

*На правах рукописи*

Косилова Ирина Сергеевна

**ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ  
К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

Специальность 1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Оболенск – 2021

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Научный руководитель:**

**Домотенко Любовь Викторовна**, кандидат химических наук (1.4.7. Высокомолекулярные соединения), Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория разработки питательных сред, ведущий научный сотрудник.

**Официальные оппоненты:**

**Комиссаров Александр Владимирович**, доктор биологических наук (специальность 1.5.6. Биотехнология), профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник, г. Саратов.

**Кафтырева Лидия Алексеевна**, доктор медицинских наук (специальность 1.5.11. Микробиология), профессор, 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, заведующая лабораторией кишечных инфекций, г. Санкт-Петербург.

**Ведущая организация:**

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 202 г. на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, г. о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Автореферат разослан** «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 202 г.

**Ученый секретарь**

диссертационного совета 64.1.002.01  
кандидат биологических наук

**Фурсова Надежда Константиновна**

## Общая характеристика работы

**Актуальность темы.** Распространение микроорганизмов, устойчивых к антимикробным препаратам (АМП), представляет угрозу для общественного здравоохранения во всем мире (Pérez-Etayo et al., 2020; Montiel-Riquelme et al., 2020). Если в середине прошлого века клиницистам приходилось сталкиваться с единичными случаями инфекций, вызванных резистентными формами микроорганизмов, то в настоящее время появляются микроорганизмы, резистентные ко всем антибиотикам, обычно используемым для лечения инфекций (Taccconelli et al., 2019; Nweze et al., 2020).

Одной из основных причин возникновения устойчивых к АМП микроорганизмов является необоснованное применение антибиотиков и назначение схем лечения антибиотиками без предварительного проведения тестирования чувствительности к ним (Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам, ВОЗ, 2016; Распоряжение Правительства РФ №2045-р, 2017; Mirzayev et al., 2020).

Наиболее распространенным методом определения чувствительности микроорганизмов к АМП в бактериологических лабораториях является диско-диффузионный метод. Метод подходит для исследования большинства бактериальных патогенов, не требует специального оборудования и является универсальным для АМП различных групп (Humphries et al., 2018; Zhang et al., 2021).

Определение чувствительности микроорганизмов к АМП данным методом начали проводить в начале 1950-х гг. Для его постановки использовали питательные среды нескольких наименований, поэтому результаты, полученные в различных бактериологических лабораториях, нельзя было сравнивать между собой (Hudzicki et al., 2009). Кроме того, регулярный пересмотр критериев чувствительности микроорганизмов к известным АМП и разработка критериев к новым АМП для каждой питательной среды требовали огромных усилий и затрат (Alos et al., 2015).

В настоящее время для диско-диффузионного метода документами основных организаций по стандартизации Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) и Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) рекомендовано использовать питательную среду – агар Мюллера-Хинтон (Ahman et al., 2019; Strauss et al., 2020).

Известно, что качество питательной среды, а именно содержание в ней ионов двухвалентных металлов и тимидина влияет на активность антибиотиков и чувствительность микроорганизмов к ним. Так, содержание ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) и/или магния ( $\text{Mg}^{2+}$ ) влияет на активность аминогликозидов (Girardello et al., 2012), фторхинолонов и тетрациклинов (D'amato et al., 1975), содержание ионов марганца ( $\text{Mn}^{2+}$ ) – на активность тигециклина (Fernandez-Mazarrasa et al., 2009; Veenemans et al., 2012), цинка ( $\text{Zn}^{2+}$ ) – на активность карбапенемов (Cooke et al., 1996; Daly et al., 1997), а содержание пиримидинового нуклеозида тимидина влияет на активность сульфаниламидных препаратов (Swenson et al., 1978; Indiveri et al., 1991).

Стандартом ISO/TS 16782:2016 «Clinical laboratory testing — Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller-Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing» определены требования к допустимым концентрациям ионов  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ , а также тимидина (не более 8,0 мг/л, 3,0 мг/л и 0,03 мг/л, соответственно) в агаре Мюллера-Хинтон, а к содержанию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  предъявляются дополнительно косвенные требования – по значениям

диаметров зон подавления роста *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 вокруг диска с гентамицином.

Результаты одного из последних исследований, проведенных экспертами EUCAST (Ahman et al., 2020), показали, что из 21 исследованного образца агара Мюллера-Хинтон 17 фирм-производителей, которые в настоящее время представлены на мировом рынке, только 30 % соответствуют этим требованиям.

В нашей стране для постановки диско-диффузионного метода разрешена, помимо агара Мюллера-Хинтон, питательная среда АГВ (Гивенталь и др., 1978). Ее использование усложняет ситуацию со стандартизацией метода тестирования, так как в ряде публикаций было отмечено получение недостоверных результатов с использованием данной питательной среды (Козлов и др., 1996; Стецюк и др., 2004; Шепелин и др., 2013).

В связи с этим, актуальной проблемой на начало нашего исследования являлась разработка стандартизированной питательной среды отечественного производства – агара Мюллера-Хинтон. Для получения такой питательной среды необходимо было использовать стандартизованные по содержанию ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и тимидина компоненты, входящие в её состав.

Основным компонентом агара Мюллера-Хинтон является кислотный гидролизат казеина, однако в отечественных и международных литературных источниках отсутствует описание способа его получения. Предложенный Мюллером и Джонсоном способ получения достаточно сложен и не содержит стадий очистки от избытка ионов некоторых актуальных двухвалентных металлов и тимидина. Согласно этому способу, гидролиз казеина проводят в течение длительного времени (около 72 ч), хлор-ионы устраняют перегонкой под вакуумом, а очистку от ионов цинка предлагают проводить оксидом или гидроксидом кальция, что, в свою очередь, дополнительно обогащает гидролизат ионами кальция (Mueller et al., 1941). Одним из возможных вариантов решения проблемы получения стандартной питательной среды может быть ее производство из коммерчески доступных солянокислотных гидролизатов казеина, но результаты наших предварительных исследований показали, что коммерческие гидролизаты не подходят для этих целей.

Таким образом, для получения питательной среды агара Мюллера-Хинтон, удовлетворяющей требованиям международных стандартов и позволяющей получать достоверные результаты определения чувствительности микроорганизмов к АМП различных групп, необходимо было разработать технологию производства солянокислотного гидролизата казеина, определить оптимальные параметры его получения и установить требования к показателям его качества.

### **Степень разработанности темы исследования**

Получению кислотных гидролизатов казеина посвящен ряд публикаций (Sokhey et al., 1950; Cohen et al., 1953; Свириденко и др., 2017; Асланова и др., 2018). Преимущественно в них обсуждаются вопросы, касающиеся различных режимов гидролиза казеина, способов освобождения от анионов и осветления. В доступных публикациях отсутствует описание условий обработки гидролизатов, необходимых для снижения концентраций ионов марганца, магния и тимидина. В них отсутствуют также требования к показателям его пригодности в качестве компонента агара Мюллера-Хинтон и не приводится технология производства данной питательной среды.

Большинство работ отечественных и зарубежных авторов посвящено оценке качества питательных сред, предназначенных для определения чувствительности микроорганизмов к АМП (Kenny et al., 1980; Murray et al., 1983; Ahman et al., 2020). Анализ опубликованных данных показал, что в настоящее время на мировом рынке присутствуют питательные среды, не стандартизованные по содержанию ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и тимидина. Определение антибиотикочувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом на таких питательных средах приводит к получению ложных результатов чувствительности к аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, тигециклину, карбапенемам и сульфаниламидам (Редько и др., 2001). Данная проблема в РФ является актуальной, так как единственный зарегистрированный отечественный агар Мюллера-Хинтон не удовлетворяет требованиям международных стандартов (Шепелин и др., 2013).

**Цель** данной работы – разработать технологию производства солянокислотного гидролизата казеина с заданными характеристиками и сконструировать на его основе питательную среду для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон), удовлетворяющую требованиям международных стандартов.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Оценить возможность применения коммерческих гидролизатов казеина при производстве питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам и обосновать необходимость разработки технологии получения солянокислотного гидролизата казеина с заданными характеристиками.

2. Разработать технологию производства и определить оптимальные параметры процесса получения солянокислотного гидролизата казеина со сбалансированным содержанием ионов двухвалентных металлов и тимидина, изучить его физико-химические показатели качества, аминокислотный состав и молекулярно-массовое распределение пептидных фракций, установить критерии пригодности в составе питательной среды.

3. Разработать нормативно-техническую документацию на производство солянокислотного гидролизата казеина.

4. Разработать питательную среду для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам на основе солянокислотного гидролизата казеина и определить физико-химические и биологические показатели качества.

5. Доказать пригодность разработанной питательной среды для определения чувствительности музейных и клинических штаммов микроорганизмов к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом и методом градиентной диффузии.

6. Оценить возможность применения разработанной питательной среды при изучении чувствительности музейных штаммов нового патогена *Photorhabdus* spp. к антимикробным препаратам, изучить влияние температуры инкубирования на их чувствительность к антимикробным препаратам.

7. Разработать технологию и нормативно-техническую документацию на производство питательной среды. Зарегистрировать питательную среду в качестве медицинского изделия.

#### **Научная новизна исследования:**

Впервые определены критерии качества солянокислотного гидролизата казеина, входящего в состав питательной среды, для получения достоверных результатов

определения чувствительности микроорганизмов к аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, тигециклину, карбапенемам и к сульфаниламидам: содержание ионов  $\text{Ca}^{+2}$  от 1,15 мг/г до 1,45 мг/г, ионов  $\text{Mg}^{+2}$  от 0,6 мг/г до 0,7 мг/г, ионов  $\text{Mn}^{+2}$  не более 0,5 мг/г, ионов  $\text{Zn}^{+2}$  не более 0,06 мг/г, тимидина менее 0,001 мг/г. Приоритет на способ получения солянокислотного гидролизата казеина подтвержден патентом RU № 2746624.

С помощью разработанной в ходе исследования питательной среды (агара Мюллера-Хинтон) систематически изучена чувствительность штаммов *Photobacterium asymbiotica* и *P. luminescens* к аминогликозидам, тетрациклинам, карбапенемам, хлорамфениколу, триметоприму/сульфаметоксазолу, цефалоспорином, фторхинолонам, макролидам и пенициллинам. Выявлено влияние температуры выращивания ( $25\pm 1$ ) °С и ( $35\pm 1$ ) °С бактерий *Photobacterium* spp. на чувствительность к антибиотикам группы пенициллинов (амоксициллин/клавулановой кислоте, ампициллину и бензилпенициллину) и обосновано использование температуры ( $35\pm 1$ ) °С как оптимальной для определения их чувствительности к антимикробным препаратам.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Разработан способ получения солянокислотного гидролизата казеина, который может быть положен в основу производства других белковых гидролизатов со сбалансированным содержанием ионов кальция, магния, марганца и цинка, а также пониженной концентрацией тимидина.

На разработанный солянокислотный гидролизат казеина утвержден Промышленный регламент ПР 78095326-12-2012 и Технические условия ТУ 9385-182-78095326-2012 – федеральный уровень внедрения.

На основе солянокислотного гидролизата казеина разработана питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон), на которую утверждены Технические условия (ТУ 9385-227-78095326-2015), Промышленный регламент (ПР 78095326-150-2015) и Инструкция по применению. Питательная среда внедрена в производство на технологической базе ФБУН ГНЦ ПМБ (справка о внедрении от 20.09.2021 г.) – федеральный уровень внедрения.

Питательная среда – агар Мюллера-Хинтон – зарегистрирована в качестве медицинского изделия (регистрационное удостоверение № РЗН 2017/5962 от 10.07.2017 г.) – федеральный уровень внедрения.

Ежегодно в бактериологических лабораториях Российской Федерации с использованием разработанной питательной среды (агар Мюллера-Хинтон) проводятся более 1 млн. бактериологических исследований по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (Справка о внедрении № 769 от 26.10.2021 г. выдана ГБУЗ Ярославской областной инфекционной клинической больницы) – федеральный уровень внедрения.

**Методология и методы исследования.** Методологической базой послужили работы отечественных и зарубежных исследователей, посвященные вопросам получения гидролизатов казеина, теоретическим основам механизмов действия антимикробных препаратов, определению чувствительности микроорганизмов к АМП и влиянию качества питательной среды на результаты тестирования.

**Методы.** Биотехнологические методы. Гидролиз казеина проводили в титановом гидролиз-аппарате объемом 1,6 куб. м, хлор-ионы удаляли деионизацией на ионообменной смоле марки АН-31 в колонке ИОК-20/16/200. Сухие образцы солянокислотного гидролизата

казеина получали методом распылительного высушивания на сушильной установке ОДВ-25 с испарительной способностью 30,0 кг/ч, с температурой воздуха на входе (190±1) °С и на выходе – (93±3) °С. Смешивание компонентов питательной среды проводят в лопастном смесителе «Спектр ВЛС-100Н» с вместимостью до 90 кг и мощностью 4,0 кВт.

*Микробиологические методы.* Оценка качества и сроки годности питательных сред и гидролизатов определяли в соответствии с МУК 4.2.2316-08 по биологическим показателям: чувствительности, стабильности основных биологических свойств, скорости роста и чувствительности тест-штаммов микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Чувствительность микроорганизмов к АМП определяли диско-диффузионным методом и методом градиентной диффузии (метод Е-тестов). Учет результатов проводили в соответствии с методологией EUCAST. Для тест-штаммов микроорганизмов полученные значения диаметров зон подавления роста или минимальные подавляющие концентрации (МПК) сравнивали с допустимым интервалом и целевым значением, находящимся в центре допустимого интервала. Для клинических изолятов значения диаметров зон подавления роста и МПК сравнивали с пограничными значениями и определяли клинические категории чувствительности. Интерпретацию результатов проводили в соответствии с актуальными версиями стандарта EUCAST, действующими до 2019 г, и использовали следующие определения клинических категорий чувствительности: чувствительный (S), умеренно-резистентный (I) или устойчивый (R).

Выявление продукции карбапенемаз проводили Carbapenem Inactivation Method (CIM-тест) (Song et al., 2016).

*Молекулярно-биологические методы.* Гены карбапенемаз *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-244</sub>, *bla*<sub>OXA-40-like</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфичными праймерами (Fursova et al., 2015; Dyatlov et al., 2015).

*Физико-химические методы.* В гидролизатах казеина и питательных средах определяли значение pH, содержание аминного азота и хлор-ионов, потерю в массе при высушивании, а в питательных средах дополнительно определяли прочность студня по Валенту в соответствии с МУК 4.2.2316-08.

Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций гидролизатов оценивали с использованием высокоэффективной эксклюзивной хроматографии на колонке BioSep-SEC-S 2000 (7,8 мм × 300 мм) Phenomenex (Торранс), установленной в хроматографическое устройство ProStar HPLC (Varian Inc) (Eremeev et al., 2009). Элементный состав гидролизатов и питательных сред определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на X Series 2 (Thermo Scientific) и атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на iCAP6500 Duo (Thermo Scientific).

Содержание общих и свободных аминокислот проводили с использованием набора для дериватизации AccQ•Tag Ultra по методу Waters AccQ•Tag™ (<https://www.manualsdir.com/manuals/575438/waters-accq-tag-ultra-derivatization>).

*Статистические методы.* Результаты обрабатывали при помощи пакета программ MS-Excel. Показатели представляли в виде среднего арифметического вариационного ряда и стандартной ошибки (M±m). Достоверность различных средних величин оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. В сравнительном анализе использовался двусторонний критерий Фишера. Уровень значимости p < 0,05.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Научно обоснована технология получения солянокислотного гидролизата казеина, обладающего следующими характеристиками: концентрация ионов кальция от 1,15 мг/г до 1,45 мг/г, магния – от 0,6 мг/г до 0,7 мг/г, марганца – не более 0,5 мг/г, цинка – не более 0,06 мг/г, тимидина – менее 0,001 мг/г.

2. На основе солянокислотного гидролизата казеина разработана питательная среда агар Мюллера-Хинтон для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, удовлетворяющая требованиям международных стандартов при определении чувствительности микроорганизмов к аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, тигециклину, карбапенемам и сульфаниламидным препаратам диско-диффузионным методом и методом градиентной диффузии, и показана ее диагностическая ценность.

**Степень достоверности и апробации результатов исследования.** Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках НИР 040 Роспотребнадзора (2011–2015 гг.) и НИР 061 Роспотребнадзора (2016–2020 гг.). Регистрационный номер в Единой государственной информационной системе учета научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ гражданского назначения № 01201172657 и № 116030310019, соответственно. Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством экспериментов и проведением исследовательских работ современными методами.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на 9 международных и Всероссийских конференциях: XVII международном конгрессе по антимикробной терапии и клинической микробиологии (г. Москва, 20-22 мая 2015 г.); Общероссийской междисциплинарной научно-практической конференции «Консолидация лабораторной медицины и клинической практики» (г. Москва, 14-16 сентября 2016 г.); VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Московская обл., 1-3 ноября 2016 г.); научно-практической конференции «Современные технологии в клинической микробиологии» (г. Москва, 1 марта 2017 г.); региональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной клинической и санитарной микробиологии» (г. Иркутск, 27 июня 2018 г.); региональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной клинической и санитарной микробиологии» (г. Якутск, 28 марта 2018 г.); XIX международном конгрессе по антимикробной терапии и клинической микробиологии (г. Москва, 17-19 мая 2017 г.); XXII международном конгрессе по антимикробной терапии и клинической микробиологии (г. Москва, 24-26 ноября 2020 г.); XXIII международном конгрессе по антимикробной терапии и клинической микробиологии (г. Москва, 26-28 мая 2021 г.).

**Личное участие автора в получении результатов.** Совместно с научным руководителем к.х.н. Домотенко Л.В., соискатель определила цель и задачи исследования, спланировала методику и дизайн экспериментов. Автор принимала непосредственное участие в разработке, испытаниях, подготовке нормативно-технической документации и внедрении в производство солянокислотного гидролизата казеина и питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, в написании и представлении результатов в виде научных статей и докладов. Отдельные разделы работы

выполнены совместно с д.м.н. Дентовской С.В., к.б.н. Фурсовой Н.К. и к.б.н. Мироновой Е.Н. Проведение клинических испытаний осуществляли совместно с сотрудниками клинико-бактериологической лаборатории ГБУЗ Ярославской областной инфекционной клинической больницы под руководством заведующей лабораторией Ершовой М. Г.

**Публикации.** Основные результаты по теме диссертации изложены в 26 печатных публикациях, из которых 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК, 1 статья в прочих изданиях, 21 тезисов докладов в сборниках трудов конференций и 1 патент на изобретение.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и одного приложения. Объём диссертации составляет 149 страниц текста с 6 рисунками и 26 таблицами. Список литературы содержит 128 наименований.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Изучение возможности использования коммерческих солянокислотных гидролизатов казеина для производства питательной среды

На модели агара Мюллера-Хинтон изучили возможность разработки технологии производства питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к АМП из коммерчески доступных компонентов: кислотного гидролизата казеина (17,5 г/л), мясного экстракта (2,0 г/л), крахмала (1,5 г/л) и агара бактериологического (14,5±2,5)<sup>1</sup>.

В работе использовали кислотный гидролизат казеина Оболенск (ГК-Оболенск), кислотный гидролизат казеина технический (Casein acid hydrolysate Technical, HiMedia, НМ), кислотный гидролизат казеина технический (Casein acid hydrolysate Technical, Merck), казаминовые кислоты технические (Casamino acid technical, Becton Dickinson, BD), кислотный гидролизат казеина с пониженным содержанием хлорида натрия (Casein acid hydrolysate (NaCl <3 %), НМ), кислотный гидролизат казеина для коклюшной вакцины (Casein acid hydrolysate for pertussis vaccine, НМ), агар бактериологический четырех фирм-производителей (Becton Dickinson BBL, Becton Dickinson Difco, Conda Pronadisa, HiMedia), мясной экстракт (Conda Pronadisa и HiMedia) и крахмал растворимый (Химприбор-СПб и Acros Organics).

Из перечисленных компонентов готовили экспериментальные варианты, которые отличались комбинациями используемых компонентов. В качестве контрольной питательной среды использовали агар Мюллера-Хинтон Becton Dickinson, BBL (далее – МХА-BBL).

Для определения биологических показателей качества экспериментальных вариантов использовали тест-штаммы микроорганизмов, которые в комбинациях с соответствующими АМП, являются маркерами качества питательной среды: *P. aeruginosa* ATCC 27853 и гентамицин являются маркерами содержания ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>; *E. coli* ATCC 25922 и цефепим, а также *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и эритромицин являются маркерами уровня ионов Ca<sup>2+</sup>; *S. aureus* ATCC 29213 и тетрациклин, а также *P. aeruginosa* ATCC 27853 и левофлоксацин – уровня ионов Mg<sup>2+</sup>; *Escherichia coli* ATCC 25922 и тигециклин – уровня ионов Mn<sup>2+</sup>; *P. aeruginosa* ATCC 27853 и имипенем – уровня ионов Zn<sup>2+</sup>; а *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и триметоприм/сульфометоксазол – уровня тимидина. Изменение значения pH питательной среды оказывает влияние на результаты тестирования *S. aureus* ATCC 29213 и тетрациклина. Как показали результаты исследований, значение pH всех экспериментальных вариантов было ниже требуемого интервала и составляло от 6,7 до 6,8

---

<sup>1</sup> Концентрация варьировалась в зависимости от прочности агара

вместо (7,2-7,4), что приводило к получению значений диаметров зон подавления роста *S. aureus* ATCC 29213 вокруг диска с тетрациклином, выходящих за рамки верхних допустимых значений. Значения диаметров зон подавления роста остальных исследуемых пар тест-штамм–АМП на всех экспериментальных вариантах были ниже минимальных допустимых значений, что, вероятнее всего, связано с избыточной концентрацией ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и тимидина в них. Причем, различающиеся между собой значения получены только на вариантах, отличающихся входящими в состав гидролизатами казеина.

Полученные результаты исследования показали, что использование коммерческих гидролизатов казеина не позволяет получить питательную среду, удовлетворяющую требованиям международных стандартов, и послужили поводом для разработки технологии производства солянокислотного гидролизата казеина с заданными характеристиками.

#### **Разработка технологии производства солянокислотного гидролизата казеина**

На основании требований стандартов EUCAST и ISO/TS 16782:2016 к качеству питательной среды, используемой для определения чувствительности микроорганизмов к АМП, были сформулированы требования к качеству солянокислотного гидролизата казеина (СГК):

– СГК должен иметь оптимальные концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , позволяющие получать на питательной среде с его использованием значения диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг диска с гентамицином, соответствующие требованиям EUCAST – (17-23) мм;

– СГК должен иметь концентрацию ионов  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  менее 0,5 мг/г и 0,17 мг/г, соответственно;

– СГК должен иметь концентрацию тимидина менее 0,001 мг/г, позволяющую получать на питательной среде с его использованием значения диаметров зон подавления роста *E. faecalis* ATCC 29212 вокруг диска с триметопримом/сульфаметоксазолом, соответствующие требованиям EUCAST, а именно (26-34) мм;

– значение рН СГК должно обеспечивать получение питательной среды с рН 7,2-7,4.

Учитывая тот факт, что основные показатели качества экспериментальных вариантов питательной среды, приготовленных на основе ГК-Оболensk: чувствительность, стабильность основных биологических свойств и скорость роста микроорганизмов, – практически не отличались от показателей качества контрольной питательной среды, технологическую схему производства ГК-Оболensk взяли за основу при разработке СГК с заданными характеристиками: гидролиз казеина проводили соляной кислотой с концентрацией от 1,8 N до 4,0 N при гидромодуле 1:5 и температуре  $(131\pm 2)^\circ\text{C}$  в течение 2 ч.

#### **Получение солянокислотного гидролизата казеина с пониженным содержанием тимидина**

В работе изучили возможность освобождения СГК от тимидина путем абсорбции его на поверхности активированного угля в кислых значениях рН. Для максимального извлечения тимидина определяли оптимальные значения рН при проведении деионизации до показателя рН 1,6-2,2 с шагом 0,1. Затем каждую пробу деионизованного СГК обрабатывали 30,0 г/л активированного угля при температуре  $(100\pm 1)^\circ\text{C}$ , фильтровали и корректировали значение рН до 7,3-7,5 с помощью концентрированного раствора NaOH.

Степень очистки СГК от тимидина оценивали косвенным методом в составе питательной среды. Для этого из каждой пробы деионизованного СГК, обработанной углем, готовили экспериментальные варианты, на которых тестировали *E. faecalis* ATCC 29212 и триметоприм/сульфаметоксазол. Как показали результаты исследования, оптимальный

интервал значений pH деионизованного СГК, в котором происходит наиболее полное извлечение тимидина, составил 1,9-2,0. При использовании гидролизата, обработанного таким способом, в составе питательной среды получены значения диаметров зон подавления роста *E. faecalis* ATCC 29212 вокруг диска с триметопримом/сульфаметоксазолом, соответствующие целевому значению (29 мм) или отклоняющиеся от него на 1 мм ( $29 \pm 1$ ) мм.

Получение солянокислотного гидролизата казеина с оптимальным содержанием ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$

Известно, что ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  образуют в диапазоне pH от 7,5 до 10,0 нерастворимые или малорастворимые в воде гидроксиды, а практически нерастворимый в воде гидроксид цинка образуется при pH от 10,0 до 12,5 (Зефиоров с соавт., 1998), поэтому в работе сначала проводили осаждение данных ионов в виде гидроксидов, а затем, при необходимости, вносили их расчетное количество в виде солей.

*Осаждение ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ .* Для осаждения данных ионов изменяли значение pH СГК от 7,5 до 10,0 с шагом 0,1 с помощью концентрированного раствора NaOH. Затем каждую пробу нагревали до температуры ( $100 \pm 1$ ) °C, выдерживали в течение ( $2,0 \pm 0,5$ ) мин до выпадения нерастворимого осадка. Осадок отфильтровывали и корректировали значение pH каждой пробы СГК до показателя 7,3-7,5 концентрированным раствором HCl.

Для оценки эффективности осаждения готовили экспериментальные варианты, которые отличались входящими в них образцами СГК, обработанными при различных значениях pH. Затем на каждом экспериментальном варианте определяли значение диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг диска с гентамицином (для оценки эффективности осаждения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ) и *E. coli* ATCC 25922 вокруг диска с тигециклином (для оценки эффективности осаждения ионов  $\text{Mn}^{2+}$ ). Как показали результаты исследования, только на питательной среде, приготовленной из СГК, обработанного в диапазоне pH 8,5-9,0, получены значения диаметров зон подавления роста обоих исследованных тест-штаммов вокруг дисков с АМП больше на 6-8 мм по сравнению со значениями, полученными на остальных экспериментальных вариантах. Анализ элементного состава СГК показал, что концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в результате данной обработки снизилась более чем в 13 раз (с 196,0 мг/г до 4,9 мг/г), ионов  $\text{Mg}^{2+}$  более чем в 25 раз (с 19,1 мг/г до 0,75 мг/г), а ионов  $\text{Mn}^{2+}$  более чем в 90 раз (с 2,43 мг/г до 0,025 мг/г).

*Осаждение ионов  $\text{Zn}^{2+}$ .* Осаждение проводили при изменении значений pH СГК в интервале от 10,0 до 12,5 с шагом 0,1. Эффективность осаждения оценивали по изменению значения диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг дисков с имипенемом на экспериментальных вариантах питательной среды. Как показали результаты, только на вариантах с использованием СГК, обработанного в интервале pH 11,0-12,0, значения диаметров соответствовали допустимому диапазону. Анализ элементного состава показал, что концентрация ионов  $\text{Zn}^{2+}$  при этом снизилась более чем в 170 раз (с 5,1 мг/г до 0,03 мг/г). Вместе с тем, в результате обработки СГК в данном диапазоне pH отмечено дальнейшее снижение концентраций ионов  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  и  $\text{Mn}^{+2}$ : до ( $0,23 \pm 0,02$ ) мг/г, ( $0,09 \pm 0,001$ ) мг/г и ( $0,02 \pm 0,001$ ) мг/г, соответственно.

При тестировании *E. coli* ATCC 25922 и тигециклина, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и имипенема на экспериментальных вариантах, в состав которых входил СГК, обработанный в двух диапазонах pH (8,5-9,0 и 11,0-12,0), значения диаметров зон подавления роста соответствовали допустимым интервалам, а при тестировании *P. aeruginosa* ATCC 27853 и гентамицина значения выходили за рамки верхних допустимых. Полученные значения

диаметров зон подавления роста для первых двух пар тест-штамм–АМП свидетельствовали о сбалансированном содержании ионов  $Mn^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  в СГК, а для третьей пары – о недостаточном содержании ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ . Дальнейшие исследования были посвящены установлению допустимого содержания в СГК ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ .

*Определение требований к содержанию ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  в СГК.* Для этого готовили экспериментальные варианты питательной среды, в состав которых входили образцы СГК с различными концентрациями их солей: глюконата кальция, хлорида магния, хлорида марганца и сульфата цинка, – до конечных концентраций ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  в питательной среде 35,0 мг/л, 25,0 мг/л, 12,0 мг/л и 10,0 мг/л, соответственно. Причем содержанием данных ионов в остальных компонентах питательной среды пренебрегли из-за их незначительного содержания (Zimbo et. al., 2009). На экспериментальных вариантах тестировали пары *P. aeruginosa* ATCC 27853 и гентамицин, *E. coli* ATCC 25922 и тигециклин, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и имипенем. Из экспериментальных вариантов выбирали те, на которых диаметры зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов соответствовали допустимым значениям. Концентрации ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  в выбранных вариантах питательных сред определяли, как оптимальные и, исходя из них, рассчитывали оптимальные концентрации данных ионов в СГК: концентрация  $Ca^{2+}$  должна находиться в интервале (1,15-1,45) мг/г,  $Mg^{2+}$  – (0,6-0,7) мг/г, а  $Mn^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  должна быть не более 0,5 мг/г и 0,06 мг/г, соответственно. Использование СГК с такими характеристиками позволяет получить питательную среду с содержанием  $Ca^{2+}$  – (20,0-25,0) мг/л,  $Mg^{2+}$  – (10,0-12,5) мг/л,  $Mn^{2+}$  не выше 8,0 мг/л, а  $Zn^{2+}$  не выше 1,0 мг/л.

На основании полученных результатов разработали технологическую схему производства СГК с заданными параметрами, представленную на рис. 1.

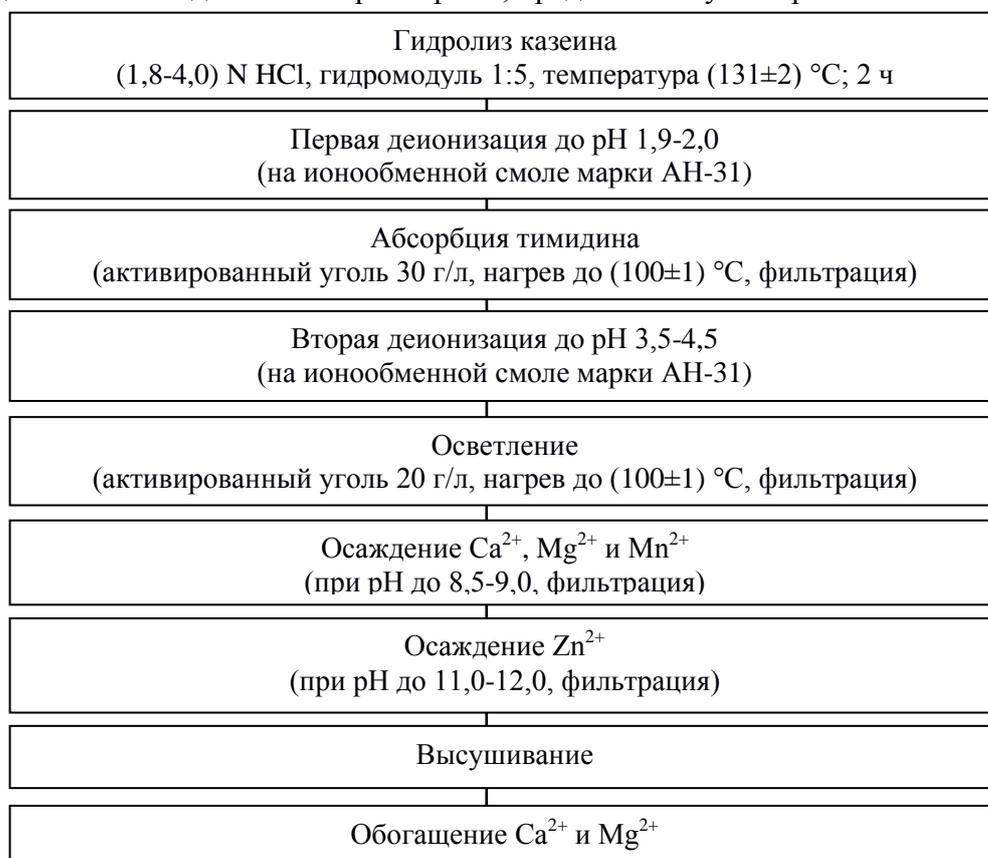


Рисунок 1 – Технологическая схема производства СГК

По разработанной технологии приготовлены 10 опытно-промышленных серий СГК, изучены их физико-химические свойства, элементный и аминокислотный состав, определены требования к показателям качества СГК.

#### Характеристики солянокислотного гидролизата казеина

*Физико-химические показатели качества.* Все наработанные серии представляли собой сухой однородный мелкодисперсный порошок от светло-желтого до желтого цвета. Степень гидролиза казеина составляла  $(75,0 \pm 5)$  %; значение рН от 7,3 до 7,5; содержание аминного азота  $(5,5 \pm 1,0)$  %; содержание хлор-ионов  $(21,0 \pm 3,0)$  %; содержание общего азота  $(11,0 \pm 2,0)$  %; потеря в массе при высушивании не более 7,0 %.

*Элементный состав.* Элементный состав СГК сравнивали с элементным составом казминовых кислот технических, входящих в состав контрольной питательной среды (МХА-BBL) (табл. 1). Элементный состав казминовых кислот технических рассчитывали, исходя из элементного состава МХА-BBL, пренебрегая остальными компонентами. В табл. 1 приведено содержание элементов, концентрации которых превышали величину  $10^{-3}$  мг/г. Таблица 1 – Элементный состав СГК и казминовых кислот технических (расчетная концентрация)

Элемент	СГК, мг/г	Казминовые кислоты технические (расчётная концентрация), мг/г
Кальций (Ca)	1,3±0,15	1,1±0,1
Магний (Mg)	0,65±0,05	0,6±0,08
Марганец (Mn)	0,01±0,005	<0,001±0,0001
Цинк (Zn)	0,02±0,005	0,03±0,005
Железо (Fe)	0,03±0,004	0,02±0,004
Калий (Ka)	1,38±0,08	1,2±0,06
Натрий (Na)	153,6±2,0	82,8±1,0
Фосфор (P)	1,58±0,02	1,4±0,04
Сера (S)	3,52±0,6	4,3±0,3
Кремний (Si)	0,61±0,03	0,31±0,02

Как видно из табл. 1, элементный состав СГК практически не отличается от расчетного элементного состава казминовых кислот технических.

*Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций.* Как показали результаты анализа, СГК примерно на 90 % состоит из низкомолекулярных пептидных фракций с массой до 3 kD и на 10,0 % из пептидных фракций с молекулярной массой от 3 kD до 10 kD, а пептидные фракции с молекулярной массой более 10 kD в нем отсутствуют (рис. 2).

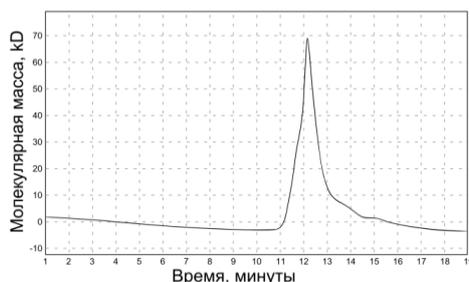


Рисунок 2 – Профиль молекулярно-массового распределения пептидных фракций

*Аминокислотный состав.* Содержание общих и свободных аминокислот в СГК и казминовых кислотах технических (ККТ) представлено на рис. 3.

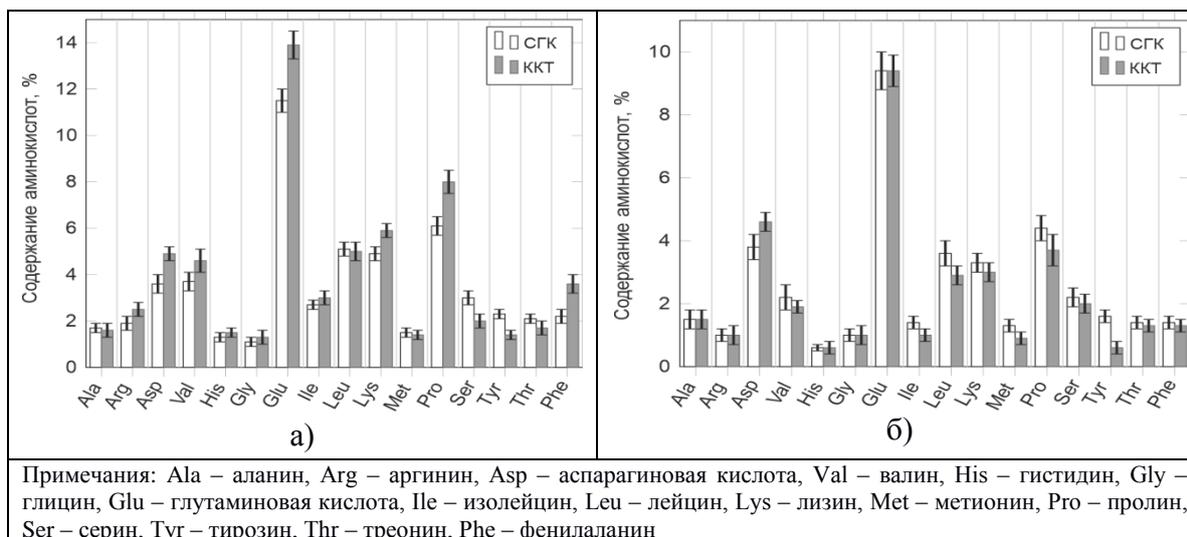


Рисунок 3 – Содержание общих (а) и свободных (б) аминокислот в СГК и ККТ, %

Как видно из рис. 3, исследуемые образцы практически не различались между собой по аминокислотному составу. В обоих гидролизатах преобладали глутаминовая кислота и пролин. Содержание свободных аминокислот в СГК составляло  $(40,1 \pm 2,7)$  %, в ККТ –  $(36,7 \pm 2,2)$  %, а общих  $(54,7 \pm 2,5)$  % и  $(62,3 \pm 2,1)$  %, соответственно.

На основе проведенных исследований подготовили нормативно-техническую документацию на производство солянокислотного гидролизата казеина: Технические условия ТУ 9385-182-78095326-2012 и Промышленный регламент ПР 78095326-12-2012.

### Разработка питательной среды и изучение ее физико-химических и биологических характеристик

Использование разработанного СГК позволило сконструировать питательную среду для определения чувствительности микроорганизмов к АМП, состав которой аналогичен составу агара Мюллера-Хинтон. Для определения показателей качества изготовлено 10 опытно-промышленных серий питательной среды из 10 серий СГК. Сухие образцы питательной среды получены в результате последовательно проведенных технологических этапов: взвешивание компонентов, загрузка компонентов в лопастной смеситель, смешивание, выгрузка питательной среды из смесителя и отбор пробы на контроль физико-химических и биологических показателей качества; фасовка питательной среды в полимерные банки и герметизация банок крышками.

#### Физико-химические показатели качества

Образцы всех серий питательной среды представляли собой мелкодисперсный порошок кремового цвета и имели следующие физико-химические характеристики: значение рН 7,2-7,4, содержание аминного азота  $(2,7-3,4)$  %, содержание хлор-ионов в пересчете на натрия хлорид  $(14,0-17,0)$  %, потеря в массе при высушивании не более 7,0 %, прочность студня по Валенту  $(500-600)$  г. Полученные значения использовали при разработке технических условий на разработанную питательную среду.

#### Биологические показатели качества

*Показатель чувствительности питательной среды, стабильности основных биологических свойств и скорости роста микроорганизмов.* Все опытно-промышленные серии питательной среды обеспечивали визуально обнаруживаемый рост тест-штаммов микроорганизмов при посеве по 0,1 мл из разведения  $10^{-6}$  через  $(16 \pm 2)$  ч инкубации при температуре  $(37 \pm 1)$  °С: *E. coli* ATCC 25922 в виде колоний светло-жёлтого цвета диаметром

(2,0-2,5) мм; *S. aureus* ATCC 29213 в виде колоний жёлтого цвета диаметром (1,0-1,2) мм; *P. aeruginosa* ATCC 27853 в виде колоний жёлто-зелёного цвета преимущественно в R-форме диаметром (2,5-3,0) мм; *E. faecalis* ATCC 29212 в виде полупрозрачных колоний диаметром (0,8-1,2) мм; а с добавлением в питательную среду 5 % лошадиной крови и 20,0 мг/л β-НАД – *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 в виде полупрозрачных четко очерченных колоний диаметром (0,8-1,0) мм и *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 в виде полупрозрачных слизистых колоний сероватого цвета (1,6-2,0) мм.

*Показатель чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом.* Как показали результаты тестирования, на разработанной питательной среде были получены значения диаметров зон подавления роста тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619 и *H. influenzae* ATCC 49766 вокруг дисков с 25 АМП различных групп, соответствующие целевым значениям для 82 % тестов, а для 18 % тестов отклоняющиеся от целевого значения на (1,5±0,5) мм, но входящие в допустимый интервал. Причем, для пар тест-штамм–АМП: *P. aeruginosa* ATCC 27853 и гентамицин; *E. coli* ATCC 25922 и цефепим; *S. aureus* ATCC 29213 и эритромицин; *S. aureus* ATCC 29213 и тетрациклин; *P. aeruginosa* ATCC 27853 и левофлоксацин; *E. coli* ATCC 25922 и тигециклин; *P. aeruginosa* ATCC 27853 и имипенем; *E. faecalis* ATCC 29212 и триметоприм/сульфаметоксазол, чувствительных к изменению содержания ионов двухвалентных металлов и тимидина, – отклонения диаметров от целевых значений были более заметны и зависели от серий SGK с различающимися концентрациями ионов Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> и тимидина. Тестирование данных пар тест-штамм–АМП выбрано для проведения контроля качества питательной среды при производстве.

Качество разработанной питательной среды изучали при определении чувствительности расширенного набора тест-штаммов микроорганизмов, обладающих известными механизмами резистентности. Изучена чувствительность *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 – продуцента β-лактамазы расширенного спектра (SHV-18) к цефотаксиму, цефтриаксону, цефтазидиму, цефподоксиму; метициллинорезистентного *S. aureus* ATCC 43300, обладающего геном резистентности *tesA*, к цефокситину; ванкомицинрезистентного *E. faecalis* ATCC 51299, обладающего геном резистентности *vanB* и обладающего высоким уровнем резистентности к аминогликозидам, к тейкопланину, ванкомицину, гентамицину, стрептомицину. Кроме того, разработанную питательную среду валидировали в отношении работы с комбинированными дисками, у которых один компонент ингибирует β-лактамазы. Для этого тестировали *K. pneumoniae* ATCC 700603 и пиперациллин/тазобактам, а также *S. aureus* ATCC 29213, который является слабым продуцентом β-лактамаз, и амоксициллин/клавулановую кислоту. Всего проведено 33 тестов. Как показали результаты, полученные значения диаметров зон подавления роста всех тест-штаммов вокруг всех дисков соответствовали допустимым диапазонам, а в 26 тестах (79 %) – целевому значению.

В ходе исследования установлено, что на разработанной питательной среде можно тестировать как чувствительные штаммы, так и устойчивые с актуальными механизмами резистентности к АМП, и определять чувствительность микроорганизмов к комбинированным АМП, содержащим ингибитор β-лактамаз.

Таким образом, использование разработанного солянокислотного гидролизата казеина позволило сконструировать питательную среду для определения чувствительности микроорганизмов к АМП, состав которой аналогичен составу агара Мюллера-Хинтон.

Питательная среда (агар Мюллера-Хинтон) соответствует требованиям EUCAST и ISO/TS 16782:2016. Отсутствие существенных отличий в показателях качества между 10 сериями разработанной питательной среды позволило использовать для дальнейших исследований только три серии.

### **Результаты испытания питательной среды**

Испытания разработанной питательной среды (МХА-Оболенск) проводили при определении чувствительности тест-штаммов, музейных и клинических штаммов различных групп микроорганизмов к 50 АМП диско-диффузионным методом и методом Е-тестов.

#### Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов

В испытаниях определяли чувствительность 10 тест-штаммов микроорганизмов с обычными и со сложными питательными потребностями к 8 АМП диско-диффузионным методом. Для этих целей использовали *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299, *K. pneumoniae* ATCC 70060, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 49766 и диски, содержащие гентамицин, тобрамицин, амикацин, ципрофлоксацин, имипенем, меропенем, тигециклин и триметоприм/сульфаметоксазол. Для культивирования микроорганизмов со сложными питательными потребностями в питательные среды вносили 5 % лошадиную кровь и 20,0 мг/л  $\beta$ -НАД. Результаты сравнивали с данными, полученными на 7 питательных средах аналогичного назначения: на агаре Мюллера-Хинтон 6 фирм-производителей BBL (МХА-BBL), Difco (МХА-Difco), HiMedia (МХА-НМ), Bio-Rad (МХА-Bio-Rad), Merck (МХА-Merck), НИЦФ (МХА-НИЦФ) и среде АГВ производства НПО «Микроген».

Как показали результаты исследований, в основном, значения диаметров зон подавления роста для всех тест-штаммов на всех исследуемых питательных средах укладывались в допустимые диапазоны. Исключением являлись результаты, полученные при тестировании *P. aeruginosa* ATCC 27853 и меропенема на МХА-BBL, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и гентамицина, тобрамицина, амикацина, ципрофлоксацина на МХА-НМ, *E. coli* ATCC 25922 и тигециклина на МХА-Merck, *E. faecalis* ATCC 29212 и триметоприма/сульфаметоксазола на МХА-НИЦФ и АГВ, которые выходили за рамки нижних допустимых значений, а при тестировании *P. aeruginosa* ATCC 27853 и гентамицина, тобрамицина, амикацина на МХА-НИЦФ и АГВ – за рамки верхних допустимых значений. Оценка отклонений от целевых значений и допустимых диапазонов диаметров зон подавления роста представлена в табл. 2. Для удобства, результаты приведены только для пар тест-штамм–АМП с расхождениями в оценочных категориях (С – среднее значение находится в пределах  $\pm 1$  мм от целевого значения; Н – High, среднее значение выше целевого на  $> 1$  мм, но не более 2 мм; L – Low, среднее значение ниже целевого на  $> 1$  мм, но не более 2 мм; VH – Very high, среднее значение выше целевого на  $> 2$  мм, но оно находится в диапазоне допустимых значений; VL – Very low, среднее значение ниже целевого на  $> 2$  мм, но оно находится в диапазоне допустимых значений; LE – Low error, среднее значение меньше нижнего допустимого; HE – High error, среднее значение больше верхнего допустимого).

Таблица 2 – Оценка значений диаметров зон подавления роста *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *E. faecalis* ATCC 29212 относительно допустимых диапазонов и целевых величин

АМП	Полученные значения, мм		МХА-BBL	МХА-Difco	МХА-НМ	МХА-Bio-Rad	МХА-Merck	МХА-НИЦФ	АГВ	МХА-Оболенск
	Допустимые	Целевые								
<i>E. coli</i> ATCC 25922										
Тигециклин	20-27	23-24	С	С	Л	С	LE	VH	VL	С
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853										
Гентамицин	17-23	20	С	С	LE	VL	Н	HE	HE	С
Тобрамицин	20-26	23	Н	С	LE	Л	Н	HE	HE	С
Амикацин	18-26	22	Н	Н	LE	Л	С	HE	HE	С
Ципрофлоксацин	25-33	29	С	С	LE	С	VH	С	Н	С
Имипенем	20-28	24	С	С	С	С	Н	С	Л	С
Меропенем	27-33	30	LE	Л	С	Л	Н	Л	Л	Л
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212										
Триметоприм/сульфаметоксазол	26-34	30	С	С	Н	С	Н	LE	LE	С

Результаты, выходящие за рамки допустимых значений и обозначенные как LE и HE, вероятнее всего, связаны с несбалансированным содержанием ионов  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  в составе МХА-НМ, МХА-НИЦФ и АГВ;  $Zn^{+2}$  в МХА-BBL;  $Mn^{2+}$  в МХА-Merck и тимидина в МХА-НИЦФ и АГВ. В табл. 3 приведен элементный состав исследованных питательных сред.

Таблица 3 – Элементный состав питательных сред 8 фирм-производителей

Элемент	МХА-BBL	МХА-Difco	МХА-НМ	МХА-Bio-Rad	МХА-Merck	МХА-НИЦФ	АГВ*	МХА-Оболенск
Кальций (Ca), мг/л	20,1±2,0	19,6±1,0	<b>34,2±0,9</b>	24,2±2,0	18,3±0,9	<b>7,6±0,3</b>	<b>9,8±0,6</b>	21,5±3,0
Магний (Mg), мг/л	11,00±0,2	9,45±0,5	<b>26,98±0,5</b>	10,64±1,0	9,14±0,4	<b>9,26±1,0</b>	<b>8,70±0,5</b>	11,60±4,0
Марганец (Mn), мг/л	0,15±0,03	0,24±0,04	0,11±0,02	0,20±0,03	<b>23,12±2,0</b>	0,11±0,01	2,20±0,6	0,16±0,03
Цинк (Zn), мг/л	<b>1,18±0,05</b>	0,35±0,01	0,43±0,03	0,46±0,02	0,51±0,06	0,42±0,02	0,98±0,5	0,30±0,06

Примечание \* – поскольку среда АГВ после автоклавирования мутная, определение проводили после фильтрации. Содержание элементов Ca и Mg в нефильтрованной среде значительно выше и составляет (18,4±1,0) мг/л и (33,0±4,0) мг/л, соответственно.

Как видно из табл. 3, МХА-НМ отличается высокой концентрацией  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , МХА-BBL высокой концентрацией ионов  $Zn^{+2}$ , МХА-Merck высоким содержанием  $Mn^{2+}$ , что приводит к LE ошибкам, а среды МХА-НИЦФ и АГВ – низким содержанием ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , что объясняет HE ошибку.

#### Чувствительность штаммов микроорганизмов, возбудителей ИСМП, и клинических штаммов микроорганизмов

В ходе исследования определена чувствительность 18 граммотрицательных штаммов микроорганизмов, возбудителей ИСМП (*K. pneumoniae* (n=8), *P. aeruginosa* (n=2), *Acinetobacter baumannii* (n=3), *Proteus mirabilis* (n=2), *Serratia marcescens* (n=1), *Enterobacter aerogenes* (n=1), *E. coli* (n=1)), находящихся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск», к 28 АМП (1512 тестов) и 147

клинических штаммов микроорганизмов, выделенных от больных, находящихся на лечении в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения Ярославской области «Инфекционная клиническая больница №1» в период проведения испытания: *K. pneumoniae* (n=49), *A. baumannii* (n=49), *S. aureus* (n=14), *Enterococcus* spp. (n=14), *E. coli* (n=12) и *P. aeruginosa* (n=9), – к АМП, количество которых варьировалось от 8 до 28 в зависимости от вида тестируемого микроорганизма (9675 тестов). Всего на разработанной (МХА-Оболensk) и контрольной питательной среде (МХА-BBL) проведено по 11187 тестов. Антибиотикограмма исследуемых штаммов совпадала на обеих питательных средах в 11178 (99,9 %) тестах, за исключением результатов тестирования трех штаммов в трех повторностях: *P. aeruginosa* В-519/14Р классифицирован на МХА-Оболensk как чувствительный, на МХА-BBL – как устойчивый к цефтазидиму, *K. pneumoniae* В-1969/14 определен на МХА-Оболensk как умеренно-резистентный, на МХА-BBL как устойчивый к миноциклину, а *E. coli* X 623 классифицирован на МХА-Оболensk как устойчивый, на МХА-BBL – как чувствительный к амоксициллину/клавулановой кислоте. Методом ПЦР только у штамма *P. aeruginosa* В-519/14Р обнаружено наличие генетической детерминанты *bla*<sub>STX-M</sub>, что, вероятнее всего, свидетельствует об устойчивости данного штамма к цефалоспорином.

#### Чувствительность штаммов *Photorhabdus* spp.

*Photorhabdus* spp. является новым возбудителем инфекционных болезней и относится к роду *Morganellaceae*, семейству *Enterobacterales*. Включает три вида почвенных бактерий: *P. temperata*, *P. luminescens* и *P. asymbiotica*, являющихся симбионтами нематод. Только один вид *P. asymbiotica* является патогенным для человека и вызывает инфекции мягких тканей и кожных покровов. В работе изучена чувствительность *Photorhabdus* spp. к 20 АМП диско-диффузионным методом в соответствии с требованиями стандарта EUCAST. Ранее для изучения их чувствительности к АМП, применялись питательные среды, не рекомендованные международными стандартами, например, агар Хоттингера (Н.А. Киршева, 2011), а результаты определения представляли в виде следующих категорий: высокочувствительный (значения диаметров зон подавления роста выше 25 мм), чувствительный (значения диаметров зон подавления роста 15-25 мм), слабочувствительный (значения диаметров до 15 мм) и устойчивый (полное отсутствие зон задержки роста).

В данном исследовании тестирование проводили при двух температурах (25±1) °С и (35±1) °С, имитирующих пребывание *Photorhabdus* spp. в организме нематод и человека. Штаммы *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* US86, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* US88, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* AU46, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* AU97, *P. asymbiotica* СбKj163, *P. luminescens* subsp. *luminescens* Нb<sup>T</sup> инкубировали в течение (18±2) ч, а *P. luminescens* subsp. *akhurstii* FRG04 и *P. luminescens* subsp. *laumondii* ТТ01<sup>T</sup> в течение (43±1) ч. Полученные значения диаметров зон подавления роста штаммов *Photorhabdus* spp. вокруг АМП интерпретировали в соответствии с таблицами для *Enterobacterales* и относили к одной из клинических категорий чувствительности: S, I, R.

В ходе работы установлено, что почти все проанализированные штаммы при обеих температурах выращивания чувствительны к аминогликозидам (гентамицину, тобрамицину, канамицину), доксициклину, имипенему, хлорамфениколу, пиперациллину, триметоприму/сульфаметоксазолу, цефалоспорином (цефепиму, цефотаксиму, цефтазидиму и цефтриаксону) и фторхинолонам (левофлоксацину и ципрофлоксацину). При этом один быстрорастущий штамм *P. luminescens* subsp. *luminescens* Нb<sup>T</sup> был устойчив к ципрофлоксацину, а два штамма *P. luminescens*: Нb<sup>T</sup> и ТТ01<sup>T</sup> – к цефокситину.

Устойчивость всех штаммов выявлена к антибиотикам группы пенициллинов: амоксициллину/клавулановой кислоте, ампициллину и бензилпенициллину. Причем для четырех из шести быстрорастущих штаммов (*P. asymbiotica* US86, *P. asymbiotica* US88, *P. asymbiotica* AU46 и *P. luminescens* Hb<sup>T</sup>) она зависела от температуры: при (25±1) °С штаммы регистрировали как «R», а при (35±1) °С – как «S». Исключение из общей устойчивости к ампициллину отмечено для медленно растущего штамма *P. luminescens* subsp. *akhurstii* FRG04, который оставался к нему чувствительным при обеих температурах.

Различий в результатах, полученных на МХА-Оболensk и МХА-BVL, не установлено. Несмотря на то, что температура (25±1) °С является для штаммов *Photorhabdus* spp. более благоприятной для инкубирования, определение антибиотикочувствительности необходимо проводить в соответствии с требованиями международных стандартов – при (35±1) °С, а результаты интерпретировать в соответствии с таблицами, предназначенными для оценки чувствительности *Enterobacterales* к АМП.

#### Испытания питательной среды методом градиентной диффузии

При определении чувствительности 18 грамтрицательных штаммов микроорганизмов, возбудителей ИСМП, методом градиентной диффузии (метод E-тестов) к 13 антимикробным препаратам на МХА-Оболensk и МХА-BVL провели по 702 теста. Значения МПК антимикробных препаратов на обеих средах полностью совпали в 423 тестах (60,2 %), различались на одно двукратное разведение – в 168 тестах (23,9 %), различались на два двукратных разведения – в 111 тестах (15,8 %). Клинические категории чувствительности для всех протестированных штаммов, полученных на МХА-Оболensk и МХА-BVL, совпадали между собой, кроме штамма *K. pneumoniae* B-1969/14. Он был интерпретирован как «умеренно-резистентный» к доксициклину на МХА-Оболensk и как чувствительный – на МХА-BVL. Результаты тестирования всех исследуемых штаммов микроорганизмов на МХА-Оболensk совпадали с результатами Vitek 2 Compact.

#### Испытания питательной среды при выполнении СИМ-теста

На разработанной питательной среде МХА-Оболensk выявляли штаммы грамтрицательных бактерий, продуцирующие карбапенемазы, с помощью фенотипического СИМ-теста. В работе исследовали клинические штаммы *K. pneumoniae* (n=31) и *A. baumannii* (n=21). Как показали результаты исследований, СИМ-тест продемонстрировал положительный результат для 45 исследованных штаммов, а для 7 штаммов отрицательный результат. Для оценки правильности полученных результатов клинические штаммы исследовали методом ПЦР на наличие генов карбапенемаз *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-244</sub>, *bla*<sub>OXA-40-like</sub> и *bla*<sub>NDM</sub>. У 44 штаммов из 45 СИМ-положительных штаммов обнаружены гены карбапенемаз, а у 8 штаммов (одного СИМ-положительного и 7 СИМ-отрицательных) – нет.

Таким образом, все штаммы, содержащие гены карбапенемаз, продемонстрировали положительный результат в СИМ-тесте, а все штаммы, не имеющие генов карбапенемаз, кроме одного – *A. baumannii* YAB245, – отрицательный результат. Причиной несовпадающего результата может являться наличие в этом штамме не выявленного с помощью метода ПЦР гена карбапенемазы. Несовпадений результатов, полученных на МХА-Оболensk и МХА-BVL, не зафиксировано.

На основании положительных результатов проведённых исследований на производство питательной среды разработана нормативная документация, включающая Технические условия (ТУ 9385-227-78095326-2015), Промышленный регламент (ПР 78095326-150-2015) и Инструкцию по применению. Питательная среда зарегистрирована в

качестве медицинского изделия в Росздравнадзоре (№ РЗН 2017/5962 от 10.07.2017 г.).

Цена питательной среды, рассчитанная с учётом затрат на сырьё, материалы, амортизационные отчисления и фонд оплаты труда, составляет около (5,5±0,5) тыс. рублей за 1 кг, а цена импортных аналогов, в среднем, составляет около (11,5±0,5) тыс. руб. за 1 кг (Инструкция по применению, МХА <https://germeon.ru/catalog/item/60501>, 2021).

### Заключение

В результате проведенных исследований разработана технология производства солянокислотного гидролизата казеина, включающая в себя гидролиз казеина соляной кислотой с концентрацией от 1,8 N до 4,0 N при гидромодуле 1:5 и температуре (131±2) °C в течение 2 ч, двухстадийную деионизацию на анионообменной смоле, причем на первой стадии до pH от 1,9 до 2,0 с последующей обработкой активированным углем (30,0 г/л) для освобождения от тимидина, на второй стадии до значений pH от 3,5 до 4,5 с последующей обработкой активированным углем (20,0 г/л) для осветления гидролизата, осаждение ионов Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> при значениях pH от 8,5 до 9,0 и ионов Zn<sup>2+</sup> при значениях pH 11,0-12,0.

Определены показатели качества: степень гидролиза (75,0±5) %, значение pH от 7,3 до 7,5, содержание аминного азота (5,5±1,0) %, содержание хлор-ионов (21,0±3,0) %, содержание общего азота (11,0±2,0) %, потеря в массе при высушивании не более 7,0 %. Концентрация ионов Ca<sup>2+</sup> в нем составляет от 1,15 мг/г до 1,45 мг/г, Mg<sup>2+</sup> от 0,6 мг/г до 0,7 мг/г, Mn<sup>2+</sup> не более 0,5 мг/г, а Zn<sup>2+</sup> не более 0,06 мг/г, практически не содержится тимидина (менее 0,001 мг/г) и примерно, на 90 % состоит из низкомолекулярных пептидных фракций с массой до 3 kD, содержание свободных аминокислот составляет (40,1±2,7) %, а общих – (54,7±2,5) %. На солянокислотный гидролизат казеина утверждены Технические условия ТУ 9385-182-78095326-2012 и Промышленный регламент ПР 78095326-12-2012.

На основе солянокислотного гидролизата казеина разработана технология производства питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон). Определены требования к ее физико-химическим и биологическим показателям качества: значение pH от 7,2 до 7,4; содержание аминного азота от 2,7 % до 3,4 %; содержание хлор-ионов от 14,0 % до 17,0 %; прочность студня по Валенту от 500 г до 600 г; содержание влаги не более 7,0, срок годности – 24 мес.

Качество разработанной питательной среды было апробировано с помощью 10 тест-штаммов: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 49766 и *K. pneumoniae* ATCC 700603.

Разработанная питательная среда прошла успешные испытания при тестировании чувствительности штаммов микроорганизмов, возбудителей ИСМП (n=18), музейных штаммов *Photobacterium* spp. (n=8) и клинических штаммов (n=147) к 50 антимикробным препаратам диско-диффузионным методом и методом градиентной диффузии. Всего на разработанной питательной среде проведено 11187 тестов диско-диффузионным методом и 702 теста методом градиентной диффузии.

На основании проведенных исследований разработана и утверждена нормативно-техническая документация на производство питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (агар Мюллера-Хинтон): Технические условия (ТУ 9385-227-78095326-2015), Промышленный регламент (ПР 78095326-150-2015) и Инструкция по применению. Питательная среда зарегистрирована

в Росздравнадзоре (№ РЗН 2017/5962 от 10.07.2017 г.). С 2017 г. используется в бактериологических лабораториях РФ и является импортозамещающим препаратом для определения чувствительности микроорганизмов к АМП.

### **Выводы**

1. В ходе оценки возможность применения коммерческих гидролизатов казеина при производстве питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам обоснована необходимость разработки технологии получения солянокислотного гидролизата казеина с заданными характеристиками.

2. Разработана технология производства солянокислотного гидролизата казеина, который отличается от коммерческих гидролизатов казеина сбалансированным составом ионов двухвалентных металлов и пониженным содержанием тимидина и обеспечивает в составе питательной среды получение достоверных результатов определения чувствительности микроорганизмов к аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклину, тигециклину, карбапенемам и триметоприму/сульфаметоксазолу.

3. Определены оптимальные параметры процесса получения солянокислотного гидролизата казеина, включающие: гидролиз белка соляной кислотой с концентрацией от 1,8 N до 4,0 N при гидромодуле 1:5 и температуре (131±2) °С в течение 2 ч; двухстадийную деионизацию на анионообменной смоле до значений рН от 1,9 до 2,0 и от 3,5 до 4,5; обработку активированным углем в двух диапазонах рН для освобождения от тимидина при значении рН от 1,9 до 2,0, для осветления при значении рН от 3,5 до 4,5, для освобождения от ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  при значении рН от 8,5 до 9,0, от ионов  $\text{Zn}^{2+}$  при значении рН от 11,0 до 12,0; распылительное высушивание.

4. Изучены химические характеристики полученного в ходе исследования солянокислотного гидролизата казеина: степень гидролиза от 70 % до 80 %; значение рН среды от 7,3 до 7,5; содержание аминного азота от 4,5 % до 6,5 %, хлор-ионов – от 19 % до 24 %, низкомолекулярных пептидных фракций с массой до 3 kD (90 %), свободных аминокислот (40,1±2,7) % и общих аминокислот (54,7±2,5) %.

5. Разработана питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон) на основе солянокислотного гидролизата казеина, удовлетворяющая требованиям международных стандартов; определены ее физико-химические и биологические показатели качества.

6. Определены критерии пригодности солянокислотного гидролизата казеина в составе питательной среды агара Мюллера-Хинтон для достоверного определения чувствительности микроорганизмов: к аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам содержание ионов  $\text{Ca}^{+2}$  (1,3±0,15) мг/г и  $\text{Mg}^{+2}$  (0,65±0,05) мг/г; к тигециклину – ионов  $\text{Mn}^{+2}$  не более 0,5 мг/г; к карбапенемам – ионов  $\text{Zn}^{+2}$  не более 0,06 мг/г; к сульфаниламидам – тимидина менее 0,001 мг/г.

7. Разработана нормативно-техническая документация на производство солянокислотного гидролизата казеина, включающая Технические условия ТУ 9385-182-78095326-2012 и Промышленный регламент ПР 78095326-12-2012.

8. Доказана возможность использования питательной среды – агара Мюллера-Хинтон для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом и методом градиентной диффузии (11187 и 702 проведенных тестов, соответственно) - с использованием панели из 10 референс-штаммов

микроорганизмов, рекомендованных стандартом Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам, 18 штаммов микроорганизмов, возбудителей ИСМП, и 147 клинических штаммов микроорганизмов.

9. Изучена чувствительность 8 музейных штаммов *Photorhabdus* spp. к 20 антимикробным препаратам семи функциональных групп (пенициллины, аминогликозиды, фторхинолоны, тетрациклины, карбапенемы, сульфаниламиды и группа хлорамфеникола).

10. Установлено влияние температур выращивания ( $25\pm 1$ ) °С и ( $35\pm 1$ ) °С на чувствительность *P. asymbiotica* US86, US88 и AU46 и *P. luminescens* Нb<sup>T</sup> к антибиотикам группы пенициллинов (ампициллину, бензилпенициллину и амоксициллину/клавулановой кислоте); обосновано использование температуры ( $35\pm 1$ ) °С для получения достоверных значений клинической категории чувствительности данных бактерий.

11. Разработаны Технические условия (ТУ 9385-227-78095326-2015), Промышленный регламент (ПР 78095326-150-2015) и Инструкция по применению на производство питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон).

12. Разработанная питательная среда агар Мюллера-Хинтон зарегистрирована в качестве медицинского изделия в Росздравнадзоре (регистрационное удостоверение № РЗН 2017/5962 от 10.07.2017 г.). В период с 2017 по 2021 гг. произведено и использовано в организациях практического здравоохранения более 6,5 тонн питательной среды; на 12.2021 г. количество бактериологических исследований, проведенных с ее использованием, составило более 3,5 млн.

#### **Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования**

Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон), в состав которой входит разработанный солянокислотный гидролизат казеина с заданными характеристиками, используется для постановки диско-диффузионного метода и метода градиентной диффузии в бактериологических лабораториях лечебно-профилактических учреждений здравоохранения Российской Федерации и рекомендуется к дальнейшему ее применению.

#### **Публикации автора по теме диссертации**

1. Шепелин, А.П. Оценка качества питательных сред для определения чувствительности к антибактериальным препаратам / А.П. Шепелин, Т.П. Морозова, **И.С. Косилова**, Г.П. Глазкова, Л.В. Домотенко // Дезинфекция. Антисептика. – 2013. – Т.4, №1. – С.43–48. ВАК, ИФ РИНЦ = 0,156, Цит. = 5.

2. Домотенко, Л.В. Отечественный агар Мюллера-Хинтон: соответствие современным требованиям / Л.В. Домотенко, **И.С. Косилова**, А.П. Шепелин // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9, № 2. – С. 409–416. WoS Core, Scopus, ИФ РИНЦ = 0,751, Цит. = 3.

3. **Косилова, И.С.** Испытания питательной среды отечественного производства «Агар Мюллера-Хинтон II – Оболенск» / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, Н.К. Фурсова, С.В. Дентовская, М.Г. Ершова, А.П. Шепелин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64. – С. 360–367. Scopus, ИФ РИНЦ = 0,544, Цит. = 3.

4. Патент RU № 2746624 Российская Федерация. Способ получения сухого солянокислотного гидролизата казеина / Домотенко Л.В., **Косилова И.С.**, Миронова Е.Н., Шепелин А.П. (RU); опубл.19.04.2021. – Бюл. № 11. – 17 с.

5. Домотенко, Л.В. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: настоящее и будущее / Л.В. Домотенко, **И.С. Косилова**, А.П. Шепелин // Современная лабораторная диагностика. – 2017. Т. 22, №2. – С.30–32.

6. **Косилова, И.С.** Оценка качества дисков с антибиотиками при определении антимикробной чувствительности / **И.С. Косилова**, Т.П. Морозова, Л.В. Домотенко, А.П. Шепелин. / Мат. науч.-практ. школы-конф. молодых ученых и специалистов науч.-исслед. организаций Роспотребнадзора: современные технологии обеспечения биологической безопасности. Под р. Г.Г. Онищенко, И.А. Дятлов.–Протвино:А-ПРИНТ,2010.– С.197–200.
7. **Косилова, И.С.** Оценка свойств агара Мюллера-Хинтон разных фирм-производителей / **И.С. Косилова**, Г.П. Глазкова, Т.П. Морозова, Л.В. Домотенко, А.П. Шепелин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13, № 2, прил. 1 – С. 21.
8. **Косилова, И.С.** Некоторые аспекты контроля качества питательных сред для определения антибиотикочувствительности / **И.С.Косилова**, Т.П. Морозова, Л.В.Домотенко // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 2, прил. 1. – С. 31.
9. Домотенко, Л.В. Определение чувствительности тест-штаммов к современным антибиотикам / Л.В. Домотенко, **И.С. Косилова**, Т.П. Морозова, А.П. Шепелин, М.В. Храмов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т. 15, № 2, прил. 1 – С. 20.
10. Домотенко, Л.В. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом / Л.В. Домотенко, И.С. Косилова, Г.П. Глазкова, А.П. Шепелин // Мат. IV Меж. науч.-практ. междисц. конфер. «Актуальные вопросы диагностики и лечения заболеваний микробной этиологии». – Железноводск. – 2013. – С. 115-117.
11. **Косилова, И.С.** Сравнение питательных сред при скрининге резистентности к метициллину (оксациллину) *Staphylococcus aureus* / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, Т.П. Морозова, А.П. Шепелин, М.В. Храмов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16, № 2, прил. 1 – С. 24–25.
12. **Косилова, И.С.** Определение чувствительности *H. influenzae* к антибактериальным препаратам / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, Т.П. Морозова, А.П. Шепелин, М. В. Храмов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17, № 2, прил. 1 – С. 32–33.
13. **Косилова, И. С.** Определение антибиотикочувствительности грамотрицательных бактерий разными методами / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, Н.К. Фурсова, А.И. Лев, А.П. Шепелин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2016. – Т. 18, № 2, прил. 1 – С. 25.
14. **Косилова, И.С.** Сравнительная оценка агара Мюллера–Хинтон II / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, А.П. Шепелин, М.Г. Ершова, С.Н. Ангелова, Е.Д. Полетаева // Инфекция и иммунитет. – 2016. –Т. 6, № 3. – С. 262–263.
15. **Косилова, И.С.** Валидация нового отечественного агара Мюллера-Хинтон II для определения лекарственной чувствительности микроорганизмов со сложными питательными потребностями / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, А.П. Шепелин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017.–Т.19,№ 2,прил.1.– С. 23.
16. **Косилова, И.С.** Испытания нового агара Мюллера-Хинтон II отечественного производства печатный / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, А. П. Шепелин, А.И. Лев, Н.К. Фурсова, Н.Н. Карцев, М.Г. Ершова, С. Н. Ангелова, Е.Д. Полетаева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19, № 2, прил. 1. – С. 23.
17. **Косилова, И.С.** Валидация агара Мюллера-Хинтон II отечественного производства / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, А.П. Шепелин, М.Г. Ершова, С.Н. Ангелова, Е. Д. Полетаева//Проблемы медицинской микологии.– 2017. – Т. 19, № 2.–С. 88.
18. **Косилова, И.С.** Чувствительность к антибактериальным препаратам нового возбудителя инфекционных болезней – *Photobacterium* spp./ **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, С.В. Дентовская, А.П. Шепелин // Мат. III Нац. конгресса бактериологов в рамках XI съезда

Всероссийского науч.-практ. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ВНОЭМП). – 2017. – Т. 2, № 3. – С. 71–72.

19. Домотенко, Л.В. Определение антибиоточувствительности в микробиологическом мониторинге возбудителей ИСМП / Л.В. Домотенко, **И.С. Косилова**, А.П. Шепелин // Мат. цикла семинаров «Риск – ориентированный подход и технологии профилактики инфекционных заболеваний, связанных с оказанием медицинской помощи». – Москва, ИнфоМедФарм Диалог. – 2018. – С. 37–41.

20. **Косилова, И.С.** Выявление карбапенемаза-продуцирующих клинических штаммов грамотрицательных бактерий на агаре Мюллер-Хинтон II отечественного производства / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, Н.К. Фурсова, А.П. Шепелин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т. 20, №2, прил. 1 – С. 26.

21. **Косилова, И.С.** Сравнительный анализ качества питательных сред для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, А.П. Шепелин // Мат. IV нац. конгр. бактериологов и междунац. симпозиума «Микроорганизмы и биосфера» «MICROBIOS-2018». – 2018. – С. 38.

22. **Косилова, И.С.** Применение агара Мюллера-Хинтон II отечественного производства при определении антибиоточувствительности микроорганизмов методом градиентной диффузии / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, А.П. Шепелин // X Всероссийская науч.-практ. конфер. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены». – 2018. – С. 191-193.

23. **Косилова, И.С.** Изучение элементного состава агара Мюллер-Хинтон / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, А.П. Шепелин // Мат. V Национального конгресса бактериологов. – 2019. – С.44.

24. **Косилова, И.С.** Влияние концентраций цинка в агаре Мюллера-Хинтон на результаты определения чувствительности микроорганизмов к АМП диско-диффузионным методом / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, А.П. Шепелин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2020. – Т. 22, № 2, прил. 1 – С. 17.

25. **Косилова, И.С.** Зависимость результатов диско-диффузионного метода от концентраций железа в агаре Мюллера-Хинтон / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, А.П. Шепелин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2021. – Т. 23, № 2, прил. 1 – С. 22.

26. **Косилова, И.С.** Сравнение значений минимальных подавляющих концентраций, полученных методом градиентной диффузии и микроразведений в бульоне / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, А.П. Шепелин, Н.К. Фурсова // Мат. VI Национального конгресса бактериологов. – 2021. – С.34.

#### Список сокращений и условных обозначений

АМП	Антимикробные препараты
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам)
S, I, R	Клинические категории чувствительности: чувствительный (S), умеренно-резистентный (I), устойчивый (R)
ISO	International Organization for Standardization (Международная организация по стандартизации)
ИСМП	Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
СГК	Солянокислотный гидролизат казеина
МХА	Агар Мюллера-Хинтон
МПК	Минимальные подавляющие концентрации
СИМ-тест	Carbapenem Inactivation Method (метод выявления продукции карбапенемаз)