

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Швыдкая М. Г.¹, Затевалов А. М.¹, Митрохин С. Д.², Джандарова Д. Т.³, Миронов А. Ю.¹

СОЧЕТАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА ИМУНОФАНА И МОКСИФЛОКСАЦИНА *IN VITRO* НА ТОКСИГЕННЫЙ ШТАММ *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

¹ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора», 125212, Москва, Россия;

²ГБУЗ Городская клиническая больница № 67 им. Л. А. Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы, 123423, Москва, Россия;

³ГБУЗ «Диагностический клинический центр № 1 ДЗМ», 117485, Москва, Россия

Исследована скорость роста культуры Clostridium difficile при действии моксифлоксацина и пептида имунофана в различных концентрациях in vitro. В концентрации 0,05, 0,25, мкг/мл имунофан проявляет антимикробное действие в отношении штамма C. difficile. При сочтенном действии имунофана и антибиотика определены концентрации, стимулирующие рост штамма C. difficile, которые составили область 0-1,5 МИК моксифлоксацина при любой концентрации имунофана. Установлены концентрации максимального ингибирования роста C. difficile при совместном действии имунофана и моксифлоксацина – 1,5 мкг/мл и 2,5 МИК, соответственно.

Ключевые слова: имунофан; антимикробные пептиды; моксифлоксацин; Clostridium difficile-инфекция.

Для цитирования: Швыдкая М.Г., Затевалов А. М., Митрохин С.Д., Джандарова Д.Т., Миронов А.Ю. Сочетанное действие пептида имунофана и моксифлоксацина *in vitro* на токсигенный штамм Clostridium difficile. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (8): 516-520. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-8-516-520>

Shvydkaya M. G.¹, Zatevalov A. M.¹, Mitrokhin S. D.², Dzhandarova D. T.³, Mironov A. Yu.¹

PEPTIDE IMUNOFAN AND MOXIFLOXACIN COMBINED EFFECTS ON TOXIGENIC STRAIN *CLOSTRIDIUM DIFFICILE IN VITRO*

¹G. N. Gabrichevsky research institute for epidemiology and microbiology, Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

²City Clinical Hospital № 67 named after L. A. Vorokhobova, 123423, Moscow, Russia;

³Diagnostic Clinical Center №1, 117485, Moscow, Russia

Moxifloxacin and imunofan peptide concentrations – dependent Clostridium difficile growth rate was analyzed in vitro. In the course of our study, it was revealed imunofan peptide at concentrations 0.05, 0.25 µg/ml has antimicrobial characteristics against toxigenic C. difficile strain. At the same time, with the peptide and the antibiotic combined interaction, we observed moxifloxacin concentration 0-1.5 MIC stimulates C. difficile growth, regardless of the imunofan concentration. Concentrations of maximum growth inhibition for C. difficile were also established with the combined effects peptide imunofan and antibiotic moxifloxacin – 1.5 µg/ml and 2.5 MIC, respectively.

Key words: imunofan; antimicrobial peptide; moxifloxacin; Clostridium difficile infection.

For citation: Shvydkaya M.G., Zatevalov A.M., Mitrokhin S.D., Dzhandarova D.T., Mironov A. Yu Peptide imunofan and moxifloxacin combined effects on toxigenic strain Clostridium difficile in vitro. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).2020; 65 (8): 516-520. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-8-516-520>

For correspondence: Shvydkaya M.G., Ph.D. candidate, G. N. Gabrichevsky research institute for epidemiology and microbiology, Rospotrebnadzor; e-mail: mshvidkaya@mail.ru

Information about authors:

Shvydkaya M.G., <https://orcid.org/0000-0001-8585-1661>

Zatevalov A.M., <https://orcid.org/0000-0002-1460-4362>

Mitrokhin S.D., <https://orcid.org/0000-0001-5127-1060>

Dzhandarova D.T., <https://orcid.org/0000-0003-4140-4784>

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>

Conflict of interests. The authors declare the absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.04.2020
Accepted 10.04.2020

Введение. Проблема полирезистентности возбудителей инфекционных заболеваний к антимикробным препаратам (АМП) приобретает всё большую актуальность [1]. Широко и нередко бесконтрольное применение АМП в здравоохранении, ветеринарии, сельском хозяй-

стве способствует селекции штаммов микроорганизмов, которые не только резистентны к АМП, но и размножаются в их присутствии [2]. Возбудителем антибиотико-ассоциированной инфекции (СДИ) является токсигенный штамм Clostridium difficile [5,9,10]. Выделяют несколько

Для корреспонденции: Швыдкая Мария Геннадьевна, аспирант МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского; e-mail: mshvidkaya@mail.ru

групп АМП, которые могут быть фактором риска развития CDI [4,12]. Одним из таких АМП из группы фторхинолонов, используемых в клинической практике является моксифлоксацин [3].

Использование моксифлоксацина обусловлено его высокой эффективностью при лечении тяжёлых форм различных инфекций [4]. Использование моксифлоксацина в клинической практике провоцирует рост резистентности к фторхинолонам у токсигенных штаммов *C. difficile* [3,16]. Отмечено появление штаммов *C. difficile* устойчивых к ванкомицину и метронидазолу, которые традиционно применяются для лечения CDI в России [4,5]. Исследования резистентности штаммов *C. difficile* к фторхинолонам в отечественной литературе встречаются редко, несмотря на актуальность данной проблемы [6].

Одно из решений проблемы антибиотикорезистентности – сочетанное применение АМП и антимикробных пептидов. Пептиды, обладающие антимикробной активностью, используются в лечении различных инфекций, в том числе вызванных мультирезистентными к АМП возбудителями [7].

Наш выбор остановился на пептидном препарате имунофан, в отношении которого имеется достаточно данных, указывающих на его эффективность при лечении инфекций [8,11]. Исследований по антимикробной активности имунофана в отношении штаммов токсигенных *C. difficile* и его влиянию на индигенную микрофлору кишечника недостаточно [10]. При описании местного действия имунофана отмечено, что у ряда пациентов после его приёма обостряется воспалительный процесс, который позже, как правило, купируется без дополнительных вмешательств [11]. Возможно, данное явление связано с активацией микрофлоры под действием имунофана. Исследование сочетанного действия моксифлоксацина и имунофана по кинетическим кривым роста токсигенного клинического штамма *C. difficile in vitro* выявит характер зависимости скорости роста культуры в заданном диапазоне концентраций моксифлоксацина и имунофана [12].

Цель исследования – оценить влияние сочетанного действия имунофана и моксифлоксацина, на скорость роста токсигенного клинического фторхинолон резистентного штамма *C. difficile*, выделенного от пациента с CDI.

Материал и методы. Исследована кинетика роста клинического штамма *C. difficile* при различных концентрациях моксифлоксацина, имунофана, и при сочетанном действии этих препаратов в различных соотношениях *in vitro*.

Штамм *C. difficile* изолирован из кала пациента с CDI на анаэробном агаре (Oxoid, Великобритания). Идентификация чистой культуры проведена на масс-спектрометре MALDI-TOF MS по протоколу компании производителя (Bruker Daltonic, Германия). Чувствительность к моксифлоксацину определена диффузионным методом на анаэробном агаре (Oxoid, Великобритания) с коммерческими дисками моксифлоксацина (Oxoid, Великобритания). Использована методика определения антибиотикорезистентности штаммов *C. difficile*, описанная в рекомендациях [13]. Расчёт результата зон задержки роста проводился с помощью BIOMIC V3 (Giles Scientific Inc, USA). Для интерпретации результата антибиотикорезистентности *C. difficile* по величине зоны задержки роста использовано европей-

ское руководство комитета клинических микробиологов (EUCAST) [14], клинические испытания L. T. Eriksrup и др. [15]. Токсигенность *C. difficile* определена по детекции токсинов А и В в кале методом иммуноферментного анализа (RIDASCREEN R-Biopharm, Германия).

Для проведения исследований на клиническом штамме *C. difficile in vitro* использован моксифлоксацин в форме раствора для инфузий (торговая марка Авелокс. Регистрационный номер: П N012034/02. Байер Шеринг Фарма АГ, D-51368, Лeverкузен, Германия). Рабочие концентрации антибиотика готовились в соответствии с европейским руководством комитета клинических микробиологов (EUCAST) в минимальных ингибирующих концентрациях (МИК) в кратности 0,5 МИК; 1 МИК; 2 МИК; 4 МИК.

Для оценки действия пептида на кинетику роста клинического штамма *C. difficile in vitro* использован раствор имунофана для внутримышечного и подкожного введения 50 мг/мл (регистрационный номер: PN000106/02-040408; производитель: ООО Научно-производственное предприятие «БИОНОКС», Москва, Россия.). Рабочие концентрации имунофана получали разведением изотонического 0,1 молярного раствора хлорида натрия до концентраций 0,05, 0,25, 1,25 мг/мл.

Культуру *C. difficile* инкубировали в анаэробных условиях в стерильных 90-луночных планшетах с использованием газогенераторных систем (Oxoid, Великобритания). Оптическая плотность инокулюма определялась на анализаторе Microscan AutoScan-4S (Beckman Coulter Life Sciences, США) при экспозиции в начале опыта на 2, 8, 13, 17, 20, 23-и сутки роста. Кривые роста анализировались по полиномиальному тренду 3-го порядка с расчётом, полученным математическим моделированием с минимизацией ошибки методом наименьших квадратов. Для сравнения скорости роста культуры использован множитель коэффициента в первой степени полиномиального тренда.

Статистическая значимость результатов оценена методами вариационной статистики с использованием критерия χ^2 .

Результаты. Для оценки влияния моксифлоксацина на кинетику роста клинического штамма *C. difficile* определена оптическая плотность инокулята при концентрациях моксифлоксацина различной кратности МИК. Кривые роста представлены на рис. 1.

Для оценки скорости роста штамма подобраны линейная, степенная, экспоненциальная и полиномиальная регрессии, с оценкой качества по показателю R^2 . Оценка скорости по полиномиальной регрессии 3 порядка показала наилучшее значение R^2 , что определило выбор модели оценки скорости. Скорость роста определяется коэффициентом множителя для аргумента, возведенного в 1-ю степень. Скорость роста штамма представлена в табл. 1.

Из данных табл. 1 следует, что моксифлоксацин в кратности от 0,5 до 4 МИК эффективно ингибирует рост штамма *C. difficile*.

Для оценки влияния пептида имунофан на кинетику роста клинического штамма *C. difficile* определена оптическая плотность инокулята при различных концентрациях имунофана. Кривые роста представлены на рис. 2.

Кривые роста аппроксимировали линией полиномиального тренда 3-его порядка (табл. 2).

Из данных табл. 2 следует, что имунофан в концентрациях 0,05 и 0,25 мг/мл эффективно подавляет

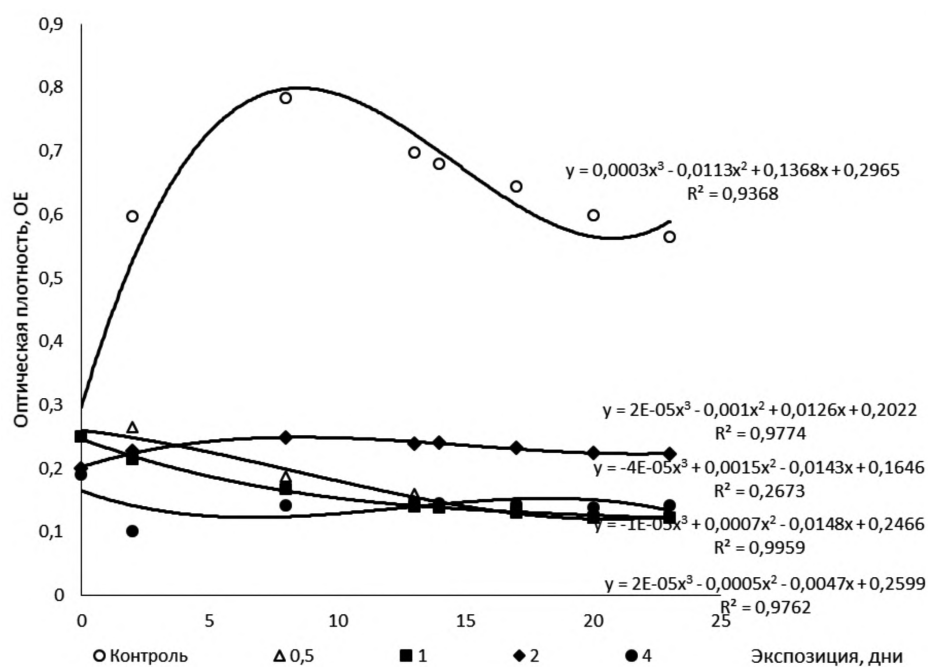


Рис. 1. Кривые роста антибиотикорезистентного штамма *C. difficile* при действии моксифлоксацина в концентрациях 0,5, 1, 2, 4 МИК.

рост *C. difficile*, а при концентрации 1,25 мкг/мл стимулирует рост *C. difficile*.

Для оценки сочетанного действия имунофана и моксифлоксацина оценена скорость роста *C. difficile* при их различных концентрациях. Данные по скорости роста, полученные в результате аппроксимации кривых роста представлены в табл. 3.

Из данных табл. 3 следует, что изменение скорости роста *C. difficile*, имеет сложную концентрационную зависимость с максимумом подавления роста в точке 0,05 мкг/мл имунофана при 2 МИК моксифлоксацина. Наибольшее стимулирование скорости роста наблюдается при концентрации имунофана 1,25 мкг/мл при 2 МИК моксифлоксацина.

На основании, полученных данных (табл. 3), методом скользящего среднего с контролем ошибки по методу наименьших квадра-

Таблица 1

Коэффициенты уравнения аппроксимации кривых роста токсигенного клинического антибиотикорезистентного штамма *C. difficile* при различной кратности МИК моксифлоксацина

МИК моксифлоксацина	Коэффициенты			Константа	Величина достоверности аппроксимации	Статистическая значимость скорости роста, $p < 0,05$
	X^3	X^2	X			
Контроль	0,0003	-0,0113	0,1368	0,2965	0,9368	-
0,5	$2 \cdot 10^{-5}$	-0,0005	-0,0047	0,2599	0,9762	$p < 0,01$
1	$-1 \cdot 10^{-5}$	0,0007	-0,0148	0,2466	0,9959	$p < 0,01$
2	$2 \cdot 10^{-5}$	-0,001	0,0126	0,2022	0,9774	$p < 0,01$
4	$-4 \cdot 10^{-5}$	0,0015	-0,0143	0,1646	0,2673	$p < 0,01$

Таблица 2

Коэффициенты уравнения аппроксимации кривых роста токсигенного клинического антибиотикорезистентного штамма *C. difficile* при различных концентрациях имунофана

Кратность МИК моксифлоксацина	Коэффициенты			Константа	Величина достоверности аппроксимации	Статистическая значимость скорости роста, $p < 0,05$
	X^3	X^2	X			
Контроль	0,0003	-0,0113	0,1368	0,2965	0,9368	-
0,05	$8 \cdot 10^{-5}$	-0,0045	0,0683	0,152	0,879	$p < 0,01$
0,25	$7 \cdot 10^{-5}$	-0,0044	0,0776	0,1327	0,8722	0,00055
1,25	0,0003	-0,0135	0,1892	0,2572	0,9986	0,0131

Таблица 3

Скорость роста *C. difficile*, при сочетанное действие моксифлоксацина и имунофана

МИК моксифлоксацина	Концентрация имунофана, мкг/мл			
	0	0,05	0,25	1,25
0	0,1368	0,0683	0,0776	0,202
0,5	-0,0047	0,1087	0,0428	0,111
1	-0,0148	0,0579	0,2057	0,241
2	0,0126	-0,0187	0,0089	-0,0006
4	-0,0143	-0,0111	0,0015	0,0118

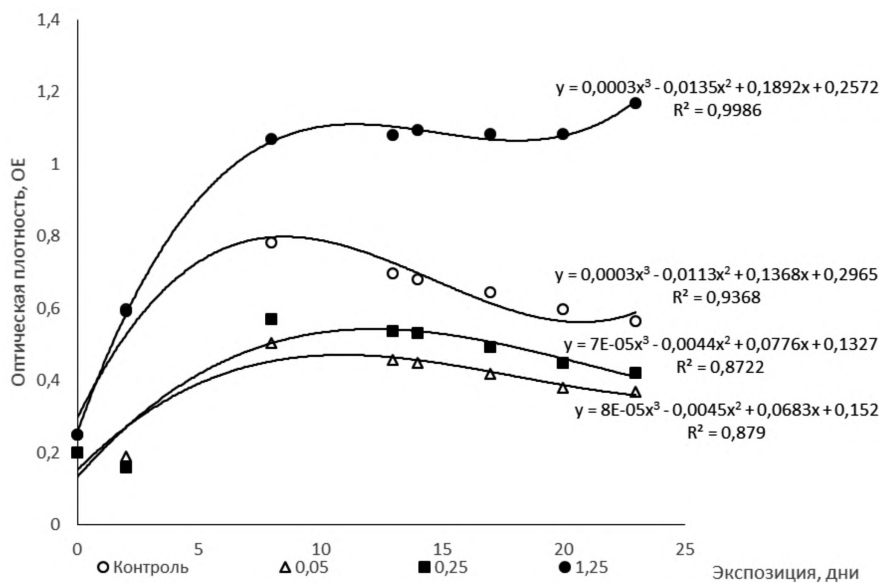


Рис. 2. Кривые роста антибиотикорезистентного штамма *C. difficile* при действии иммунофана в концентрациях 0,05, 0,25, 1, 25 мкг/мл.

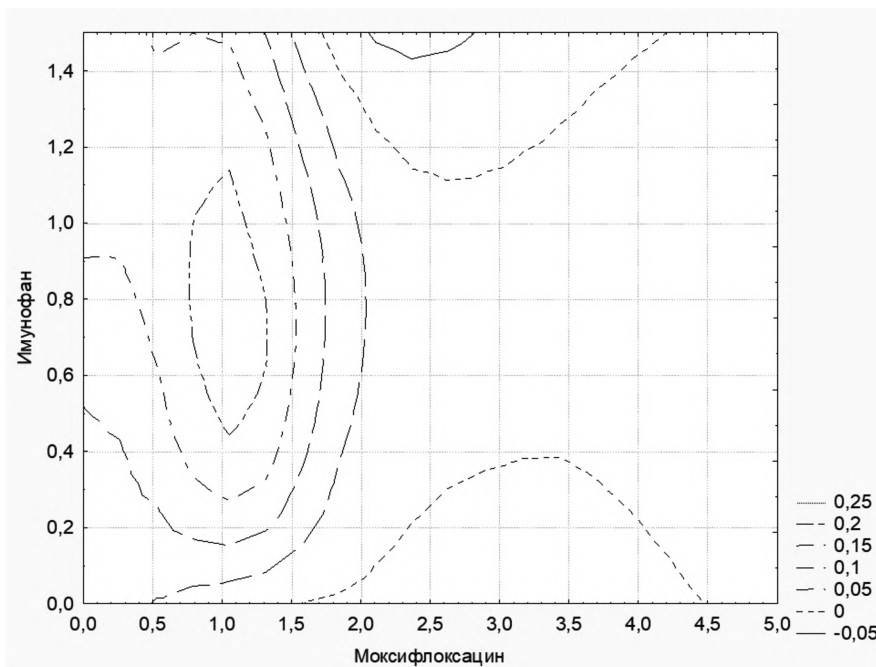


Рис. 3. Скорость роста *C. difficile*, при различных концентрациях иммунофана и моксифлоксацина.

тов, построим диаграмму уровней скорости роста *C. difficile*, при сочетанном действии иммунофана и моксифлоксацина (рис. 3).

На рис. 3 показано, что максимум скорости роста, превышающий контрольное значение в 1,5 раза достигается при 1 МИК моксифлоксацина при 0,8 мкг/мл иммунофана. Наибольшее снижение роста отмечено при 2,5 МИК моксифлоксацина и 1,5 мкг/мл иммунофана. При концентрациях иммунофана выше 0,2 мкг/мл при кратности МИК моксифлоксацина до 1,7 рост *C. difficile* стимулируется. При кратности МИК моксифлоксацина свыше 1,7 происходит эффективное ингибирование ро-

ста *C. difficile* для любых концентраций иммунофана.

Обсуждение. Использование фторхинолонов для лечения инфекционных заболеваний способствует развитию резистентности у штаммов *C. difficile* [16]. Выделение клинических штаммов, резистентных к фторхинолонам в ЛПУ г. Москвы, подтверждает справедливость этого тезиса для России.

При анализе кривых роста *C. difficile* (см. рис. 1) установлено, что влияние моксифлоксацина в концентрациях ниже 2 МИК сдерживает рост культуры, а при концентрациях выше 2 МИК наступает резкое ингибирование роста. Эффективное подавление роста *C. difficile* моксифлоксацином возможно только при концентрациях антибиотика, токсичных для человека [17, 18].

Существуют антимикробные пептиды, эффективные при лечении CDI, например, антимикробный пептид суротомидин [19]. При использовании иммунофана синергетическое ингибирующее действие на рост *C. difficile* наблюдается при концентрации – 1,5 мкг/мл и кратности МИК моксифлоксацина – 2,5.

При местном применении иммунофана отмечено усиление воспаления в начале курса иммунотерапии [6]. Нами показано, что *in vitro* иммунофан ингибирует рост *C. difficile* в терапевтических концентрациях, следовательно, рост и размножение микрофлоры снижается, что возможно, играет опосредованную роль в воспалительном процессе. Если существует вероятность накопления иммунофана в тканях или применение его в субтерапевтических концентрациях, то можно утверждать, что воспаление связано со стимуляцией роста и размножения *C. difficile*, поскольку повышенные его концентрации, по нашим данным, стимулируют рост *C. difficile*.

Выводы.

1. Скорость роста *C. difficile* снижается и переходит в область отрицательных значений при 1 МИК моксифлоксацина с минимумом в точке 3,25 МИК.

2. Скорость роста *C. difficile* увеличивается при действии иммунофана с максимумом в точке 1,4 мкг/мл.

3. Сочетанное действие моксифлоксацина и иммунофана имеет разнонаправленный характер и зависит от используемых концентраций. Область стимуляции роста *C. difficile* находится в диапазоне концентраций моксифлоксацина от 0 до 1,5 МИК с максимумом в точке 1 МИК – 0,8 мкг/мл. Область ингибирования роста находится в области кратности МИК моксифлоксацина выше 1,5, с максимумом в точке концентрации иммунофана 1,5 мкг/мл и кратности МИК моксифлоксацина – 2,5.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке Тутельяна А.В.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 7, 13-17, 19
см. REFERENCES)

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник. Том 1, 2. Зверев В.В., Бойченко М.Н., ред. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
2. Сухина М. А., Михалева В. И., Ачкасов С. И., Сафин А. Л., Миронов А. Ю. Патогены антибиотик-ассоциированной диареи у пациентов с заболеваниями кишечника. *Дезинфекционное дело*. 2017; 4(102): 70.
4. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи (CDI). Н. Новгород: Ремедиум Приволжье; 2019.
5. Миронов А. Ю., Шепелин И. А., Шепелин К. А. Патогенные клостридии. Справочник бактериолога. М.: Типография Копиринг; 2019.
6. Клиническая лабораторная аналитика в 5 томах. Том. IV. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. Меньшиков В.В., ред. М.: Агат-Мед; 2003.
8. Афиногенова В. П., Лукачев И. В., Костинов М. П. Иммуноterapia: механизм действия и клиническое применение иммунокорригирующих препаратов, *Лечащий врач*. 2010; 4: 9-13.
9. Миронов А. Ю. *Clostridium difficile*-ассоциированная инфекция. Сборник научно-практических работ VIII Межрегиональной научно-практической конференции, «Микробиологические аспекты диагностики инфекционных заболеваний». Харсеева Г.Г., ред. Ростов-на Дону: Издательство «РостГМУ», 2010: 85-98.
10. Миронов А.Ю. Эмерджентный патоген *Clostridium difficile*. Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации». Орехово-Зуево: Издательство ГОУ ВО МО ГТТУ; 2019: 146-53.
11. Караулов А. В., Клинико-иммунологическая эффективность применения иммунофана при оппортунистических инфекциях. *Лечащий врач*, 2000; 5:28-9.
12. Шельгин Ю. А., Алешкин В. А., Сухина М. А., Миронов А. Ю. и др. Клинические рекомендации национальной ассоциации специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и общероссийской общественной некоммерческой организации «Ассоциация колопроктологов России» по диагностике, лечению и профилактике *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи (CDI). *Колопроктология*, 2018; 3(65):7-23.
18. Березняков И.Г., Обухова О.С. Инфекции верхних дыхательных путей и антибиотики. *Провизор*. 2001; 2:37-8.

REFERENCES

1. Medical Microbiology, Virology, and Immunology [Meditinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya. Uchebnik. Vol. 2]. Zverev V.V., Boychenko M.N., eds. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
2. Sukhina M. A., Mikhalevskaya V. I., Achkasov S. I., Safin A. L., Mironov A. Yu. Pathogens of antibiotic-associated diarrhea in patients with intestinal diseases. *Dezinfektsionnoye delo*. 2017; 4(102): 70. (in Russian)

3. Wieczorkiewicz J.T., Lopansri B.K., Cheknis A., Osmolski J.R., Hecht D.W., Gerding D.N., Johnson S. Fluoroquinolone and macrolide exposure predict *Clostridium difficile* infection with the highly fluoroquinolone- and macrolide-resistant epidemic *C. difficile* strain BI/NAP1/027. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 60(1): 418-23.
4. Clinical guidelines for the diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDI). N. Novgorod: «Remedium Privolzh'ye». 2019. (in Russian)
5. Mironov A. Yu., Shepelin I. A., Shepelin K. A. Pathogenic clostridia [Patogennyye klostridii. Spravochnik bakteriologa]. Moscow: Tipografiya Koping; 2019. (in Russian)
6. Clinical laboratory analytics in 5 volumes. Tom. IV. Private analytical technology in a clinical laboratory. [Klinicheskaya laboratornaya analitika. Vol. IV. Klinicheskaya laboratornaya analitika]. Men'shikov V.V., ed. Moscow: Agat-Med; 2003. (in Russian)
7. Sierra J.M., Fusté E., Rabanal F., Vinuesa T., Viñas M., An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opin Biol Ther*. 2017; 17(6):663-76.
8. Afinogenova V.P., Lukachev I.V., Kostinov M.P., Immunotherapy: mechanism of action and clinical use of immunocorrective drugs. *Lechashchiy vrach*. 2010; 4: 9-13. (in Russian)
9. Mironov A. Yu. *Clostridium difficile*- associated infection. [Sbornik nauchno-prakticheskikh rabot VIII Mezhregional'noy nauchno-prakticheskoy konferentsii, «Mikrobiologicheskiye aspekty diagnostiki infektsionnykh zabolovaniy»]. Kharseeva G.G., ed. Rostov-na-Donu; Izdatel'stvo «RostGMU»; 2010: 85-98. (in Russian)
10. Mironov A.Yu. Emergent pathogen *Clostridium difficile*. [Sbornik materialov VI Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem «Perspektivy vnedreniya innovatsionnykh tekhnologiy v meditsine i farmatsii»]. Orekhovo-Zuevo: Izdatel'stvo GOU VO MO GGTU; 2019: 146-53. (in Russian)
11. Karaulov A. V. Clinical and immunological efficacy of the use of immunofan in opportunistic infections. *Lechashchiy vrach*, 2000; 5:28-9. (in Russian)
12. Shelygin Yu. A., Aleshkin V. A., Sukhina M. A., Mironov A. Yu. Clinical recommendations of the National Association of Specialists in Control of Infections Associated with the Provision of Medical Assistance, and the All-Russian Public Non-Profit Organization Association of Coloproctologists of Russia for Diagnostics, treatment and prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDI). *Koloproktologiya*, 2018; 3(65):7-23. (in Russian)
13. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; approved standard; Eighth Edition. CLSI document M11-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2012.
14. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020.
15. Erikstrup L.T., Danielsen T.K., Hall V., Fuursted K., Kahlmeter G., Justesen U.S. Disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile*. EUCAST posters ECCMID; 2012. 1794-6.
16. Wasels F., Kuehne S. A., Cartman S. T., Spigaglia P., Barbanti F., Minton N. P., Mastrantonio P. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 3(59):1794-6.
17. Molitor E. Susceptibility Categories Should Be Agreed Upon. *J. Clin. Microbiol*. 2019; 57(9):e00620-19.
18. Berезняков И.Г., Обухова О.С. Upper respiratory tract infections and antibiotics. *Провизор*. 2001; 2: 37-8. (in Russian)
19. Knight-Connoni V., Mascio C., Chesnel L., Silverman J. Discovery and development of surotomycin for the treatment of *Clostridium difficile*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2016; Mar;43(2-3):195-204.

Поступила 04.04.20

Принята к печати 10.04.20