

Метод градиентной диффузии, или эпсилметрический тест (Е-тест) – один из самых удобных способов определения значения минимальной

подавляющей концентрации антимикробных препаратов. Модифицированный метод градиентной диффузии (кросс-тест) также используется для оценки комбинированного воздействия антимикробных препаратов.

Отсутствие производства коммерческих тест-систем на территории Российской Федерации в совокупности с высокой стоимостью и возможными ограничениями импорта зарубежных тест-систем позволяет рассматривать разработку методики изготовления отечественных Е-тестов как востребованную и актуальную научно-практическую задачу.

**Новизна исследования, полученных результатов,
выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В диссертационной работе Лихачева И.В. на статистически достоверной выборке ($n = 2212$) изолятов *E. coli*, *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp. выполнен анализ частоты встречаемости категории «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» и зоны технической неопределенности; на основании результатов проведенного исследования изучено процентное соотношение данных энтеробактерий и установлены достоверные различия их частоты встречаемости для каждого из исследованных антимикробных препаратов.

В исследовании впервые описана методика, предназначенная для изготовления Е-тестов, и установлено, что в качестве материала подложки возможно использование бумаги фильтровальной быстрой фильтрации плотностью 160 ± 10 г/м², толщиной $0,4 \pm 0,1$ мм. Предложенная методика включает формулу для расчета концентрации наносимых на подложку тест-полосок растворов антимикробных препаратов и учитывает концентрацию антимикробных препаратов, которую необходимо достичь в непосредственной близости от тест-полоски, геометрические характеристики подложки и объем жидкости, приходящийся на участок полоски с одной концентрацией. Изготовлен и описан прототип лабораторной установки для нанесения растворов антимикробных препаратов на подложку тест-полосок, представляющий собой 16-канальную помпу с роликовой подачей.

Впервые, с помощью изготовленных тест-полосок, выполнено исследование воздействия комбинаций азидотимидина и байкалина с антимикробными препаратами в отношении изолятов *K. pneumoniae* методом кросс-теста. Для комбинации азидотимидина с гентамицином продемонстрирован синергетический эффект, для сочетания азидотимидина с ципрофлоксацином и байкалина с цефотаксимом – аддитивный эффект.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационное исследование Лихачева И.В. соответствует целям научно-технологического развития России в рамках проектов, направленных на борьбу с антибиотикорезистентностью бактерий.

Работа Лихачева И.В. была выполнена в рамках НИР «Разработка методов ускоренного обнаружения возбудителей социально значимых инфекций и оценки их чувствительности к антибактериальным препаратам» № 121030200275-7 от 02.03.2021 г.

**Значимость для науки и практики данных, полученных автором
диссертации**

Установленная в диссертационной работе распространенность категории «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» и зоны технической неопределенности среди штаммов *E. coli*, *Salmonella* spp. и *Klebsiella* spp. по отношению к 13 антимикробным препаратам 7 фармакологических групп расширяет представления о необходимости количественного определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Особенно актуальным в условиях роста количества резистентных штаммов представляется изученное в рамках работы воздействие антимикробных препаратов методом кросс-теста (модифицированный метод градиентной диффузии).

Разработанная в ходе исследования методика формирует базу для изготовления тест-систем на основе принципа градиентной диффузии.

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 г.), Государственного бюджетного учреждения «Республиканский клинический центр инфекционных болезней, профилактики и борьбы со СПИД» (акт внедрения от 13.11.2024 г.) и Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова» (акт внедрения от 27.11.2024 г.).

**Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе
публикации в рецензируемых изданиях**

Достоверность и обоснованность результатов работы обеспечена достаточным объемом исследований, применением референтных методов исследования и статистической обработкой полученных данных согласно

требованиям руководящих документов (EUCAST 14.0, CLSI M100-ED34, ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010).

Основные результаты работы доложены и обсуждены на четырех научно-практических конференциях. 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.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Тест-полоски, изготовленные по разработанной в диссертационной работе Лихачева И.В. методике, рекомендуются к применению как для определения минимальной подавляющей концентрации 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.

Для изготовления тест-полосок Е-теста на основе впитывающей подложки рекомендуется использовать фильтровальную бумагу плотностью 160 г/м², предложенный в работе алгоритм расчета концентрации наносимых на подложку растворов антимикробных препаратов и 16-канальную шприцевую помпу с роликовой подачей.

Для совершенствования методики изготовления тест-полосок рекомендуется применение непористой подложки из полиэтилентерефталатной пленки.

Соответствие специальности

Тема диссертации Лихачева И.В., а также цель, задачи, основные положения и выводы, полностью соответствуют 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» и пункт 14 – «Организация разработки и промышленного производства питательных сред, диагностических систем и биологических препаратов».

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа Лихачева И.В. изложена на 145 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора

литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и приложения. Список литературы содержит 186 источников, из которых 57 – отечественных и 129 – зарубежных. Диссертация иллюстрирована 26 рисунками и 26 таблицами. Текст работы легко читается и содержит незначительное количество опечаток.

Автореферат оформлен согласно требованиям ВАК, соответствует структуре и содержанию диссертации.

В разделе «Введение» автором изложена информация, подтверждающая актуальность исследуемой проблемы. Материалы и методы представлены как часть раздела, в табличном виде приведен объем проведенных исследований. В достаточном объеме изложены сведения о личном вкладе автора, апробации полученных результатов и их представлении в научных публикациях.

В разделе «Обзор литературы» проведен всесторонний анализ современных данных, связанных с необходимостью количественного определения чувствительности бактерий к антимикробным препаратам. Изложены основные факторы фармакокинетики пациентов и особенности исследуемых микроорганизмов, когда определение чувствительности ложно производится именно количественными методами. Далее автором кратко перечисляются основные методы, применяющиеся в настоящее время для определения минимальной подавляющей концентрации антимикробных препаратов с указанием их достоинств и недостатков.

Раздел «Результаты собственных исследований» состоит из трех глав. В главе 2 автором выполнено изучение распространенности случаев, в которых количественное определение чувствительности к антимикробным препаратам является актуальным. С этой целью произведена оценка доли комбинаций штамм микроорганизма/антимикробный препарат, относящихся к категории «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» или к зоне технической неопределенности. Исследование выполнено в виде ретроспективного изучения чувствительности клинических изолятов порядка *Enterobacterales* (1223 штамма – *E. coli*, 881 штамм – *Salmonella* spp., 108 штаммов – *Klebsiella* spp.) к антимикробным препаратам. В заключении главы представлено сравнение частоты необходимости количественного определения чувствительности к антибиотикам в различных комбинациях микроорганизм/антимикробный препарат.

В главе 3 изложена непосредственно разработка методики изготовления Е-тестов. Автором сформулированы требования, предъявляемые к материалу тест-полосок, проведен сравнительный анализ доступных листовых материалов и выбраны наиболее подходящие для дальнейшего экспериментального изучения.

Выведена 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 объем наносимого раствора. Описан принцип работы и устройство 16-канальной шприцевой помпы для нанесения растворов антимикробных препаратов на тест-полоски; описание поясняется рисунками в тексте диссертации и в материалах приложения. В конце главы приведен список Е-тестов, изготовленных по разработанной методике.

В главе 4 изложена оценка функциональных характеристик изготовленных Е-тестов на эталонных штаммах и клинических изолятах. С помощью изготовленных тест-полосок, содержащих азидотимидин и байкалин, выявлен синергический эффект для комбинации азидотимидин + ципрофлоксацин, и подтвержден аддитивный эффект для комбинации азидотимидин + гентамицин и байкалин + цефотаксим.

Заключение

Диссертационная работа *Лихачева Ивана Владимировича* на тему: **«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), выполненная под руководством Кафтыревой Лидии Алексеевны, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой, на основании выполненных автором исследований, осуществлено решение актуальной научно-практической задачи – разработка диагностических тест-полосок с антимикробными препаратами (Е-тестов), предназначенных для определения минимальной подавляющей концентрации антимикробных препаратов методом градиентной диффузии. Данное медицинское изделие отличается широким спектром применения и высокой востребованностью как в клинической лабораторной практике, так и в области исследований антибиотикорезистентности.

По актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа 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 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 ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, *Иван Владимирович Лихачев*, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности *1.5.11. – микробиология* (медицинские науки).

Отзыв обсужден на заседании кафедры микробиологии и вирусологии №2 от 20 ноября 2025 г., протокол №3.

Заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29, тел.: 8 (863) 305-89-00, e-mail: okt@rostgmu.ru)

доктор медицинских наук,
профессор



Галина Георгиевна Харсеева

Подпись Харсеевой Галины Георгиевны заверяю:

Ученый секретарь ученого совета

ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России

доктор медицинских наук,
профессор



Наталья Германовна Сапронова