина и байкалина в сочетании с антимикробными препаратами в отношении изолятов *K. pneumoniae*: синергетический антибактериальный эффект выявлен при сочетании азидотимидина с гентамицином, аддитивный эффект – при сочетании азидотимидина с ципрофлоксацином и в комбинации байкалин-цефотаксим.

Степень достоверности и обоснованность научных положений диссертационного исследования подтверждается достаточным объемом проведенных исследований и репрезентативностью выборок экспериментального материала. Статистическая обработка произведена при помощи электронных таблиц MS-Excel, доверительный интервал для долей рассчитан методом откорректированной нормальной аппроксимации (откорректированный метод Вальда), воспроизводимость, точность и согласование рассчитаны согласно рекомендациям ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость работы заключается в выявлении данных о

распространенности случаев, в которых необходимо использование методов, позволяющих определить значение минимальной подавляющей концентрации антимикробных препаратов. Исследование чувствительности 2 212 штаммов энтеробактерий к 13 антимикробным препаратам 7 фармакологических групп дает возможность более точно оценить потребности в тест-системах для количественного определения чувствительности данных микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Изучение комбинированного воздействия антимикробных препаратов дают возможность рассматривать результаты работы в качестве основы развития нового перспективного направления – создания тест-систем для оценки сочетанного применения антимикробных препаратов, особенно актуального в условиях роста количества резистентных изолятов. Описанный в исследовании синергетический эффект комбинаций азидотимидина и байкалина с гентамицином, цефотаксимом и ципрофлоксацином в отношении штаммов *K. pneumoniae* позволяет расширить возможности антибиотикотерапии для резистентных изолятов.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в создании методики изготовления Е-тестов на основании доступного сырья отечественного происхождения, отличающейся применением разработанной автором лабораторной установки (16-канальной шприцевой помпы с роликовой подачей) и способом расчета концентраций растворов антимикробных препаратов с использованием специальной формулы.

Результаты диссертационной работы внедрены в работу трех учреждений: 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.).

Достоверность результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Достоверность приведенных в диссертационной работе Лихачева И.В. результатов подтверждается применением имеющихся литературных источников по данной проблеме, включая важнейшие нормативные и методические документы, детальным планированием экспериментальной работы и адекватными методами статистической обработки результатов. Диссертантом обоснован комплексный подход, включающий применение методов градиентной диффузии и серийных разведений, а также и диско-диффузионного метода.

Статистические методы включают расчет доверительных интервалов для разности долей по откорректированному методу Вальда, воспроизводимости, точности и показателей согласования (major discrepancy – MD, very major discrepancy – VMD) в соответствии с ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010 и ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002.

Основные материалы диссертационной работы представлены в печати. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 статьи – в рецензируемых изданиях, включенных в перечень, рекомендованный ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, 4 тезиса в материалах международных и всероссийских научно-практических конференций, 1 патент на изобретение РФ. Опубликованные работы соответствуют тематике диссертационной работы, отражают решение поставленных задач, научные результаты, выводы и положения, представленные к защите.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Кандидатская диссертация Лихачева И.В. представляет собой законченную научную работу, оформленную в соответствии с требованиями ВАК к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Работа представлена на 145 печатных страницах и состоит из следующих частей: введение, обзор литературы, три главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшего развития темы, список сокращений, список источников и приложение. Диссертация иллюстрирована

26 рисунками и 26 таблицами. Библиографический список содержит 186 источников, из которых 57 – отечественные и 129 – зарубежные.

Во введении автор обосновывает актуальность проблемы исследования и анализирует ее состояние, в том числе, обосновывает практические аспекты создания соответствующей диагностической системы в Российской Федерации. Материалы и методы исследования представлены как часть раздела введения. Цель и задачи исследования четко сформулированы, а научная новизна, теоретическая и практическая значимость достаточно обоснованы. Приведена информация о личном вкладе автора, а также о внедрении результатов исследования в практическую и исследовательскую деятельность.

В обзоре литературы развернуто изложены необходимые для понимания работы фактические данные, с разных сторон рассмотрена актуальность количественного определения чувствительности к антимикробным препаратам. Обсуждаются основные характеристики клинических случаев и изучаемых микроорганизмов, при которых необходимо определение минимальной подавляющей концентрации антимикробного препарата.

Собственные исследования изложены в трех главах. Во второй главе автор рассматривает частоту случаев, в которых количественное определение чувствительности к антибиотикам является актуальным. В исследование было включено 2 212 клинических изолятов порядка *Enterobacterales*, из которых 1 223 – *E. coli*, 881 – *Salmonella* spp., 108 – *Klebsiella* spp. Автором исследовалась частота сочетаний микроорганизм/антимикробный препарат, классифицируемых, согласно результатам определения чувствительности диско-диффузионным методом, как «чувствительные при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» или находящиеся в зоне технической неопределенности. Результаты исследования позволяют сделать выводы об актуальности применения тест-систем для количественного определения чувствительности к антимикробным препаратам. Автором также приводятся результаты сравнения частоты случаев, в которых необходим количественный анализ чувствительности для различных комбинаций штамм микроорганизма/антимикробный препарат.

Третья глава собственных исследований посвящена разработке методики производства Е-тестов. В начале главы сформулированы общие требования к разрабатываемой тест-системе, при сравнительном анализе выбраны наиболее подходящие в качестве подложки листовые материалы. На основании сопоставления формул, описывающих диффузию из носителя (диска) в агар и закона диффузии Фика автором выведена формула, предназначенная для расчета концентрации сорбируемого на тест-полоски раствора антимикробного препарата. В качестве переменных в формуле используются: толщина подложки, объем области нанесения раствора одной концентрации и объем сорбируемого раствора. Автором разработана и изготовлена лабораторная установка для нанесения растворов антимикробных препаратов на тест-полоски. Принцип действия и устройство установки проиллюстрировано в тексте диссертации и в приложении. Перечень Е-тестов, изготовленных по разработанному методу, приведен в конце главы.

В четвертой главе автором произведена оценка функциональных характеристик Е-тестов, изготовленных по разработанной методике, которая включает в себя исследование параметров, анализируемых при проведении клинических испытаний медицинских изделий для диагностики *in vitro*: воспроизводимость и точность результатов исследована на эталонных штаммах Американской коллекции типовых культур (ATCC), согласование результатов и их расхождение – с использованием клинических изолятов группы ESKAPE. При оценке согласования, в качестве референтного, используется метод серийных разведений. В завершении главы автором проведено исследование, направленное на оценку возможности использования тест-полосок, изготовленных по разработанной методике, для оценки эффективности комбинированного применения антимикробных препаратов.

В разделе «Заключение» изложены основные эксперименты, проведенные в ходе диссертационного исследования, в разделе «Выводы» – сформулирована интерпретация полученных результатов. В разделе «Практические рекомендации» приведены основные предложения, представляющие интерес для исследователей и практических специалистов в области микробиологии.

Изложены перспективы дальнейших исследований в данном направлении, что особенно актуально для реализации программы импортозамещения.

В автореферате диссертационной работы Лихачева И.В. представлено всестороннее освещение заявленной темы, соответствующее содержанию основной работы, представлены основные результаты и выводы диссертации, обеспечивающие комплексное понимание работы. Автореферат подкреплён достаточным количеством иллюстративного материала.

Диссертационная работа и автореферат оформлены в соответствии с требованиями ГОСТ 7.0.11.2011.

Соответствие специальности

По тематике, методам исследования, научным положениям и выводам диссертационная работа Лихачева И.В. соответствует паспорту специальности 1.5.11. – микробиология (медицинские науки): п. 8 – «Закономерности биосинтеза антибактериальных субстанций бактериального происхождения (антибиотики и бактериоцины), молекулярные механизмы чувствительности бактерий к антибиотикам, методы фенотипического и генотипического исследования механизмов лекарственной устойчивости», п. 14 – «Организация разработки и промышленного производства питательных сред, диагностических систем и биологических препаратов».

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Остается выразить сожаление, что при огромном объеме исследуемых штаммов автор обошел своим вниманием представителей грамположительной микробиоты – традиционных представителей стафилококков и энтерококков, входящих в группу ESKAPE. В тексте диссертации имеются отдельные стилистические неточности и опечатки, которые не умаляют высокой научной и практической ценности данного исследования. В порядке дискуссии возникли два вопроса:

1. Для оценки эффективности комбинированного применения антимикробных препаратов Вы готовили тест-полоски, содержащие градиент концентраций азидотимицина и байкалина. В комбинации азидотимидин +

ципрофлоксацин был выявлен синергетический антибактериальный эффект, а для комбинаций азидотимидин + гентамицин и байкалин + цефотаксим продемонстрирован аддитивный эффект. Что это дает для клинической практики?

2. Не было ли у Вас возможности провести аналогичный кросс-тест с компонентами введенных в клиническую практику комбинированных препаратов, например амоксициллин + клавуланат натрия или ципрофлоксацин + тинидазол? Представляется, что это было бы более обосновано потребностями практического здравоохранения.

Заключение

Диссертационная работа Лихачева Ивана Владимировича «Разработка тест-системы для определения минимальной подавляющей концентрации антибиотиков методом градиентной диффузии», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология (медицинские науки), является завершенной научно-квалификационной работой, в ходе которой решена актуальная научно-практическая задача – создание тест-системы для количественной оценки чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Тест-системы данного типа широко востребованы в лабораторной практике и научно-исследовательской деятельности.

Таким образом, диссертационная работа Лихачева Ивана Владимировича «Разработка тест-системы для определения минимальной подавляющей концентрации антибиотиков методом градиентной диффузии» по своей актуальности, научной новизне, практической значимости результатов и объему проведенных исследований соответствует требованиям п. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 28.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021

№ 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 № 1382), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Лихачев Иван Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология (медицинские науки).

Официальный оппонент:

заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 127206, Российская Федерация, г. Москва, ул. Долгоруковская, д. 4

Телефон: 8 (495) 609-67-00

E-mail: info@rosunimed.ru



доктор медицинских наук, профессор
21.11.2025 г.

Царев Виктор Николаевич

Подпись доктора медицинских наук, профессора Царева Виктора Николаевича заверяю:

Ученый секретарь ученого совета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Заслуженный работник высшей школы Российской Федерации,

доктор медицинских наук, профессор
21.11.2025 г.



Васюк Юрий Александрович