

ОТЗЫВ

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

Актуальность темы выполненной работы

Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам остаётся важной и востребованной задачей. С помощью существующих методов исследования чувствительности можно получить данные качественного и количественного характера. Широко распространённый диско-диффузионный метод является качественным и не позволяет определить значение минимальной подавляющей концентрации антимикробного препарата, часто необходимое в клинической практике, для эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью и в научных целях. Одним из наиболее удобных способов определения значения минимальной подавляющей концентрации является метод градиентной диффузии (Е-тест), позволяющий оценить как значение минимальной подавляющей концентрации антимикробного препарата, так и эффективность совместного применения двух антибиотиков при использовании модифицированного метода градиентной диффузии (кросс-тест). В настоящее время тест-полоски (Е-тесты) для определения значения минимальной подавляющей концентрации микроорганизмов к антимикробным препаратам в Российской Федерации не производятся, а использование зарубежных тест-систем затруднительно вследствие высокой стоимости и возможных ограничений импорта. Вследствие этого, разработка методики изготовления отечественных Е-тестов является востребованной и актуальной задачей.

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

В диссертационной работе впервые описана разработка методики изготовления тест-полосок, предназначенных для определения чувствительности

к антимикробным препаратам методом градиентной диффузии (Е-тест).

В ходе исследования 2 212 изолятов *E. coli*, *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp. выявлены антимикробные препараты, для которых чаще встречаются категории «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» и зона технической неопределённости.

Автором впервые предложена формула для расчёта концентрации растворов антимикробных препаратов на подложке Е-тестов, учитывающая концентрацию, которую необходимо достичь в непосредственной близости от тест-полоски, геометрические характеристики подложки и объём жидкости, нанесённый на участок полоски с одной концентрацией. В диссертационной работе впервые представлен функциональный прототип лабораторной установки для нанесения растворов антимикробных препаратов на подложку тест-полосок, представляющий из себя 16-канальную помпу с роликовой подачей.

Впервые, с помощью изготовленных Е-тестов, было оценено воздействие комбинаций азидотимидина и байкалина с антимикробными препаратами в отношении изолятов *K. pneumoniae*. Для комбинации азидотимидина с гентамицином был выявлен синергетический эффект, для комбинации азидотимидина с ципрофлоксацином и байкалина с цефотаксимом – аддитивный эффект. Степень достоверности и обоснованность научных положений диссертационной работы подтверждается достаточным объёмом проведённых исследований, репрезентативностью выборок экспериментального материала и адекватной статистической обработкой.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о распространённости случаев, в которых необходимо количественное определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Установлена частота встречаемости категории «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» и зоны технической неопределённости к 13 антимикробным препаратам 7 фармакологических групп среди штаммов энтеробактерий (*E. coli*, *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp.), что

позволяет более точно оценить потребности в тест-системах для количественного определения чувствительности данных микроорганизмов к антибиотикам.

Изучение воздействия антимикробных препаратов методом кросс-теста дают возможность применения результатов работы для создания тест-систем, позволяющих оценить эффективность комбинированного применения препаратов, что особенно актуально в условиях повышения частоты встречаемости резистентных изолятов. Выявленный в работе Лихачева И.В. синергетический эффект комбинаций азидотимидина и байкалина с антимикробными препаратами (гентамицин, цефотаксим, ципрофлоксацин) в отношении штаммов *K. pneumoniae* позволяет расширить возможности антибиотикотерапии в отношении резистентных изолятов. Практическая значимость диссертационной работы заключается в разработке способа изготовления Е-тестов, отличающегося применением авторской методики расчёта концентраций растворов антимикробных препаратов, использования доступного сырья отечественного происхождения и сконструированного прототипа лабораторной установки. Результаты диссертационного исследования внедрены в работу трёх 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 представленных автором результатов обусловлена применением детально проработанного плана экспериментальной работы и тщательным изучением имеющихся литературных источников по данной тематике. В рамках исследования был использован комплексный подход, включающий применение

микробиологических и статистических методов в соответствии с руководящими документами, а также современных методов автоматизированного проектирования. Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что результаты исследования являются репрезентативными и имеют прочную научную основу.

Основные материалы диссертационной работы Лихачева И.В. 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 полностью соответствуют тематике диссертационного исследования, отражают основные научные результаты, ключевые положения и выводы, представленные к защите.

Оценка содержания, завершённости и оформления диссертации

Диссертационная работа Лихачева И.В. представляет собой законченное научное исследование, оформленное в соответствии с требованиями ВАК, предъявляемыми к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, трёх глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 26 рисунками и 26 таблицами, позволяющими наглядно представить результаты исследования и сделать их более доступными для анализа. Список литературы содержит 186 источников, из которых 57 – отечественных и 129 – зарубежных.

В разделе «Введение» автором продемонстрирована актуальность исследуемой проблемы и проведён анализ её изученности в научной литературе. Цель и задачи исследования чётко сформулированы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость убедительно аргументированы. В разделе подробно описаны материалы и методы исследования, указан объём

проведённых исследований с использованием таблиц. Глубокое знание темы исследования позволяет автору выбрать оптимальные методологические подходы и убедительно обосновать их эффективность для достижения поставленных целей. В тексте подробно изложены сведения о личном вкладе автора, а также об апробации полученных результатов и их полноте представления в научных публикациях.

В разделе «Обзор литературы» представлен всесторонний анализ современных данных, иллюстрирующий актуальность количественного определения чувствительности к антимикробным препаратам. Рассмотрены основные особенности клинических случаев и исследуемых микроорганизмов, когда это определение значения минимальной подавляющей концентрации антимикробного препарата является необходимым, приведён обзор методов, применяющихся в настоящее время для решения данной задачи; указаны особенности, достоинства и ограничения этих методов.

Раздел «Результаты собственных исследований» состоит из трёх глав, каждая из которых посвящена детальному анализу и систематизации проведённых экспериментов. Во второй главе автором изучена распространённость случаев, в которых количественное определение чувствительности к антимикробным препаратам представляется актуальным. Для этого оценена частота встречаемости комбинаций штамм микроорганизма/антимикробный препарат, относящихся к категории «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» или к зоне технической неопределённости. Исследование представляет собой ретроспективное изучение чувствительности 2 212 клинических изолятов порядка *Enterobacterales* (1223 – *E. coli*, 881 – *Salmonella* spp., 108 – *Klebsiella* spp.) к антимикробным препаратам. По результатам проведённого исследования представлена частота необходимости количественного определения чувствительности к антибиотикам в различных комбинациях микроорганизм/антимикробный препарат.

В третьей главе описана разработка методики изготовления Е-тестов. Автором сформулированы требования, предъявляемые к материалам подложки

Е-тестов, проведён сравнительный анализ и выбраны наиболее подходящие для дальнейшего экспериментального изучения. Установлена зависимость в виде формулы, связывающей концентрацию антимикробного препарата в наносимом на подложку растворе, толщину подложки, размер участка нанесения раствора с одной концентрацией и впитывающие свойства подложки, от которых зависит объём наносимого раствора. Описан принцип работы и устройство лабораторной установки для изготовления Е-тестов; описание проиллюстрировано рисунками в тексте диссертации и в материалах приложения. В конце главы приведён перечень Е-тестов, изготовленных по разработанной методике.

В четвёртой главе описано изучение функциональных характеристик изготовленных Е-тестов. На эталонных штаммах автором произведена оценка показателей воспроизводимости и правильности, на клинических изолятах – категорийного согласования, большого и очень большого расхождения. В ходе оценки возможности использования разработанных Е-тестов для проведения исследований методом кросс-теста, были изготовлены тест-полоски, импрегнированные азидотимидином и байкалином. Был продемонстрирован синергический эффект для комбинации азидотимидин + ципрофлоксацин, и подтверждён аддитивный эффект для комбинации азидотимидин + гентамицин и байкалин + цефотаксим.

В разделе «Заключение» представлен комплексный анализ и интерпретация полученных результатов, приведены теоретическая и практическая значимость проведённого исследования.

В разделе «Практические рекомендации» автором изложены основные предложения, которые могут заинтересовать исследователей и специалистов в области микробиологии.

Автореферат диссертационного исследования Лихачева И.В. демонстрирует всестороннее освещение заявленной темы, соответствующее содержанию основной работы. В автореферате изложены основные результаты и выводы диссертационного исследования, что позволяет получить исчерпывающее представление о проделанной работе. Текст автореферата подкреплён достаточным объёмом иллюстративного материала. Диссертация и

автореферат оформлены согласно требованиям ГОСТ 7.0.11.2011.

Таким образом, диссертационное исследование Лихачева И.В. представляет собой завершённый научный труд, который по своей актуальности, научной новизне и практической значимости полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам, претендующим на степень кандидата наук.

Соответствие специальности

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

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

Диссертационная работа Лихачева И.В. выполнена на высоком уровне.

1. *Замечания по тексту.* Замечаний по тексту не обнаружено.
2. *Замечания к рисункам и таблицам.* Замечаний не обнаружено.
3. *Вопросы:*

Как Вы думаете, почему не разработаны методы, позволяющие определять значение минимальной подавляющей концентрации на основе интерпретации зон задержки роста, полученных диско-диффузионным методом?

Для любой диагностической тест-системы обязательно должны быть исследованы чувствительность и специфичность – проводилось ли определение данных показателей в ходе диссертационной работы?

В чём преимущества и недостатки Е-тестов, изготовленных на подложке из бумаги и из полимерной плёнки?

Как Вы считаете, насколько результаты диагностики чувствительности к

антимикробным препаратам *in vitro* отражают их эффективность *in vivo*?

Как Вы думаете, могут ли молекулярно-генетические методы полностью заменить фенотипические методы определения чувствительности?

Как Вы считаете, чем обусловлено ограничение применения диффузионных методов определения чувствительности по отношению к некоторым антимикробным препаратам (ванкомицин, колистин, ципрофлоксацин)?

Заключение

Диссертационная работа Лихачева Ивана Владимировича «Разработка тест-системы для определения минимальной подавляющей концентрации антибиотиков методом градиентной диффузии», представленная на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология (медицинские науки), является завершённой научно-квалификационной работой, в которой, на основании выполненных автором исследований, осуществлено решение актуальной научно-практической задачи – разработки методики производства тест-полосок (Е-тестов), предназначенных для определения минимальной подавляющей концентрации антимикробных препаратов в отношении исследуемых культур микроорганизмов. Е-тест, как простой в проведении и учёте результатов метод определения минимальной подавляющей концентрации, широко применяется в виде коммерческих тест-систем в практической и научной деятельности бактериологических лабораторий.

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 объёму проведённых исследований соответствует требованиям п. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 28.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024,

от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. № 1786, от 25.01.2024 г. № 62, от 16.10.2024 г. № 1382), предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, а её автор, Лихачев Иван Владимирович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология (медицинские науки).

Официальный оппонент:

заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии имени академика Д.К. Заболотного Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, академик РАЕН
Адрес: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8; телефон: 8 (812) 338-71-53; e-mail: vtetzy@yahoo.com

доктор медицинских наук, профессор
24.11.2025 г.



Виктор Вениаминович Тец

Подпись Теца Виктора Вениаминовича заверяю:

Ученый секретарь ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России

доктор медицинских наук, профессор



Виталий Фёдорович Беженарь