

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**  
**Федеральное бюджетное учреждение науки**  
**«Государственный научный центр прикладной микробиологии и**  
**биотехнологии»**

*На правах рукописи*

**Косилова Ирина Сергеевна**

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

Специальность – 1.5.6 – «Биотехнология»

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат химических наук  
Домотенко Любовь Викторовна

Оболенск – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ОГЛАВЛЕНИЕ .....                                                                                                                   | 2  |
| ВВЕДЕНИЕ .....                                                                                                                     | 6  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                                                    | 15 |
| 1.1 Проблема распространения микроорганизмов, устойчивых к антимикробным препаратам .....                                          | 15 |
| 1.2 Методы определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам .....                                           | 18 |
| 1.2.1 Фенотипические методы .....                                                                                                  | 18 |
| 1.2.2 Молекулярно-биологические методы.....                                                                                        | 29 |
| 1.3 Стандартизация диско-диффузионного метода .....                                                                                | 31 |
| 1.3.1 Влияние качества дисков на результаты определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам .....          | 36 |
| 1.3.2 Влияние качества питательных сред на результаты определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам..... | 38 |
| 1.4 Агар Мюллера-Хинтон и его компоненты .....                                                                                     | 43 |
| 1.5 Кислотный гидролизат казеина – основной компонент агара Мюллера-Хинтон .....                                                   | 45 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ «ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ» .....                                                                                       | 46 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....                                                                                     | 48 |
| 2.1. Материалы.....                                                                                                                | 48 |
| 2.1.1 Сырье для получения солянокислотного гидролизата казеина .....                                                               | 48 |
| 2.1.2 Компоненты питательных сред .....                                                                                            | 48 |
| 2.1.3 Питательные среды.....                                                                                                       | 49 |
| 2.1.4 Микроорганизмы .....                                                                                                         | 50 |
| 2.1.5 Диски с антимикробными препаратами .....                                                                                     | 51 |

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.6 Е-тесты .....                                                                                                                                                     | 52 |
| 2.2 Методы .....                                                                                                                                                        | 52 |
| 2.2.1 Биотехнологические методы .....                                                                                                                                   | 52 |
| 2.2.2 Микробиологические методы.....                                                                                                                                    | 53 |
| 2.2.3 Методы определения чувствительности микроорганизмов к<br>антимикробным препаратам .....                                                                           | 54 |
| 2.2.4 Молекулярно-биологические методы.....                                                                                                                             | 59 |
| 2.2.5 Физико-химические методы .....                                                                                                                                    | 59 |
| 2.2.6 Клинические испытания питательной среды.....                                                                                                                      | 61 |
| 2.2.7 Статистические методы .....                                                                                                                                       | 62 |
| РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....                                                                                                                               | 63 |
| ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА<br>СОЛЯНОКИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗАТА КАЗЕИНА .....                                                                               | 63 |
| 3.1 Изучение возможности использования коммерческих солянокислотных<br>гидролизатов казеина для производства питательной среды .....                                    | 63 |
| 3.2 Разработка технологии производства солянокислотного гидролизата казеина                                                                                             | 70 |
| 3.2.1 Получение солянокислотного гидролизата казеина с требуемым<br>содержанием хлор-ионов .....                                                                        | 72 |
| 3.2.2 Получение солянокислотного гидролизата казеина с пониженным<br>содержанием тимидина .....                                                                         | 72 |
| 3.2.3 Получение солянокислотного гидролизата казеина с оптимальным<br>содержанием ионов $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ и $\text{Zn}^{2+}$ ..... | 74 |
| 3.2.4 Получение солянокислотного гидролизата казеина с определенным<br>значением pH.....                                                                                | 79 |
| 3.3 Технологическая схема производства солянокислотного гидролизата казеина<br>.....                                                                                    | 80 |

|                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4 Характеристики солянокислотного гидролизата казеина.....                                                                               | 83  |
| 3.4.1 Физико-химические свойства.....                                                                                                      | 83  |
| 3.4.2 Элементный состав.....                                                                                                               | 83  |
| 3.4.3 Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций .....                                                                           | 84  |
| 3.4.4 Аминокислотный состав .....                                                                                                          | 85  |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ «РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА<br>СОЛЯНОКИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗАТА КАЗЕИНА» .....                                     | 86  |
| ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ ФИЗИКО-<br>ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК.....                               | 88  |
| 4.1 Физико-химические показатели качества питательной среды.....                                                                           | 88  |
| 4.2 Биологические показатели качества разработанной питательной среды .....                                                                | 89  |
| 4.2.1 Показатель чувствительности питательной среды, стабильности основных<br>биологических свойств и скорости роста микроорганизмов ..... | 89  |
| 4.2.2 Показатель чувствительности микроорганизмов к антимикробным<br>препаратам диско-диффузионным методом .....                           | 90  |
| 4.3 Определение сроков годности питательной среды .....                                                                                    | 95  |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ «РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И<br>ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ<br>ХАРАКТЕРИСТИК».....                | 96  |
| ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ .....                                                                                      | 98  |
| 5.1 Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов .....                                                                                    | 98  |
| 5.2 Чувствительность штаммов микроорганизмов, возбудителей ИСМП.....                                                                       | 102 |
| 5.3 Чувствительность клинических штаммов микроорганизмов.....                                                                              | 105 |
| 5.4 Чувствительность штаммов <i>Photorhabdus</i> spp. ....                                                                                 | 106 |
| 5.5 Испытания питательной среды методом градиентной диффузии .....                                                                         | 109 |

|                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.6 Испытания питательной среды при выполнении СИМ-теста.....                    | 111 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....                                                                 | 115 |
| ВЫВОДЫ .....                                                                     | 117 |
| РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ<br>ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ..... | 120 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....                                    | 121 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....                                                           | 122 |
| ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ .....                                      | 140 |
| СПИСОК РИСУНКОВ.....                                                             | 145 |
| СПИСОК ТАБЛИЦ .....                                                              | 146 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ А .....                                                               | 149 |

## ВВЕДЕНИЕ

Распространение микроорганизмов, устойчивых к антимикробным препаратам (АМП), представляет угрозу для общественного здравоохранения во всем мире [49, 102]. 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 [51, 116, 118].

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 [7, 44].

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 [116].

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 [82]. Кроме того, регулярный пересмотр критериев чувствительности микроорганизмов к уже известным АМП и разработка критериев к новым АМП для каждой питательной среды требовали огромных усилий и затрат [41].

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 [8, 39, 57, 114].

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 [79, 63, 89, 127], фторхинолонов и тетрациклинов [64], содержание ионов марганца ( $\text{Mn}^{2+}$ ) – на активность тигециклина [76, 119, 121], цинка ( $\text{Zn}^{2+}$ ) – на активность карбапенемов [61, 65], а содержание пиримидинового нуклеозида тимидина влияет на активность сульфаниламидных препаратов [83, 115].

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 косвенные требования – по значениям диаметров зон подавления роста *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 вокруг диска с гентамицином [58].

Результаты одного из последних исследований, проведенных экспертами EUCAST, 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 [39].

В нашей стране для постановки диско-диффузионного метода разрешена, помимо агара Мюллера-Хинтон, питательная среда АГВ [1]. Ее использование усложняет ситуацию со стандартизацией метода тестирования, так как в ряде публикаций было отмечено получение недостоверных результатов с использованием данной питательной среды [17, 33, 36].

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 [101].

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 [2, 29, 111]. 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 пригодности гидролизата в качестве компонента агара Мюллера-Хинтон и технология производства самой питательной среды агара Мюллера-Хинтон.

Большинство работ отечественных и зарубежных авторов посвящено оценке качества питательных сред, предназначенных для определения чувствительности микроорганизмов к АМП [17, 33, 36, 41, 47, 89, 103]. 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 [33]. Данная проблема в РФ является особенно актуальной, так как единственный зарегистрированный отечественный агар Мюллера-Хинтон не удовлетворяет требованиям международных стандартов [36].

**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 двухвалентных ионов 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 чувствительность *Photorhabdus* spp. 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 *Photorhabdus asymbiotica* и *P. luminescens* к аминогликозидам, тетрациклинам, карбапенемам, хлорамфениколу, триметоприму/сульфаметоксазолу, цефалоспорином, фторхинолонам, макролидам и пенициллинам. Выявлено влияние температуры выращивания ( $25\pm 1$ ) °C и ( $35\pm 1$ ) °C бактерий *Photorhabdus* spp. на чувствительность к антибиотикам группы пенициллинов (амоксициллину/клавулановой кислоте, ампициллину и бензилпенициллину) и обосновано использование температуры ( $35\pm 1$ ) °C 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 больницей) – 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. В работе использовали биотехнологические методы, микробиологические методы, молекулярно-биологические методы, физико-химические методы и статистические методы обработки данных.

#### **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. Объем диссертации составляет 149 страниц текста с 6 рисунками и 26 таблицами. Список литературы содержит 128 наименований.

## **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Проблема распространения микроорганизмов, устойчивых к антимикробным препаратам**

Широкое распространение микроорганизмов, устойчивых к АМП, вызывает серьезную проблему общественного здравоохранения во всем мире [49]. В середине прошлого века клиницисты сталкивались, как правило, с инфекциями, вызванными микроорганизмами устойчивыми к одному-двум классам антибиотиков, а в настоящее время встречаются микроорганизмы, устойчивые ко всем классам антибиотиков [51].

По результатам исследования ситуации с резистентностью микроорганизмов к АМП по всему миру, проведенного британским экономистом Джимом О'Нилом только в Европе и США ежегодно около 50 000 жизней уносят инфекции, вызванные возбудителями, устойчивыми к лекарственной терапии. В его докладе прогнозируется, что к 2050 г. это число возрастет до 10 миллионов смертей в год [7, 44, 117].

Данную проблему связывают также с увеличением количества применяемых антибиотиков в сельском хозяйстве при лечении животных, для профилактики распространения инфекций в качестве добавки в концентрированных кормах. В настоящее время свыше 63,2 тысяч тонн антибиотиков в год используются в сельском хозяйстве во всем мире, а по прогнозам экспертов к 2030 г. их потребление вырастет до 105,6 тысяч тонн в год из-за увеличения численности населения и возрастания потребительского спроса на продукты сельскохозяйственного производства [6]. Устойчивые к антибиотикам микроорганизмы, ассоциированные с животными, широко распространены в окружающей среде и могут передаваться людям через пищевые цепи. Попадая в организм человека, они могут вызывать сложные и неизлечимые инфекции. Большое беспокойство вызывает тот факт, что АМП,

предназначенные для лечения людей, применяются также в сельском хозяйстве и ветеринарии: в США, например, более 70 % АМП, используемых для лечения людей, применяются и в сельском хозяйстве [98].

В 2015 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) приняла Глобальный план действий по борьбе с резистентностью микроорганизмов к АМП, направленный на снижение возникновения микроорганизмов, устойчивых к АМП [43, 54, 80].

Высшей формой признания проблемы явилось проведение в рамках семьдесят первой сессии Генеральной Ассамблеи ООН специальной сессии, посвященной резистентным к АМП микроорганизмам. На сессии страны-члены ООН, в том числе и наша страна, договорились о разработке национальных планов противодействия антибиотикорезистентности. В связи с этим, в 2017 г. в России приняли «Стратегию предупреждения и преодоления устойчивости микроорганизмов и вредных организмов растений к лекарственным препаратам, химическим и биологическим средствам на период до 2030 г. и дальнейшую перспективу», направленную на борьбу с антибиотикорезистентностью [7]. В основе российской стратегии лежат пять направлений: повышение информированности о проблеме устойчивости микроорганизмов к АМП; улучшение эпидемиологического надзора за резистентными микроорганизмами; создание новых препаратов; создание финансовой основы для постоянного проведения исследования; улучшение диагностики и внедрение обязательных лабораторных исследований, направленных на выявление антибиотикорезистентности в медицинских организациях.

В 2017 г. ВОЗ впервые опубликовала список бактерий, резистентных к лекарственным средствам и представляющих наибольшую опасность жизни и здоровью людей, для борьбы с которыми крайне необходимы новые антибиотики [80]. За последнее десятилетие ученые разработали всего несколько новых антибиотиков (теиксобактин, лефамулин, гепотидацин и

др.), а подавляющая часть из недавно одобренных лекарств являются аналогами уже существующих [54]. Большинство из появившихся новых антибиотиков проявляют активность против грамположительных бактерий. Основная проблема появления новых классов антибиотиков заключается в высоких затратах на разработку, проведение клинических испытаний и их выпуск. Крупные фармацевтические компании переориентировались на сферы с большей коммерческой выгодой, а в малых и средних предприятиях для создания новых классов антибиотиков недостаточно средств.

В 2014 г. около тридцати семи новых антибиотиков находилось на стадии утверждения Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration), но только некоторые из них являлись активными против микроорганизмов, относящихся к группе ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* и *Enterobacterales*). Представители данной группы чаще всего демонстрируют устойчивость к антибиотикам и являются причиной большинства инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [97].

В настоящее время ученые ведут разработку около пятидесяти новых антибиотиков, но большинство из них, как показывают испытания, менее эффективны по сравнению с существующими [75].

Устойчивость к антимикробным препаратам – многогранная проблема, которая может быть решена комплексными действиями. Одним из путей преодоления появления микроорганизмов устойчивых к АМП является правильное назначение АМП на основе достоверных результатов лабораторного тестирования [22].

Ошибки при выполнении тестирования чувствительности приводят к неправильному выбору антибиотиков для лечения и способствуют распространению резистентности [7, 43]. Для определения чувствительности микроорганизмов к АМП необходимо применять только стандартизованные

специально предназначенные для этих целей методы или комбинацию нескольких методов.

## **1.2 Методы определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам**

В настоящее время существуют фенотипические и молекулярно-биологические методы определения чувствительности микроорганизмов к АМП.

### **1.2.1 Фенотипические методы**

К фенотипическим методам относятся метод последовательных (серийных) разведений и диффузионные методы: диско-диффузионный метод и метод градиентной диффузии (метод Е-тестов) [90].

#### **1.2.1.1 Метод последовательных (серийных) разведений**

Метод последовательных (серийных) разведений основан на определении минимальных подавляющих концентраций (МПК), которые характеризуют микробиологическую активность АМП.

Данный метод подразделяется на метод последовательных (серийных) разведений в агаре и в бульоне в зависимости от используемой питательной среды. В зависимости от объема жидкой питательной среды различают метод макро- и микроразведений.

Принцип метода последовательных (серийных) разведений в агаре заключается в посеве тестируемых микроорганизмов на ряд чашек Петри с питательной средой. В каждой питательной среде находится АМП в одной из концентраций ряда двукратных разведений, кроме одной (контрольной) – в

ней АМП отсутствует. После инкубации проводят учет результатов по наличию или отсутствию роста на всех засеянных питательных средах. За значение МПК принимают концентрацию АМП, вызывающую полное подавление видимого роста микроорганизма.

Принцип метода последовательных (серийных) макроразведений в бульоне заключается в посеве тестируемого микроорганизма в пробирки, предварительно заполненные питательной средой с одной из концентраций ряда двукратных разведений АМП. Одна из пробирок предназначена для контроля роста тестируемого микроорганизма и не содержит АМП. После инкубации в проходящем свете проводят учет результатов по наличию или отсутствию роста (помутнения питательной среды) во всех засеянных пробирках. За значение МПК принимают концентрацию АМП, которая приводит к полному подавлению видимого роста тестируемого микроорганизма.

Техника постановки метода последовательных (серийных) микроразведений в бульоне аналогична технике постановки макроразведений в бульоне. Различия касаются только количества используемой питательной среды с разведениями АМП и количества вносимой суспензии тестируемого микроорганизма. Основным преимуществом данного метода является величина конечного объема, которая в 10 раз ниже метода макроразведений и составляет 0,1-0,2 мл, что позволяет значительно сократить количество расходных материалов и повысить производительность.

Значения МПК, полученные тремя разновидностями метода последовательных (серийных) разведений, сопоставляют с пограничными значениями интерпретационных таблиц, представленных в нормативных документах по определению чувствительности микроорганизмов к АМП, и определяют клиническую категорию чувствительности тестируемого микроорганизма.

Метод микроразведений в бульоне является референтным методом, регламентированным международным стандартом ISO 20776-1:2019 и национальным ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010, а все вновь разрабатываемые методы и системы при регистрации проходят оценку в сравнительных исследованиях именно с данным методом [16, 94].

Этот метод хорошо стандартизирован для большинства бактерий, в том числе и прихотливых. Основными недостатками данного метода является длительность и трудоемкость проведения тестирования [59].

Принцип метода последовательных (серийных) разведений используется в автоматизированных анализаторах для определения чувствительности микроорганизмов, которые стали набирать популярность в последние годы. Следует отметить, что в большинстве анализаторов тестирование проводится на основе только двух концентраций АМП, соответствующих пограничным значениям МПК, за исключением автоматизированной системы Trek Diagnostic System (Sensititre), которая основана на классическом методе последовательных (серийных) разведений [55].

Автоматизированные системы выпускаются с программным обеспечением, в котором пограничные значения МПК базируются либо на методологии стандарта EUCAST, либо стандарта CLSI. Некоторые автоматы снабжены программным обеспечением, включающим обе методологии интерпретирования результатов. Следует отметить, что пограничные значения МПК для одинаковых комбинаций АМП-микроорганизм различаются между собой: более 50 % контрольных точек МПК в стандарте EUCAST значительно ниже, чем в стандарте CLSI [73].

Результаты исследований, посвященных определению чувствительности грамотрицательных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью к колистину при помощи автоматизированной системы VITEK 2 и референтного метода, показали высокий процент

совпадения результатов [96], а при тестировании штаммов *Enterobacterales* к двенадцати АМП с помощью VITEK 2 в сравнении с референтным методом процент совпадения составил 68,2 % (для ампициллина), а для остальных АМП – 100,0 % [113].

Основным преимуществом использования автоматических анализаторов является сокращение времени тестирования в среднем до 4 - 10 ч в зависимости от рода микроорганизмов. Определение проводится к относительно большому списку препаратов, который состоит от восемнадцати до тридцати шести наименований АМП, а результаты могут быть получены как в виде значений МПК, так и в виде клинических категорий чувствительности [86, 116].

При многочисленных положительных характеристиках использование анализаторов имеет ряд ограничений: панели содержат фиксированный набор АМП для конкретных групп микроорганизмов, невозможно тестировать медленно растущие бактерии, необходимо постоянно обновлять программное обеспечение в соответствии с меняющимися значениями МПК для некоторых микроорганизмов и АМП, необходимо обеспечение лабораторий высококвалифицированным персоналом. Кроме того, высокая стоимость анализаторов ограничивает их широкое применение.

#### **1.2.1.2 Диско-диффузионный метод**

Диско-диффузионный метод является одним из старейших методов определения чувствительности микроорганизмов к АМП и наиболее востребованным большинством бактериологических лабораторий во всем мире [86]. Его принцип основан на способности АМП диффундировать из пропитанных бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности питательной среды. Диск с антибиотиком помещается на поверхность питательной среды после посева

исследуемого микроорганизма. При этом практически одновременно начинаются два процесса: диффузия антибиотика из диска и рост микроорганизмов на поверхности среды.

Для проведения диско-диффузионного метода готовят питательную среду в соответствии с инструкцией производителя, автоклавируют, охлаждают до температуры  $(49 \pm 1)^\circ\text{C}$  и разливают по чашкам Петри. При этом, толщина слоя агара должна составлять  $(4,0 \pm 0,5)$  мм, что соответствует 25 мл питательной среды на чашку Петри диаметром 90 мм, так как размер и форма зоны подавления роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя. После приготовления чашки с питательной средой засевают тестируемым микроорганизмом при помощи стерильного ватного тампона, предварительно погруженного в бактериальную суспензию (см. рисунок 1.1).

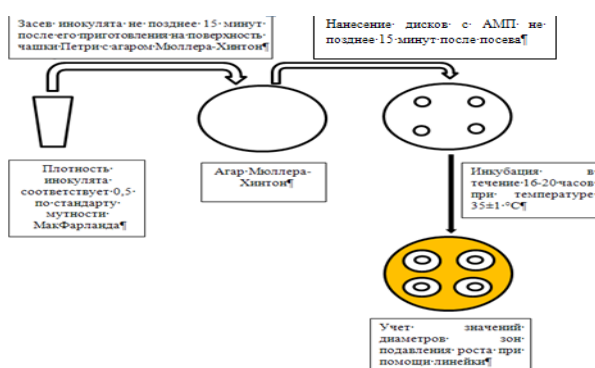


Рисунок 1.1 – Схема постановки диско-диффузионного метода

При посеве инокулят на поверхность агара наносят в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на  $60^\circ$ . Плотность используемого инокулята должна строго соответствовать 0,5 по стандарту мутности МакФарланда, так как более или менее плотный инокулят может привести к формированию либо слишком маленьких, либо слишком больших зон подавления роста. Приготовленный инокулят следует использовать не позднее 15 мин после приготовления. После нанесения инокулята на поверхность засеянных чашек Петри с питательной средой не позднее 15 мин наносят диски с АМП и не позднее 15 мин после аппликации дисков чашки Петри с посевами помещают в термостат кверху дном и инкубируют от 16 ч

до 20 ч при температуре  $(35\pm 1)^\circ\text{C}$ . Увеличение интервала времени между нанесением дисков на поверхность питательной среды и началом инкубации приводит к увеличению диаметров зон подавления роста.

После окончания инкубации проводят учет чашек Петри с посевами в отраженном свете. Для этого их помещают кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал под углом в  $45^\circ$ . Измеряют диаметры зон полного подавления роста с точностью  $\pm 1$  мм при помощи линейки. Полученные значения диаметров зон подавления роста сравнивают с пограничными значениями, представленными в интерпретационных таблицах. Затем тестируемый микроорганизм относят к одной из клинических категорий чувствительности.

Диско-диффузионный метод стандартизирован для определения чувствительности к АМП как быстрорастущих микроорганизмов, так и микроорганизмов со сложными питательными потребностями. Метод обладает высокой воспроизводимостью, прост в использовании, относительно дешевый и доступен для любой бактериологической лаборатории.

Разновидностями классического диско-диффузионного метода являются метод комбинированных дисков, метод двойных дисков, метод инактивации карбапенемов (Carbapenem Inactivation Method – CIM-тест). Перечисленные методы позволяют выявлять отдельные механизмы резистентности.

Так, метод комбинированных дисков позволяет подтвердить продукцию карбапенемаз и БЛРС ( $\beta$ -лактамаз расширенного спектра) у штаммов *Enterobacterales*. Он основан на использовании специфических ингибиторов карбапенемаз и БЛРС. Подтверждение продукции карбапенемаз методом комбинированных дисков проводят при помощи диска с меропенемом и комбинированного диска, содержащего меропенем с одним из ингибиторов: бороновой кислотой, ингибирующей карбапенемазы

класса А (преимущественно КРС – карбапенемазы расширенного спектра), дипиколиновой кислотой и этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), ингибирующих металло-бета-лактомазы (МБЛ) класса В (NDM, VIM и IMP), клоксациллином, являющимся ингибитором AmpC [27]:

- при получении значения диаметра зоны подавления роста тестируемого штамма вокруг диска с меропенемом больше 28 мм регистрируют отсутствие продукции карбапенемаз у тестируемого штамма – отрицательный результат;

- при получении значения диаметра зоны подавления роста тестируемого штамма в интервале от 25 мм до 27 мм дополнительно определяют его чувствительность к пиперациллину/тазобактаму. Если по полученным значениям диаметра зоны подавления роста штамм интерпретируется как умеренно-резистентный к пиперациллину/тазобактаму, то дается заключение об отсутствии продукции карбапенемаз – отрицательный результат.

- при получении значения диаметра зоны подавления роста тестируемого штамма вокруг диска с меропенемом меньше 28 мм регистрируют продукцию карбапенемаз – положительный результат.

Далее в случае положительного результата проводят исследование по изучению вида карбапенемазы, которую продуцирует тестируемый штамм:

- при выявлении синергизма между диском с меропенемом и комбинированным диском (меропенем + бороновая кислота) отмечают продукцию КРС или любой другой карбапенемазы класса А;

- при выявлении синергизма между диском с меропенемом и комбинированным диском (меропенем + дипиколиновая кислота) регистрируют продукцию МБЛ класса В;

- при выявлении синергизма между диском с меропенемом и комбинированным диском (меропенем + бороновая кислота) отмечают продукцию AmpC;

Для подтверждения продукции БЛРС методом комбинированных дисков используют диск, содержащий один из цефалоспоринов (цефотаксим, цефтазидим или цефепим), а также комбинированный диск с теми же цефалоспоринами в сочетании с клавулановой кислотой. Для проведения тестирования на поверхность чашек Петри с засеянным штаммом раскладывают описанные выше диски. После инкубации чашек Петри с посевами проводят интерпретацию результатов: тестируемый штамм оценивается как продуцирующий БЛРС при получении разницы между значениями диаметров зон подавления роста вокруг диска с одним из цефалоспоринов и комбинированным диском с цефалоспорином и клавулановой кислотой равной или больше 5 мм.

Продукцию БЛРС у штаммов *Enterobacterales* также выявляют методом двойных дисков. Для этого метода используют диски с амоксициллином/клавулановой кислотой, цефтазидимом и цефотаксимом. Для постановки метода на поверхность чашки Петри с питательной средой, засеянной тестируемым штаммом, наносят диск с амоксициллином/клавулановой кислотой, а по сторонам от него на расстоянии 20 мм и 30 мм между центрами наносятся диски с цефтазидимом и цефотаксимом соответственно. После инкубации чашек Петри с посевами проводят учет результатов: тестируемый штамм оценивается как продуцирующий БЛРС, если зоны подавления роста вокруг дисков с цефалоспоринами окажутся «вытянутыми» в сторону диска с амоксициллином/клавулановой кислотой. При исследовании штаммов с крайне высоким или крайне низким уровнем резистентности, расстояние между дисками может быть либо уменьшено до 15 мм, либо увеличено до 30 мм соответственно [104].

Преимуществом данных методов является простота в использовании и относительно низкая стоимость. Недостатками являются ограничения при детекции БЛРС у отдельных представителей *Enterobacterales*

(*Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Bacteroides* spp. и др.), возможность получения ложноотрицательных результатов для штаммов, продуцирующих другие цефалоспорин-гидролизующие ферменты, и для штаммов с экстремально высоким и низким уровнем устойчивости к цефалоспорином, длительность исследования, которая составляет около 18 ч [68].

Как показали результаты исследования, посвященного сравнению методов комбинированных и двойных дисков, первым методом продукцию БЛРС обнаружили у 141 штамма *Enterobacterales* из 471 протестированного (преимущественно *E. coli* и *K. pneumoniae*), а методом двойных дисков – у 139 штаммов [84]. При обнаружении продукции БЛРС при помощи системы Vitek 2 полученные результаты совпали с методом двойных дисков в 93,6 % случаев [66].

При помощи недавно разработанного метода СИМ-тест возможно установить продукцию карбапенемаз без их дифференциации [120]. Принцип метода заключается в выявлении карбапенемазной активности путем проведения ферментативного гидролиза диска с меропенемом, концентрация которого составляет 10 мкг, при инкубации его в водной суспензии тестируемого микроорганизма, плотность которой соответствовала 0,5 по стандарту мутности МакФарланда. Инкубацию проводят при температуре  $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 2 ч. Затем обработанные микробной суспензией и контрольные (необработанные) диски помещают на поверхность питательной среды, предварительно засеянной стандартным тест-штаммом *E. coli* ATCC 25922, и инкубируют при температуре  $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 6 ч. В случае отсутствия зоны подавления роста через 6 ч инкубации вокруг обработанного диска отмечают наличие продукции карбапенемаз для исследуемого штамма (положительный результат) из-за полного разрушения меропенема под действием карбапенемаз. При наличии зоны подавления

роста с диаметром более 20 мм отмечают отсутствие карбапенемазной активности в исследуемом штамме (отрицательный результат) [112].

Этот метод показал высокую согласованность с результатами, полученными с помощью ПЦР по обнаружению генов резистентности *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> и *bla*<sub>OXA-23</sub>. Он позволяет определять активность карбапенемаз для представителей порядка *Enterobacteriales*, таких как *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae*, а также у неферментирующих *P. aeruginosa* и *A. baumannii*. Показано, что CIM-тест является рентабельным и надежным методом фенотипического скрининга, с помощью которого можно определять активность карбапенемаз [106, 128].

Одной из модификаций метода CIM-теста является Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM-тест), методика постановки которого аналогична методике CIM-теста. Отличие заключается в использовании триптиказо-соевого бульона вместо дистиллированной воды при приготовлении бактериальной суспензии тестируемого штамма и увеличении времени инкубации диска с меропенемом в бактериальной суспензии с 2 ч до 4 ч. Данная модификация метода продемонстрировала большую чувствительность по сравнению с исходным – 93,0 % против 82,0 % [106].

### 1.2.1.3 Метод градиентной диффузии (метод E-тестов)

Метод градиентной диффузии в отличие от диско-диффузионного метода позволяет получать значения МПК антибиотиков. Принцип метода заключается в использовании стандартных пластиковых полосок, на нижних поверхностях которых нанесены АМП с экспоненциально убывающим градиентом концентрации (примерно 15 концентраций), например, от 256 мкг/мл до 0,016 мкг/мл. На верхней поверхности полосок нанесена шкала значений МПК [109].

Процедура тестирования заключается в размещении полосок на агаровую среду, засеянную тестируемым микроорганизмом. Через  $(17 \pm 1)$  ч инкубации при температуре  $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$  образуется зона подавления роста микроорганизма в виде эллипса из-за градиента концентраций антибиотика. Подавление роста вокруг полоски происходит только в той зоне, где концентрация антибиотика выше МПК. Значение МПК регистрируется на пересечении эллипсовидной зоны подавления роста с краем полоски.

Оценки эффективности данного метода посвящено несколько исследований [42, 45, 53]. Например, одно из них посвящено определению МПК цефтаролина для метициллин-устойчивых и метициллин-чувствительных штаммов *S. aureus*, другое – определению МПК цефтолозан/тазобактама для *Enterobacterales* двумя методами – с помощью Е-тестов и методом микроразведений в бульоне. Результаты, полученные двумя методами, совпадали между собой более чем для 95 % в первом случае и более чем для 90 % во втором.

В настоящее время, помимо Е-тестов, налажен выпуск МПК тест-полосок (фирма-производитель Liofilchem), M.I.C.Evaluator (фирма-производитель Oxoid) и полосок Ezy–МПК (фирма-производитель HiMedia), принцип работы которых, аналогичен принципу работы Е-тестов. Результаты определения значений МПК восьми АМП, полученных для 29 тест-штаммов и 74 клинических изолятов *Neisseria gonorrhoeae* с помощью тест-полосок трех фирм-производителей показали относительно высокий процент совпадений по категориям чувствительности с результатами Е-тестов (bioMérieux) [85]. Так, процент категорийного совпадения для МПК тест-полосок составил 88,6 %, для M.I.C.Evaluator составил 87,1 %, а для полосок Ezy-МПК – 83,1 %.

Метод градиентной диффузии при сравнительной простоте использования позволяет получать количественные данные, тестировать чувствительность широкого набора микроорганизмов, включая

микроорганизмы со сложными питательными потребностями (стрептококки, пневмококки, гемофилы, гонококки, анаэробы и др.). Существенным недостатком метода является высокая стоимость расходных материалов, поэтому он не получил широкого распространения.

### 1.2.2 Молекулярно-биологические методы

В отличие от фенотипических методов, основанных на оценке влияния АМП на жизнеспособность микроорганизмов, молекулярно-генетические методы направлены на детекцию приобретённых генов резистентности и мутаций в геномах бактериальных возбудителей [71]. В настоящее время наибольшее распространение получили полимеразная цепная реакция (ПЦР), метод микрочипов и полногеномное секвенирование.

Метод ПЦР основан на амплификации последовательностей ДНК микроорганизма с детекцией продуктов. Для выполнения метода используются как колонии микроорганизмов, так и непосредственно клинический образец. С помощью ПЦР выявляют, например, гены резистентности у *Enterobacteriales*, а также у *P. aeruginosa* и *A. baumannii* к  $\beta$ -лактамам антибиотикам (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>), включая гены карбапенемаз (*bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>), а также к гликопептидам (*vanA* и *vanB*), макролидам (*erm*), тетрациклину (*tet*) и др. [19, 26].

При помощи микрочипов можно анализировать одновременно сотни мишеней, а при помощи ПЦР – только в среднем от пяти до восьми целевых последовательностей ДНК за один раз [18]. В настоящее время разработаны коммерческие наборы, которые позволяют идентифицировать микроорганизмы, а также определять молекулярные маркеры их резистентности к АМП [46, 116].

При помощи полногеномного секвенирования возможно прогнозировать чувствительность к АМП на основе одного анализа для отдельных видов бактерий (*S. aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*), но опубликованных данных об использовании полногеномного секвенирования в качестве инструмента для точного определения чувствительности других видов микроорганизмов к АМП недостаточно, либо они вообще отсутствуют [71]. В настоящее время этот метод пока является весьма дорогостоящим, а для получения результатов с его помощью требуется продолжительное время, поэтому в подавляющем большинстве случаев используется только в исследовательских целях [27].

Методы, основанные на ПЦР и технологии микрочипов, являются перспективными, так как позволяют быстро, с практически абсолютной чувствительностью и специфичностью определить наличие генов резистентности. К важным преимуществам относится прямое исследование клинических образцов без выделения чистой культуры тестируемого микроорганизма. Кроме того, обнаружение метициллинорезистентных *Staphylococcus* spp по выявлению у них гена *mecA* методом ПЦР является «золотым стандартом» [100], но для выполнения тестирований данным методом требуется специально оборудованное помещение, дорогостоящее оборудование и высококвалифицированный персонал.

С помощью молекулярно-генетических методов можно определить только наличие или отсутствие известных генов резистентности, но невозможно оценить их экспрессию.

Таким образом, молекулярно-генетические методы могут использоваться только для подтверждения механизмов резистентности у тестируемых изолятов, проявляющих устойчивость к АМП, и не могут заменить фенотипические методы при принятии клинических решений.

Помимо перечисленных методов в литературе описаны более новые подходы к определению чувствительности микроорганизмов к АМП: масс-

спектрометрия, проточная цитометрия [110], вибрационные кантилеверы [78, 92], изотермическая микрокалориметрия [81, 122], биосенсоры с покрытыми антителами магнитными микросферами [91], автоматизированная микроскопия иммобилизованных живых бактериальных клеток [46]. Основным преимуществом применения данных подходов в практике является сокращение времени анализа. Следует отметить, что многие из них находятся еще на стадиях разработки и испытаний.

Фенотипические и молекулярно-биологические методы определения чувствительности микроорганизмов к АМП имеют свои преимущества и недостатки. Эти методы дополняют друг друга, а полученные значения МПК или диаметры зон подавления роста отражают не только наличие или отсутствие генов резистентности, но и сложные взаимодействия между различными системами, включая клеточную проницаемость, доступность и связывание мишени, уровни ферментативной экспрессии и др. Кроме того, фенотипические методы могут осуществляться без специального оборудования в любой бактериологической лаборатории.

Экспертами EUCAST представлены результаты исследования по приоритетности использования фенотипических методов во всем мире, в соответствии с которыми диско-диффузионный метод является основным методом, используемым для определения чувствительности микроорганизмов к АМП более чем в 90 % лабораторий России, Франции, Норвегии, Швейцарии, Нидерландах, Эстонии, Новой Зеландии и др. странах [56].

### **1.3 Стандартизация диско-диффузионного метода**

Диско-диффузионный метод получил широкое применение в начале 1950-х гг., когда большинство бактериологических лабораторий начали использовать его вместо метода последовательных (серийных) разведений.

Исторически, диско-диффузионный метод не был стандартизован ни по используемым питательным средам, ни по концентрациям бактериальных суспензий, ни по продолжительности и температуре инкубирования посевов. Результаты оценивали только по наличию или отсутствию зон подавления роста микроорганизмов вокруг дисков с АМП, а результаты, полученные в разных бактериологических лабораториях, нельзя было сравнивать между собой.

Проблемой стандартизации метода начали заниматься еще в начале 1960 годов. В 1964 г. исследователи Кирби (Kirby) и Бауэр (Bauer) впервые опубликовали рекомендации, а в 1966 г. эксперты ВОЗ на основе их публикаций стандартизировали процедуру проведения диско-диффузионного метода. Метод получил название диско-диффузионный метод или метод Кирби-Бауэра (Kirby-Bauer) [82].

В дальнейшем стандартизацией метода занимались национальные микробиологические организации разных стран [37, 60, 67, 74, 105]. В настоящее время методология определения чувствительности микроорганизмов к АМП разрабатывается двумя международными организациями – CLSI и EUCAST, которые готовят и пересматривают стандарты, содержащие пограничные значения диаметров зон подавления роста различных видов и родов микроорганизмов вокруг дисков с новыми и известными АМП [8, 57].

Основные положения стандартов CLSI и EUCAST практически совпадают. Так, например, оба стандарта рекомендуют использовать единую питательную среду для постановки теста – агар Мюллера-Хинтон, диски, стандартизованные по концентрации АМП, одинаковую плотность бактериальной суспензии (0,5 по стандарту мутности МакФарланда), время посева, нанесения дисков с АМП, и формата представления диаметров зон подавления роста для определения клинической категории «чувствительные» («больше или равно» ( $\geq$ )).

Между тем, у стандартов CLSI и EUCAST существует ряд отличий. Одно из них касается питательных сред для микроорганизмов со сложными питательными потребностями. Для всех из них, кроме *Haemophilus influenzae*, CLSI рекомендует агар Мюллера-Хинтон с добавлением 5 % бараньей крови. Для *H. influenzae* должна быть использована специальная среда Haemophilus Test Medium, которая может быть приготовлена добавлением дрожжевого экстракта, гемина и  $\beta$ -никотинамидадениндинуклеотида ( $\beta$ -НАД) в агар Мюллера-Хинтон. В соответствии с рекомендациями EUCAST для всех требовательных микроорганизмов используется единая питательная среда – агар Мюллера-Хинтон с добавлением 5 % лошадиной крови и 20 мг/л  $\beta$ -НАД.

Следующее отличие относится к концентрации антибиотиков в дисках. Например, стандарт EUCAST рекомендует использовать диски с цефтазидимом, цефотаксимом и пиперациллином/тазобактамом в более низких концентрациях, чем стандарт CLSI [8, 57].

Перечень тест-штаммов, используемых для внутрилабораторного контроля качества, в стандартах также различаются (табл. 1.1).

Таблица 1.1 – Тест-штаммы, рекомендуемые стандартами CLSI и EUCAST для внутрилабораторного контроля качества

| Контрольные тест-штаммы                               | Требования стандарта CLSI                                                                                                     | Требования стандарта EUCAST                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Микроорганизмы с обычными питательными потребностями  | <i>E. coli</i> ATCC 25922<br><i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853<br><i>S. aureus</i> ATCC 25923<br><i>E. faecalis</i> ATCC 29212, | <i>E. coli</i> ATCC 25922,<br><i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853<br><i>S. aureus</i> ATCC 29213<br><i>E. faecalis</i> ATCC 29212 |
| Микроорганизмы со сложными питательными потребностями | <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619<br><i>H. influenzae</i> ATCC 49766<br><i>H. influenzae</i> ATCC 49247              | <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619<br><i>H. influenzae</i> ATCC 49766<br><i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560                  |

Как видно из табл. 1.1, в соответствии с методологией EUCAST необходимо использовать четыре тест-штамма микроорганизмов с обычными питательными потребностями, а именно *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, и три со сложными питательными потребностями – *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 49766 и *C. jejuni* ATCC 33560. В соответствии с методологией CLSI перечень первых тест-штаммов микроорганизмов практически совпадает с перечнем, рекомендуемым EUCAST, за исключением *S. aureus*. Список тест-штаммов со сложными питательными потребностями в стандарте CLSI также отличается от стандарта EUCAST: вместо *C. jejuni* ATCC 33560 рекомендован *H. influenzae* ATCC 49247.

Условия инкубации посевов (температура и время) также зависят от методологии: по EUCAST –  $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$  и  $(18 \pm 2)$  ч, а по CLSI –  $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$  и  $(17 \pm 1)$  ч, соответственно.

Еще одно отличие заключается в формате представления значений диаметров зон подавления роста, относящихся к категории «устойчивые»: в соответствии со стандартом CLSI – «меньше или равно» ( $\leq$ ), а в соответствии со стандартом EUCAST – «строго меньше» ( $<$ ).

С 2019 г. отличия между стандартами CLSI и EUCAST коснулись определений клинических категорий чувствительности тестируемых микроорганизмов. До 2019 г. микроорганизмы относили к одной из категорий: чувствительные (S), умеренно-резистентные (I), резистентные (устойчивые) (R) [8, 57].

Категория «S» подразумевала, что для эффективного лечения инфекций, вызванных тестируемым микроорганизмом, достаточно стандартного режима дозирования антимикробного препарата, рекомендованного для лечения.

Категория «I» означала, что для лечения инфекций, вызванных тестируемым микроорганизмом, существует высокая вероятность

терапевтического успеха, при локализации очага инфекции в тех органах и тканях, в которых возможно формирование высоких концентраций препарата, или при применении последнего в высоких дозах.

Категория «R» подразумевала, что для лечения инфекций, вызванных тестируемым микроорганизмом, вероятность терапевтического излечения не возможна даже при повышенных концентрациях антимикробного препарата, рекомендованного для лечения.

Начиная с 2019 г, в методологии EUCAST сохранилась аббревиатура клинических категорий S, I и R, но изменились определения категорий, особенно категории «I».

В настоящее время категория «S» называется «чувствительный при стандартном режиме дозирования», а микроорганизм оценивается как «чувствительный при стандартном режиме дозирования» при высокой вероятности эффективности терапии при стандартном режиме дозирования АМП.

Категория «R» называется «резистентный», а микроорганизм оценивается как «резистентный» при высокой вероятности терапевтической неудачи даже при увеличенной экспозиции препарата, которая отражает зависимость влияния АМП на тестируемый микроорганизм от пути введения АМП, дозы, интервала дозирования, продолжительности введения препарата, а также его распределения и пути выведения.

Название категории «I» изменилось с «умеренно-резистентный» на «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата», а микроорганизм оценивается как «чувствительный при увеличенной экспозиции», и теперь означает, что для лечения инфекций, вызванных тестируемым микроорганизмом, существует высокая вероятность эффективности терапии при увеличении экспозиции АМП путем коррекции режима дозирования или благодаря его концентрации в очаге инфекции [10].

Кроме того, в интерпретационных таблицах стандарта EUCAST с 2019 г. появился новый термин «зона технической неопределенности – ЗТН». Необходимость введения нового термина возникла из-за того, что за последние десять лет специалисты EUCAST при анализе получаемых результатов выявляли ситуации, при которых возникали трудности с определением клинической категории чувствительности для тестируемого штамма. Зона технической неопределенности обычно находится между категориями «чувствительный» и «резистентный», представленная в виде диапазона значений диаметров зон подавления роста тестируемого микроорганизма.

Не менее важным отличием стандартов является частота обновлений и доступ к ним. Рекомендации EUCAST пересматриваются ежегодно, обновленные версии находятся в свободном доступе Интернет-ресурсов организации, а рекомендации CLSI обновляются один раз в два-три года и доступ к обновленным версиям является платным.

Возможно, именно поэтому, примерно, от 50 % до 90 % бактериологических лабораторий, находящихся не только на территории Европы, но и в таких странах как Австралия, Марокко, Новая Зеландия, Исландия, Турция, и др. переходят к использованию методологии EUCAST. К числу этих стран относится и Российская Федерация [56, 95].

В соответствии с положениями стандартов EUCAST для получения достоверных и воспроизводимых результатов соблюдение только описанных выше требований к технике проведения тестирования недостаточно. Для этих целей необходимо использовать стандартные качественные питательные среды и диски с АМП [17, 33, 36, 39, 40, 114].

### **1.3.1 Влияние качества дисков на результаты определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам**

Качество дисков с АМП определяется двумя основными факторами: стандартностью концентраций АМП и соблюдением правил их хранения [34]. Влиянию качества дисков на результаты определения чувствительности посвящен ряд публикаций, в которых показано, что тестируемый штамм может попасть в разные клинические категории чувствительности в зависимости от фирмы-производителя [4, 52, 87, 108].

Эксперты EUCAST провели масштабное исследование по оценке качества дисков с АМП шестнадцати наименований девяти фирм-производителей [99]. Исследование проводили в два этапа и использовали диски с бензилпенициллином, амоксициллин/клавулановой кислотой, пиперациллин/тазобактамом, оксациллином, метициллином, цефотаксимом, цефокситином, цефтазидимом, меропенемом, ципрофлоксацином, пефлоксацином, норфлоксацином, гентамицином, тобрамицином, эритромицином и тетрациклином производства Becton Dickinson, Mast Group, Oxoid, Bio-Rad, Liofilchem, Abtek, SirScan, Bioanalyse и HiMedia.

Как показали результаты, диски с АМП производства Becton Dickinson, Mast Group и Oxoid продемонстрировали стабильные результаты и хорошее качество на обоих этапах исследования. На втором этапе исследования значительно улучшилось качество дисков Bio-Rad, Liofilchem, Abtek, SirScan и Bioanalyse: если первое исследование продемонстрировало 92 % тестов, соответствующих допустимому диапазону значений, то второе – 97 %. При этом 58 % тестов соответствовали целевым значениям во время первого испытания, а во время второго – 75 %.

Самые низкие показатели качества отмечены для дисков фирмы HiMedia: значения диаметров зон подавления роста не соответствовали допустимому диапазону во время первого испытания для 33 % тестов, а во время второго этот показатель снизился до 17 %.

В результате проведенного исследования сделан вывод, что в настоящее время необходимы более строгие требования к качеству дисков с

АМП, а проведение входного контроля качества каждой новой поступившей партии дисков должно быть обязательной процедурой в бактериологических лабораториях [40, 99, 114].

Не менее важным фактором, определяющим качество дисков с АМП, является условия хранения. Так, хранение дисков при температуре, несоответствующей рекомендуемой производителями (от +2 до +4) °С, может привести к снижению активности антибиотика в диске и получению ложных результатов тестирования, что особенно характерно для дисков с цефалоспоридами и карбапенемами [124].

Таким образом, для получения достоверных результатов определения антибиотикочувствительности рекомендуется использовать диски надежных фирм-производителей.

### **1.3.2 Влияние качества питательных сред на результаты определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам**

Как уже описано в п. 1.3 для проведения диско-диффузионного метода использовали различные питательные среды. В литературных источниках встречается применение триптиказо-соевого агара, агара Гроув и Рэндалла № 9 (Grove and Randall's formula # 9 agar), DST-агара, Sensitest агара, Iso-sensitest агара, агара Мюллера-Хинтон и агара Мюллера-Хинтон II [48, 50], для которого римская цифра II свидетельствует об использовании в его составе всех компонентов в сухом виде.

В нашей стране первоначально использовали мясо-пептонный агар и агар Хоттингера для этих целей [20], а позднее питательную среду АГВ [1] или ее аналог – питательную среду типа АГВ [36], которые до сих пор разрешены к применению [24]. Состав перечисленных питательных сред представлен в табл. 1.2.

Таблица 1.2 – Состав питательных сред для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

[illegible]

Продолжение табл. 1.2

[illegible]

Как видно из табл. 1.2, составы питательных сред, используемых для определения чувствительности микроорганизмов к АМП, отличались друг от друга.

Для получения стандартных воспроизводимых результатов национальные организации по стандартизации разрабатывали критерии качества для каждой из них, которые могли различаться [37, 60, 67, 74, 105]. Например, значение pH среды АГВ должно укладываться в диапазон от 7,2 до 7,6, а в агаре Мюллера-Хинтон – от 7,2 до 7,4 [20, 26, 125]. Различие питательных сред коснулось и содержание в них ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и тимидина, которые, как было изучено в ряде публикаций, оказывают влияние на активность некоторых антибиотиков и чувствительность микроорганизмов к ним. Так, содержание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и/или  $\text{Mg}^{2+}$  влияет на активность аминогликозидов, фторхинолонов и тетрациклинов, содержание ионов  $\text{Mn}^{2+}$  – на активность тигециклина,  $\text{Zn}^{2+}$  – на активность карбапенемов, а содержание пиримидинового нуклеозида тимидина влияет на активность сульфаниламидных препаратов [61, 63-65, 76, 79, 83, 89, 93, 115, 119, 121, 127].

Учитывая ситуацию с наличием широкого ассортимента питательных сред, отличающихся по физико-химическим показателям и содержанию ионов двухвалентных металлов, сначала CLSI, а позднее и новообразовавшийся комитет EUCAST рекомендовали к использованию единственную питательную среду – агар Мюллера-Хинтон. Выбор в пользу агара Мюллера-Хинтон был сделан из-за малокомпонентного состава и более высокой вероятности ее стандартизации, которая заключается в сбалансированном содержании в ней ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и тимидина. Слишком высокие или слишком низкие концентрации данных ионов двухвалентных металлов и тимидина могут привести к ложной устойчивости или ложной чувствительности, соответственно.

Одну из первых попыток стандартизовать агар Мюллера-Хинтон по содержанию в нем ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  в 1977 г предприняли специалисты ВОЗ и

установили следующие требования: (50-100) мг/л и (20-35) мг/л, соответственно [125].

Со временем требования к концентрациям этих ионов стали более строгими: от 20 мг/л до 25 мг/л для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и от 10 мг/л до 12,5 мг/л для ионов  $\text{Mg}^{2+}$  [24, 57]. В настоящее время в стандартах EUCAST нет конкретных требований по их содержанию, а существуют косвенные требования по соответствию значений диаметров зон подавления роста тест-штамма *P. aeruginosa* WDCM 00025 (ATCC 27853) вокруг диска с гентамицином (10 мкг) допустимому диапазону (от 17 мм до 23 мм) [58].

В 2016 г. международная организация по стандартизации (ISO) на основании результатов, приведенных в данных исследованиях, разработала международный стандарт и технические условия ISO/TS 16782:2016 «Clinical laboratory testing – Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller-Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing», в котором содержится описание физико-химических свойств и критериев оценки эффективности агара Мюллера-Хинтон [58]. В данном документе содержатся косвенные требования к содержанию ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  в питательной среде – соответствие значений диаметров зон подавления роста тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг диска с гентамицином, и количественные величины к содержанию ионов  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и тимидина – не более 8,0 мг/л, 3,0 мг/л и 0,03 мг/л, соответственно.

Но, несмотря на все усилия по стандартизации агара Мюллера-Хинтон, в настоящее время на мировом рынке все равно присутствуют питательные среды, не стандартизованные по содержанию ионов двухвалентных металлов и тимидина. Так, в 2020 г. экспертами EUCAST было опубликовано одно из последних исследований, посвященное оценке качества 21 образца агара Мюллера-Хинтон 17 фирм-производителей. В работе показано, что значения диаметров зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов вокруг дисков с АМП на средах шести фирм-производителей (Bio-Rad, Biolife, Oxoid, Sigma MH 2, BD BBL MH II и CRITERION) укладывались в допустимый интервал в 99 %

тестов, из которых для 70 % эти значения соответствовали целевому значению (находящемуся в середине допустимого диапазона). Значения, полученные на средах Biolab и Merck, не укладывались в допустимый интервал в 10 % и 23 % тестов, соответственно. Большинство несовпадающих результатов получены при тестировании чувствительности к триметоприму/сульфаметоксазолу, аминогликозидам и фторхинолонам [39].

В нашей стране данная проблема дополнительно усугубляется использованием питательной среды АГВ наряду с агаром Мюллера-Хинтон. Питательная среда АГВ разрешена действующим нормативным документом [24]. Результаты исследований показали, что питательная среда АГВ не стандартизована по содержанию ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и тимидина [17, 33, 36]. Данные по содержанию в ней ионов  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  в литературе отсутствуют, что ограничивает ее использование при определении чувствительности микроорганизмов к тигециклину и карбапенемам – антибиотикам выбора при лечении ИСМП. Единственный отечественный агар Мюллера-Хинтон тоже имеет проблемы со сбалансированным содержанием ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и тимидина [36].

Таким образом, актуальной проблемой являлась разработка отечественной питательной среды (агара Мюллера-Хинтон), удовлетворяющей требованиям международных стандартов по содержанию в ней ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и тимидина.

#### **1.4 Агар Мюллера-Хинтон и его компоненты**

Известно, что в состав агара Мюллера-Хинтон входят мясной экстракт, крахмал растворимый, агар бактериологический и кислотный гидролизат казеина [8, 57, 58, 70].

Мясной экстракт производят из скелетных мышц и костного мозга с очень низким содержанием жира. В составе питательных сред его используют для увеличения содержания аминного азота. Крахмал растворимый представляет

смесь полисахаридов амилозы и амилопектина. Используется в составе питательной среды в качестве адсорбента продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, способных ингибировать их рост.

В таблице 1.3 представлено содержание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  в мясном экстракте и крахмале растворимом. Анализ литературных данных по содержанию ионов  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  в мясном экстракте и крахмале растворимом показал их отсутствие [88, 126].

Таблица 1.3 – Содержание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  в мясном экстракте и крахмале растворимом

| Компонент питательной среды | Содержание ионов $\text{Ca}^{2+}$ , мкг/г | Содержание ионов $\text{Mg}^{2+}$ , мг/г |
|-----------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|
| Мясной экстракт             | 0,3±0,01                                  | 0,5±0,02                                 |
| Крахмал растворимый         | 0,8±0,02                                  | 0,7±0,01                                 |

Как видно из табл. 1.3, в мясном экстракте и крахмале содержится незначительное количество ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Их вклад в питательную среду является незначительным, поскольку доля этих компонентов в общей навеске среды составляет 4,0 % – 5,0 %. Большой процент в навеске питательной среды приходится на остальные два компонента – агар бактериологический и кислотный гидролизат казеина – 38,0 % и 53,0 %, соответственно.

Агар бактериологический – природный продукт, получаемый путем экстрагирования из красных и бурых водорослей. Плохо очищенный агар может подавлять рост микроорганизмов, поэтому в составе питательных сред используется только очищенный агар. При его производстве соблюдаются строгие требования по минимальному содержанию в нем золы ионов  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\leq 0,006$  %),  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\leq 0,003$  %), тяжелых металлов ( $\leq 0,004$  %) и др. [13].

Анализ приведенных данных показал, что основным источником макро- и микроэлементов в питательной среде является кислотный гидролизат казеина, поэтому его качество в большей степени влияет на качество питательной среды.

### **1.5 Кислотный гидролизат казеина – основной компонент агара Мюллера-Хинтон**

Казеин – сложный белок (фосфопротеид), образующийся из предшественника казеина – казеиногена при створаживании молока [12]. Кислотный гидролизат казеина получают в результате гидролитического расщепления молекулы белка кислотами до пептидов и свободных аминокислот. Для его производства, в основном, используют соляную и/или серную кислоту [32]. С помощью соляной кислоты расщепляется около 75 % белка, а при помощи серной – менее 50 % [5, 23], поэтому при кислотном гидролизе, в основном, используют соляную кислоту [2, 14].

Описано несколько способов получения кислотного гидролизата казеина:

- гидролиз казеина в смеси серной ( $4,0 \pm 0,5$ ) % и соляной кислот ( $6,0 \pm 0,5$ ) % в соотношении 1:3 при температуре  $101\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 72 ч, дающий степень расщепления белка около 76 % [101];

- гидролиз казеина в смеси серной ( $4,0 \pm 0,5$ ) % и соляной кислот ( $6,0 \pm 0,5$ ) % в соотношении 1:3, но в течение 48 ч, что приводит к получению кислотного гидролизата казеина со степенью расщепления белка около 59 % [111];

- гидролиз казеина с помощью ( $6,0 \pm 0,5$ ) % соляной кислоты и гидромодуле 1:5 при температуре  $(131 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч, что приводит к получению степени расщепления белка около 70 % (по ТУ 9385-077-78095326-2007).

Кислотные гидролизаты казеина, помимо основных продуктов – аминокислот, – содержат побочные: окрашенные соединения, хлор-ионы, ионы двухвалентных металлов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и др.), тимидин, которые могут вызывать ингибицию микроорганизмов или отрицательно влиять на качество питательной среды [5, 30, 32].

В литературе описано несколько способов очистки гидролизатов. Способ очистки по методу Сокхей, Хаббу и Бхаруча включает в себя осветление при помощи активированного угля при значении pH 7,4 и фильтрацию [111]. Способ

очистки по методу Мюллера и Джонсона включает в себя удаление хлор-ионов при помощи перегонки под вакуумом в течение (5-7) ч, освобождение от избытка ионов железа ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) либо оксидом, либо гидроксидом кальция при значении pH 5,0, осветление при помощи активированного угля, фильтрацию, осаждение ионов  $\text{Ca}^{+2}$  раствором гидрофосфата натрия и дигидрофосфата калия при значении pH около 7,6, фильтрацию [101], а способ очистки гидролизата казеина по ТУ 9385-077-78095326-2007 включает в себя избавление от хлор-ионов при помощи ионообменной смолы и осветление активированным углем. Основными недостатками методов является отсутствие стадий осаждения ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и освобождения от тимидина.

Таким образом, при разработке питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к АМП, удовлетворяющей требованиям международных стандартов, необходимо использовать в ее составе гидролизат казеина, технология производства которого обеспечивает сбалансированное содержание в нем ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и тимидина.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ «ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ»**

Распространение микроорганизмов, устойчивых к антимикробным препаратам, представляет угрозу для здравоохранения во всем мире. Одной из причин возникновения антибиотикоустойчивых микроорганизмов, является назначение схемы лечения без учёта определения чувствительности.

Для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, наиболее распространенным является диско-диффузионный метод, но на достоверность результатов, полученных данным методом, весомое влияние оказывает качество используемой питательной среды.

В настоящее время для диско-диффузионного метода стандартами EUCAST и CLSI рекомендовано использовать питательную среду – агар Мюллера-Хинтон, к которому предъявляются строгие требования.

Анализ публикаций, посвященных качеству агара Мюллера-Хинтон, показал, что не все питательные среды соответствуют требованиям современных международных стандартов. В нашей стране данная проблема является еще более актуальной, так как наряду с агаром Мюллера-Хинтон разрешена к использованию питательная среда АГВ, к качеству и стандартности которой существует много вопросов.

В связи с этим, актуальной проблемой являлась разработка стандартизированной питательной среды отечественного производства – агар Мюллера-Хинтон. Основным компонентом, влияющим на качество агара Мюллера-Хинтон, является кислотный гидролизат казеина. Предварительные исследования показали, что коммерческие гидролизаты не подходят для использования их в составе данной питательной среды, так они не стандартизованы по содержанию ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и тимидина, а в доступной литературе отсутствует описание способа его получения и требований к показателям его пригодности.

Таким образом, целью данной работы являлось 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.

## **Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Материалы**

#### **2.1.1 Сырье для получения солянокислотного гидролизата казеина**

Для получения солянокислотного гидролизата казеина в работе использовали:

- казеин технический кислотный по ГОСТ 31689-2012 (ООО «Молоко», Республика Мордовия);
- кислоту соляную синтетическую, техническую по ГОСТ 857-95 марки А (ОАО «Аурат»);
- натрий гидроксид технический гранулированный СТО 00203275-20-2007 (АО «Каустик»).

Для осветления солянокислого гидролизата казеина использовали уголь активный осветляющий древесный порошкообразный марки ОУ-А по ГОСТ 4453-74 (с изменениями 1-5) (АО «Сорбент»).

#### **2.1.2 Компоненты питательных сред**

При конструировании питательных сред использовали:

– кислотный гидролизат казеина (ФБУН ГНЦПМБ, серия 24, далее по тексту ГК-Оболенск); кислотный гидролизат казеина технический (Casein acid hydrolyzate Technical, HiMedia, кат. № RM 013, далее – ГК-НМ); кислотный гидролизат казеина технический (Casein acid hydrolyzate Technical, Merck, кат. № 1.02245, далее – ГК-Merck); казаминовые кислоты технические (Casamino acid technical, Becton Dickinson, кат. № 223120, далее – КК-BD); кислотный гидролизат казеина с пониженным содержанием хлорида натрия (Casein acid hydrolysate (NaCl <3 %), HiMedia, кат. № RM 189,

далее – ГК-НМ2); кислотный гидролизат казеина для коклюшной вакцины (Casein acid hydrolysate for pertussis vaccine, HiMedia, кат. № RM 495, далее – ГК-НМ3).

- мясной экстракт (Meat extract, Conda Pronadisa, кат. №1700) и мясной экстракт (Meat extract, HiMedia, кат. № RM 002);

- бактериологический агар четырех фирм-производителей (Becton Dickinson BBL кат. № 214010, Becton Dickinson Difco кат. № 0140-01, Conda Pronadisa кат. № 1800, HiMedia кат. № RM 026);

- крахмал растворимый (амилодекстрин) по ГОСТ 10163-76 (ООО «Химприбор-СПб») (далее – крахмал-Химприбор) и крахмал растворимый (Starch soluble, Acros Organics, кат. № 424495000) (далее – крахмал-Acros);

- соли двухвалентных металлов: кальций D-глюконат (Calcium D-gluconate monohydrate, Sigma, кат. №G4625), хлорид магния (Magnesium chloride, pure, Acros Organics, кат. № 22321), хлорид марганца (Manganese chloride, Sigma-Aldrich, кат. № 328146-25G) и сульфат цинка (Zinc sulfate heptahydrate, Sigma-Aldrich, кат. № Z0251-100G).

- дефибринированная лошадиная кровь (Horse blood, defibrinated, E&O Laboratories Limited, кат. № DHB 100);

- никотинамидадениндинуклеотид (NAD, Sigma, кат. № 43410);

- дрожжевой экстракт (Yeast extract, Becton Dickinson, кат. № 211929);

- гемоглобин (Hemoglobin, Becton Dickinson, кат. № 212392).

### 2.1.3 Питательные среды

В работе использовали питательные среды:

- набор реагентов для количественного определения микробной загрязненности (Питательная среда № 1 ГРМ, ФБУН ГНЦПМБ) по ТУ 9398-001-78095326-2006;

- питательная среда для тестирования *Haemophilus* (*Haemophilus test medium*, Oxoid, кат. № CM0898);
- агар Мюллера-Хинтон (*Agar Muller-Hinton*, Becton Dickinson BBL, кат. № 211438, далее – МХА-BBL), используемый в качестве контрольной питательной среды и среды сравнения;
- агар Мюллера-Хинтон (*Agar Muller-Hinton*, Becton Dickinson Difco, кат. № 225250, далее – МХА-Difco);
- агар Мюллера-Хинтон (*Agar Muller-Hinton*, Merck, кат. № 225250, далее – МХА-Merck);
- агар Мюллера-Хинтон (*Agar Muller-Hinton*, HiMedia, кат. № M1084, далее – МХА-НМ);
- агар Мюллера-Хинтон (*Agar Muller-Hinton*, Bio-Rad, кат. № 64884, далее – МХА-Bio-Rad);
- агар Мюллера-Хинтон (Агар Мюллера-Хинтон, НИЦФ, серия 2, далее – МХА-НИЦФ);
- питательная среда АГВ (НПО «Микроген», серия 1, далее по тексту – АГВ).

#### 2.1.4 Микроорганизмы

Для разработки питательной среды и проведения ее клинических испытаний использовали:

- 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, ATCC 51299, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 49766 и *K. pneumoniae* ATCC 700603, используемых для контроля качества питательных сред);
- 18 штаммов грамотрицательных микроорганизмов – возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП)

(*K. pneumoniae* (n=8), *P. aeruginosa* (n=2), *A. baumannii* (n=3), *P. mirabilis* (n=2), *S. marcescens* (n=1), *E. aerogenes* (n=1), *E. coli* (n=1));

– 8 музейных штаммов нового возбудителя инфекционных болезней – *P. asymbiotica* – 5 и *P. luminescens* – 3 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ - Оболенск»,

– 147 клинических изолятов (*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)), выделенных от больных, которые находились на лечении в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения Ярославской области «Инфекционная клиническая больница №1».

Перед работой культуру каждого микроорганизма инкубировали при температуре (36±1) °С в течение (19±1) ч на соответствующих питательных средах.

### 2.1.5 Диски с антимикробными препаратами

В работе использовали диски с 55 АМП (Becton Dickinson), относящиеся к 17 функциональным группам: *пенициллины*, включая пенициллины, защищенные ингибиторами β-лактамаз, (ампициллин 10 мкг и 2 мкг, ампициллин/сульбактам 10/10 мкг, амоксициллин/клавулановая кислота 20/10 мкг, бензилпенициллин 1 ЕД, карбенициллин 100 мкг, мециллинам 10 мкг, пиперациллин 30 мкг, пиперациллин/тазобактам 30/6 мкг, тикарциллин 75 мкг, тикарциллин/клавулановая кислота 75/10 мкг), *цефалоспорины* (цефуроксим 30 мкг, цефокситин 30 мкг, цефотаксим 5 мкг, цефподоксим 10 мкг, цефтриаксон 30 мкг, цефтазидим 10 мкг, цефоперазон/сульбактам 75/30 мкг, цефепим 30 мкг, цефтаролин 5 мкг), *монобактамы* (азтреонам 30 мкг), *карбапенемы* (эртапенем 10 мкг, меропенем 10 мкг, имипенем 10 мкг, дорипенем 10 мкг), *аминогликозиды*

(канамицин 30 мкг, тобрамицин 10 мкг, гентамицин 10 мкг, гентамицин 30 мкг, амикацин 30 мкг, нетилмицин 10 мкг, стрептомицин 300 мкг), *хинолоны/фторхинолоны* (налидиксовая кислота 30 мкг, норфлоксацин 10 мкг, офлоксацин 50 мкг, перфлоксацин 5 мкг, ципрофлоксацин 5 мкг, левофлоксацин 5 мкг, моксифлоксацин 5 мкг), *макролиды* (эритромицин 15 мкг, кларитромицин 15 мкг, азитромицин 15 мкг), *тетрациклины* (тетрациклин 30 мкг, доксициклин 30 мкг, миноциклин 30 мкг, тигециклин 15 мкг), *липopeптиды* (колистин 10 мкг, полимиксин 300 ЕД), *гликопептиды* (ванкомицин 5 мкг, тейкопланин 30 мкг), *рифамицины* (рифампицин 5 мкг), *линкозамиды* (клиндамицин 2 мкг), *сульфаниламиды* (триметоприм/сульфаметоксазол 1,25/23,75 мкг), *нитрофураны* (нитрофурантоин 100 мкг), *амфениколы* (хлорамфеникол 30 мкг), *фузидовая кислота* 10 мкг.

### 2.1.6 Е-тесты

При определении чувствительности микроорганизмов методом градиентной диффузии использованы Е-тесты (BioMerieux) 13 наименований: амоксициллин 0,016-256 мг/л, ампициллин 0,016-256 мг/л, цефотаксим 0,016-256 мг/л, цефтазидим 0,016-256 мг/л, имипенем 0,002-32 мг/л, меропенем 0,002-32 мг/л, гентамицин 0,016-256 мг/л, офлоксацин 0,064-1024 мг/л, ципрофлокасин 0,02-32 мг/л, левофлоксацин 0,002-32 мг/л, тетрациклин 0,016-256 мг/л, доксициклин 0,016-256 мг/л, хлорамфеникол 0,016-256 мг/л.

## 2.2 Методы

### 2.2.1 Биотехнологические методы

Гидролиз казеина проводили в титановом гидролиз-аппарате, объемом 1,6 куб. м. Деионизацию солянокислотного гидролизата казеина проводили на колонке ИОК-20/16/200 с использованием смолы ионообменной марки АН-31 (ПАО «Уралхимпласт») по ТУ 22227-344-00203447-99. Высушивание жидких образцов солянокислотного гидролизата казеина проводили на распылительной сушилке ОДВ-25 с испарительной способностью 30,0 кг/ч, с температурой воздуха на входе  $(190 \pm 1)^\circ\text{C}$ , а на выходе –  $(93 \pm 3)^\circ\text{C}$ . Смешивание компонентов питательной среды проводят в лопастном смесителе «Спектр ВЛС-100Н» с вместимостью до 90 кг и мощностью 4,0 кВт.

## **2.2.2 Микробиологические методы**

### **2.2.2.1 Приготовление питательных сред**

Коммерческие питательные среды готовили в соответствии с инструкциями производителей.

Экспериментальные варианты питательных сред готовили путём взвешивания компонентов и растворения их в дистиллированной воде с последующей стерилизацией в автоклаве при температуре  $121^\circ\text{C}$  в течение 15 мин. Затем для культивирования микроорганизмов с обычными питательными потребностями приготовленные питательные среды после автоклавирования охлаждали до температуры от  $45^\circ\text{C}$  до  $50^\circ\text{C}$  и разливали по чашкам Петри (ТУ 64-2-19-79), предварительно установленных на строго горизонтальную поверхность. Для культивирования микроорганизмов со сложными питательными потребностями в охлажденные до температуры от  $45^\circ\text{C}$  до  $50^\circ\text{C}$  питательные среды вносили 5 % лошадиную кровь и 20 мг/л β-НАД и разливали по чашкам Петри. Питательные среды разливали строго по 25 мл на одну чашку Петри диаметром 90 мм, что соответствует толщине слоя  $(4,0 \pm 0,5)$  мм для предотвращения получения ложных результатов

определения чувствительности микроорганизмов к АМП. После заполнения чашки оставляли при комнатной температуре для застывания на  $(21 \pm 3)$  ч. Чашки Петри с питательной средой хранить при температуре  $(4-8)^\circ\text{C}$  не более 7 сут.

#### **2.2.2.2 Показатели качества питательной среды**

Качество питательной среды оценивали по биологическим показателям, которые включают показатель чувствительности питательной среды и скорости роста микроорганизмов, стабильность основных биологических свойств микроорганизмов и показатель чувствительности микроорганизмов к АМП.

Чувствительность питательной среды и скорость роста микроорганизмов определяли как максимальное разведение микроорганизмов, обеспечивающее визуально обнаруживаемый рост колоний искомого штамма через  $(18 \pm 2)$  ч инкубации при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  на всех засеянных чашках. Скорость роста определяли по минимальному времени инкубации посевов, за которое при соответствующем разведении обеспечивалось видимое невооруженным глазом формирование типичных, легко дифференцируемых колоний на чашках Петри с питательной средой [21]. Определение стабильности основных биологических свойств микроорганизмов проводили визуально по характеру роста культуры (форма, структура, диаметр колоний) [21]. Определение показателя чувствительности микроорганизмов к АМП проводили диско-диффузионным методом (см. п. 2.2.3.1).

#### **2.2.3 Методы определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам**

### 2.2.3.1 Диско-диффузионный метод для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

Бактериальную суспензию, используемую для посева тестируемого микроорганизма, готовили методом прямого суспендирования. Для этого стерильной бактериальной петлей с поверхности плотной неселективной питательной среды (среда № 1 ГРМ) отбирали несколько колоний тестируемого микроорганизма, выросших при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  через  $(21 \pm 3)$  ч инкубации, и суспендировали в стерильном изотоническом растворе до плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланда. Затем бактериальную суспензию не позднее 15 мин после ее приготовления наносили на поверхность чашки Петри с питательной средой. Нанесение бактериальной суспензии проводили при помощи стерильного ватного тампона, предварительно погруженного в бактериальную суспензию. Избытки с ватного тампона убирали о стенки пробирки. Наносили бактериальную суспензию на поверхность питательной среды штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на  $60^\circ$ , чтобы добиться сплошного равномерного газона. После посева на поверхность не позднее 15 мин раскладывали диски с АМП и не позднее 15 мин после их нанесения чашки Петри с посевами убирали в термостат.

Культивирование микроорганизмов с обычными питательными потребностями *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *E. aerogenes* осуществляли при температуре  $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(18 \pm 2)$  ч, за исключением штаммов *Photorhabdus* spp.

Штаммы *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* US86, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* US88, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* AU46, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* AU97, *P. asymbiotica* CbKj163, *P. luminescens* subsp. *luminescens* Hb<sup>T</sup> выращивали при  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  и  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(18 \pm 2)$  ч, а

*P. luminescens* subsp. *akhurstii* FRG04 и *P. luminescens* subsp. *laumondii* TT01<sup>T</sup> при тех же температурах, но в течение  $(43 \pm 1)$  ч.

Культивирование микроорганизмов со сложными питательными потребностями *S. pneumoniae*, *H. influenzae* осуществляли при температуре  $(35 \pm 1)$  °C в течение  $(18 \pm 2)$  ч в атмосфере  $(4,0-6,0)$  % диоксида углерода.

После культивирования проводили учет результатов, измеряя зоны полного подавления роста вокруг дисков с АМП с точностью до миллиметра при помощи линейки. Для точного измерения чашку Петри помещали кверху дном с закрытой крышкой на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал под углом 45 ° (учет в отраженном свете).

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, используя интерпретационные таблицы «Целевые и допустимые диапазоны значений МПК и диаметров зон подавления роста контрольных штаммов, рекомендуемых для повседневного контроля качества» [11]. Затем значения, отклоняющиеся от целевого, представляли в следующих оценочных категориях: отклонения от целевых значений не более чем на  $\pm 1$  мм расценивали как незначительные и отмечали как корректные (C); отклонения от целевых значений на  $> 1$  мм, но не более 2 мм как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения отмечали как H (High) или L (Low) соответственно; отклонения от целевых значений более чем на 2 мм, но находящиеся в рамках допустимых значений, расценивали как значительные и отмечали как VH (Very high) при превышении целевых значений или как VL (Very low) при уменьшении целевых значений; отклонения значений диаметров зон подавления роста, выходящие за рамки верхних или нижних допустимых пределов, расценивали как ошибки и отмечали как HE (High error) или как LE (Low error) соответственно.

Для клинических изолятов значения диаметров зон подавления роста и МПК сравнивали с пограничными значениями, указанными в разделе «Пограничные значения МПК и зон подавления роста для определения клинических категорий чувствительности бактерий к антимикробным препаратам» [9] и определяли клинические категории чувствительности. Значения, полученные при тестировании штаммов *Photorhabdus* spp., оценивали в соответствии с таблицами *Enterobacterales* [9]. 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).

Исключением являлись результаты определения чувствительности тест-штамма *S. aureus* ATCC 25922 ко всем АМП и штаммов *A. baumannii* к пиперациллину, пиперациллину/тазобактаму, цефтазидиму, ампициллину/сульбактаму, *P. aeruginosa* к колистину, полимиксину, *E. coli* к налидиксовой кислоте, *K. pneumoniae* к налидиксовой кислоте, миноциклину, *S. aureus* к норфлоксацину, *Enterococcus* spp. к левофлоксацину, тетрациклину, которые интерпретировали в соответствии со стандартом CLSI [57]. Результаты, полученные при тестировании *A. baumannii* к азтреонаму, тигециклину, цефоперазону/сульбактаму, *Enterococcus* spp. к гентамицину, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* к цефоперазону/сульбактаму, оценивали только путём сравнения абсолютных значений с таковыми для контрольных штаммов.

Анализ результатов определения чувствительности клинических изолятов к АМП проводили в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 20776-2–2010 [16]: изделия, применяемые для испытаний антибактериальной чувствительности, считаются пригодными, если показатель согласования категорий клинической чувствительности с референтным методом

превышает 90 %, при этом допустимый процент больших расхождений и очень больших расхождений – менее 3 %.

### **2.2.3.2 Метод градиентной диффузии (метод E-тестов)**

Определение чувствительности микроорганизмов методом E-тестов проводили в соответствии с инструкцией производителя: полоски с E-тестами размещали на поверхность чашки Петри с питательной средой, предварительно засеянной стандартной суспензией тестируемого микроорганизма (методику посева см. в разделе 2.2.3.1).

Через  $(18 \pm 2)$  ч инкубации при температуре  $(35 \pm 1)$  °C на поверхности чашек Петри с питательной средой, засеянной тестируемым микроорганизмом, образовывались зоны подавления роста микроорганизмов в виде эллипса. Подавление роста вокруг полоски наблюдали только в той зоне, где концентрация антибиотика выше МПК. Значение МПК регистрировали на пересечении эллипсовидной зоны подавления роста с краем полоски. Для тест-штаммов микроорганизмов полученные значения МПК сравнивали с допустимым интервалом и целевым значением, а для клинических изолятов значения МПК сравнивали с пограничными значениями, по которым определяли клинические категории чувствительности (S, I, R), используя интерпретационные таблицы стандарта EUCAST [9].

### **2.2.3.3 Carbapenem Inactivation Method (CIM-тест)**

Выявление продукции карбапенемаз проводили методом CIM-тест в соответствии с рекомендациями W. Song и соавт. [112]. Для постановки теста диски, содержащие 10 мкг меропенема, выдерживали в бактериальной суспензии исследуемого штамма, плотность которой соответствовала 0,5 по

стандарту мутности МакФарланда, при температуре 35 °С в течение 2 ч. Обработанные и контрольные (необработанные) диски помещали на поверхность разработанной и контрольной питательной среды – МХА–BBL, со свежесейянным газоном тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 и инкубировали (методику посева и режим инкубирования см. в разделе 2.2.3.1). После инкубации при отсутствии зоны подавления роста тест-штамма фиксировали наличие карбапенемазной активности в исследуемом клиническом штамме (положительный результат), а при наличии зоны подавления роста с диаметром > 20 мм фиксировали отсутствие карбапенемазной активности в исследуемом штамме (отрицательный результат).

#### **2.2.4 Молекулярно-биологические методы**

Определение генов карбапенемаз *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-244</sub>, *bla*<sub>OXA-40-like</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> в геномах изучаемых штаммов микроорганизмов проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в классическом режиме со специфичными праймерами по методике, описанной в публикациях [38, 69, 77].

#### **2.2.5 Физико-химические методы**

##### **2.2.5.1 Физико-химические показатели качества**

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 Валентуу. Исследования проводили в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [21].

Определение сроков годности питательной среды проводили в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред», фармакопейной статьей ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств» и ГОСТ 7636-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки» [21, 28, 31].

#### **2.2.5.2 Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций**

Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций гидролизатов оценивали с использованием высокоэффективной эксклюзионной хроматографии на колонке BioSep-SEC-S 2000 (7,8 мм × 300 мм) Phenomenex (Торранс), установленной в хроматографическое устройство ProStar HPLC (Varian Inc) по методике, описанной в статье [72].

#### **2.2.5.3 Элементный состав**

Элементный состав гидролизатов и питательных сред определяли методами масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (МС-ИСП) и атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП) [3]. Анализ проб проводили на масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой X Series 2 (Thermo Scientific) и атомно-эмиссионном спектрометре iCAP6500 Duo (Thermo Scientific).

#### **2.2.5.4 Содержание общих и свободных аминокислот**

В сухих образцах гидролизатов казеина определяли содержание общих и свободных аминокислот с использованием набора для дериватизации AccQ•Tag Ultra по методу Waters AccQ•Tag<sup>TM</sup> [123]. Определяли 16

наименований аминокислот: аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, валин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, пролин, серин, тирозин, треонин, фенилаланин.

### **2.2.6 Клинические испытания питательной среды**

Исследования питательной среды с использованием образцов клинического материала проводили на базе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Ярославской области «Инфекционная клиническая больница №1» (ГУЗ ЯО ИКБ №1) в рамках Соглашения о научно-техническом сотрудничестве между ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» и ГУЗ ЯО ИКБ №1 от 06.06.2016 г.

Клинические изоляты выделены в бактериологической лаборатории во время проведения испытаний из биологического материала, полученного от госпитализированных в ГУЗ ЯО ИКБ №1 пациентов в следующие отделения: отделение реанимации и интенсивной терапии, инфекционное отделение №1, инфекционное отделение №3 и отделение патологии новорожденных и недоношенных детей областного перинатального центра.

В направлении указаны вид клинического материала, предварительный диагноз и цель исследования: выделение возбудителя инфекции и определение его чувствительности к определенным АМП. Перечень АМП определен в зависимости от вида и рода изолята, с учетом рекомендаций специальной справочной литературы для врачей-бактериологов, а также с учетом регионального спектра устойчивости выделяемых возбудителей инфекционных болезней. Посевы изолятов и контрольных тест-штаммов проводили сотрудники ГУЗ ЯО ИКБ №1 на разработанную питательную среду и контрольную МХА-Bio-Rad. Для посева использовали стерильные вискозные и стерильные хлопковые тампоны «ГЕМ» РУ № ФСЗ 2011/09223.

Посев и учет результатов проводили в соответствии со стандартом EUCAST версия 6.0 (2016 г.) [9] (методику посева см. в разделе 2.2.3.1).

Материалы, использованные в работе, не содержали персональных данных пациентов, так как полученные от них клинические изоляты промаркированы без указания фамилии, даты рождения, адреса проживания, номера истории болезни, личных документов и других именных материалов. В соответствии с требованиями биоэтического комитета РФ, каждый пациент при поступлении в клинику заключал договор с лечебным учреждением, содержащий согласие на проведение лечения и лабораторного обследования.

### **2.2.7 Статистические методы**

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Глава 3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА СОЛЯНОКИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗАТА КАЗЕИНА

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

Суммируя требования международных стандартов, питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к АМП должна удовлетворять следующим критериям:

1. иметь сбалансированное содержание ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  для получения достоверных результатов определения чувствительности микроорганизмов к АМП:

а. концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , влияет на результаты определения чувствительности микроорганизмов к аминогликозидам, фторхинолонам и тетрациклину. Об их сбалансированном содержании в составе питательной можно косвенно судить по значению диаметра зоны подавления роста тест-штамма *P. aeruginosa* WDCM 00025 (ATCC 27853) вокруг диска с гентамицином (10 мкг), которое должно находиться в диапазоне от 17 мм до 23 мм [58];

б. концентрация ионов  $\text{Mn}^{2+}$  должна быть ниже 8,0 мг/л, чтобы избежать интерпретации результатов как ложно устойчивые к новому классу антибиотиков – глицилциклинам, к которым относится тигециклин [58, 76, 79, 119, 121];

в. концентрация ионов  $\text{Zn}^{2+}$  должна быть ниже 3,0 мг/л, чтобы избежать интерпретации результатов как ложно устойчивые к карбапенемам [58, 61, 65];

2. иметь концентрацию тимидина менее 0,03 мг/л, так как присутствие тимидина в питательной среде оказывает влияние на результаты чувствительности микроорганизмов к сульфаниламидным препаратам [8, 24, 25, 57, 58, 83, 115];

3. иметь значение pH, укладывающееся в интервал от 7,2 до 7,4, поскольку активность некоторых АМП, например, тетрациклина, ампициллина, карбенициллина, тобрамицина и др. зависит от величины pH [8, 57, 24, 67, 58].

В работе готовили экспериментальные образцы агара Мюллера-Хинтон [58] следующего состава: кислотный гидролизат казеина (17,5 г/л), мясной экстракт (2,0 г/л), крахмал (1,5 г/л) и агар бактериологический, концентрация которого варьировалась в зависимости от прочности –  $(14,5 \pm 2,5)$  г/л.

Для приготовления экспериментальных образцов использовали:

- шесть образцов гидролизатов: кислотный гидролизат казеина Оболенск (ГК-Оболенск), кислотный гидролизат казеина технический HiMedia (ГК-НМ), кислотный гидролизат казеина технический (ГК-Merck), кислотный гидролизат казеина с пониженным содержанием хлорида натрия (ГК-НМ2); кислотный гидролизат казеина для коклюшной вакцины (ГК-НМ3) и казаминовые кислоты технические Becton Dickinson (КК-BD);

- два образца крахмала растворимого: крахмал-Химприбор и крахмал-Acros;

- два образца мясных экстрактов: мясной экстракт Pronadisa и мясной экстракт HiMedia;

- четыре образца агара бактериологического: бактериологический агар европейского Becton Dickinson BBL (BD BBL), Becton Dickinson Difco (BD Difco), Conda Pronadisa, HiMedia (НМ).

Образцы крахмала, мясного экстракта, агара бактериологического, представленные разными фирмами-производителями, незначительно

различались между собой и имели следующие физико-химические показатели:

- значение pH агаров варьировалось от 7,4 до 7,5;
- значение pH обоих образцов мясного экстракта составляло 6,8;
- значение pH крахмалов – 6,0;
- прочность студня агаров составляла от 490 г до 560 г по Валенту;
- содержание аминного азота в обоих образцах мясного экстракта составляло 4,2 %;
- содержание хлор-ионов в мясном экстракте фирмы-производителя Pronadisa составляло 1,6 %, а в мясном экстракте HiMedia – 1,5 %.

Физико-химические показатели качества гидролизатов представлены в табл. 3.1.

Таблица 3.1 – Физико-химические показатели качества гидролизатов казеина

| Гидролизаты казеина                            | pH   | Степень гидролиза, % | Содержание аминного азота, % | Содержание хлор-ионов, % |
|------------------------------------------------|------|----------------------|------------------------------|--------------------------|
| Кислотный гидролизат казеина ГК-Оболensk       | 6,3  | 70,0                 | 5,9                          | 8,0                      |
| Кислотный гидролизат казеина технический ГК-НМ | 6,85 | 79,0                 | 5,1                          | 20,2                     |
| Казеиновый гидролизат Технический (ГК-Merck)   | 6,6  | 72,0                 | 5,2                          | 19,2                     |
| Казаминовые кислоты технические КК-BD          | 6,7  | 74,0                 | 6,0                          | 20,7                     |
| Кислотный гидролизат казеина ГК-НМ2            | 6,2  | 73,0                 | 8,6                          | 0,01                     |
| Кислотный гидролизат казеина ГК-НМ3            | 6,2  | 70,9                 | 8,2                          | 0,3                      |

Как видно из табл. 3.1, значение pH и степень гидролиза во всех исследуемых образцах отличалась незначительно: значение pH варьировалось от 6,2 до 6,85, а степень гидролиза – от 70,0 % до 79,0 %. По содержанию аминного азота из всех исследуемых образцов отличались ГК-НМ2 и ГК-НМ3, для которых этот показатель был в 1,5 раза выше. По содержанию хлор-ионов отличались образцы ГК-Оболенск, ГК-НМ2 и ГК-НМ3. Так, по сравнению с образцами ГК-НМ, ГК-Merck и КК-BD у образца ГК-Оболенск содержание хлор-ионов было меньше в 2,5 раза, у ГК-НМ2 – в 2000 раз, а у ГК-НМ3 – в 70 раз.

Из перечисленных компонентов приготовлены и исследованы 96 экспериментальных варианта питательной среды. Варианты отличались между собой различными комбинациями перечисленных компонентов. Во всех экспериментальных вариантах значение pH составляло от 6,7 до 6,8, что не соответствовало требуемому интервалу от 7,2 до 7,4. Корректирование значения pH экспериментальных вариантов проводили различными способами. Для этих целей применяли гидрокарбонат натрия ( $\text{NaHCO}_3$ ), гидрофосфат калия ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) и гидроксид натрия ( $\text{NaOH}$ ).

Использование  $\text{NaHCO}_3$  и  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  приводило к образованию осадка в экспериментальных вариантах питательной среды, и эти варианты не использовали в дальнейшей работе.

При использовании  $\text{NaOH}$  осадок отсутствовал, а значение pH экспериментальных вариантов питательной среды соответствовало требуемому интервалу до и после автоклавирования.

Исследование биологических свойств экспериментальных вариантов питательной среды, нейтрализованных  $\text{NaOH}$ , показало, что показатель чувствительности среды и скорости роста микроорганизмов, а также показатель стабильности основных биологических свойств практически не отличались от тех же показателей на контрольной питательной среде – МХА-BBL.

Для определения биологических показателей качества экспериментальных вариантов использовали тест-штаммы микроорганизмов, которые в комбинациях с соответствующими АМП, являются маркерами качества питательной среды по содержанию ионов двухвалентных металлов, тимидина и значению pH питательной среды: *P. aeruginosa* ATCC 27853 и гентамицин являются маркерами содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ; *E. coli* ATCC 25922 и цефепим, а также *S. aureus* ATCC 29213 и эритромицин являются маркерами уровня ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ; *S. aureus* ATCC 29213 и тетрациклин, а также *P. aeruginosa* ATCC 27853 и левофлоксацин – уровня ионов  $\text{Mg}^{2+}$ ; *E. coli* ATCC 25922 и тигециклин – уровня ионов  $\text{Mn}^{2+}$ ; *P. aeruginosa* ATCC 27853 и имипенем – уровня ионов  $\text{Zn}^{2+}$ ; а *E. faecalis* ATCC 29212 и триметоприм/сульфаметоксазол – уровня тимидина. Изменение значения pH питательной среды оказывает влияние на результаты тестирования *S. aureus* ATCC 29213 и тетрациклина.

Анализ результатов показал, что значения диаметров зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов вокруг дисков с АМП на экспериментальных вариантах, не укладывались в допустимые диапазоны значений. Причем происхождение крахмала, мясного экстракта и агара бактериологического практически не оказывало влияния на результаты тестирования. Только на 24 из 96 экспериментальных вариантов, отличающихся входящими в состав гидролизатами казеина, получили различающиеся результаты.

Так, на всех экспериментальных вариантах питательной среды значения диаметров зон подавления роста при тестировании *E. coli* ATCC 25922 и тигециклина, *S. aureus* ATCC 29213 и тетрациклина, а *P. aeruginosa* ATCC 27853 и гентамицина, левофлоксацина, имипенема выходили за рамки нижних допустимых значений, а также отмечено полное отсутствие зон подавления роста при тестировании *E. faecalis* ATCC 29212 и триметоприма/сульфаметоксазола. Полученные результаты

свидетельствовали об избыточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и тимидина в тестируемых вариантах, что подтвердил анализ элементного состава исследуемых экспериментальных вариантов и контрольной питательной среды MXA-BBL (табл. 3.2).

Таблица 3.2 – Элементный состав экспериментальных вариантов питательной среды и контрольной питательной среды

| Питательные среды                                                                                  | $\text{Ca}^{2+}$ , мг/л | $\text{Mg}^{2+}$ , мг/л | $\text{Mn}^{2+}$ , мг/л | $\text{Zn}^{2+}$ , мг/л |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Питательная среда, приготовленная на основе кислотного гидролизата казеина (ГК-Оболенск)           | 36,0                    | 20,8                    | 8,7                     | 4,1                     |
| Питательная среда, приготовленная на основе кислотного гидролизата казеина технического (ГК-НМ)    | 41,0                    | 25,0                    | 11,0                    | 3,5                     |
| Питательная среда, приготовленная на основе кислотного гидролизата казеина технического (ГК-Merck) | 35,0                    | 22,5                    | 9,9                     | 4,9                     |
| Питательная среда, приготовленная на основе казаминовых кислот технических (КК-BD)                 | 39,0                    | 28,0                    | 9,0                     | 5,5                     |
| Питательная среда, приготовленная на основе кислотного гидролизата казеина (ГК-НМ2)                | 43,0                    | 21,8                    | 10,1                    | 5,1                     |
| Питательная среда, приготовленная на основе кислотного гидролизата казеина (ГК-НМ3)                | 40,5                    | 26,0                    | 8,9                     | 6,0                     |
| Агар Мюллера-Хинтон (BBL) – контрольная питательная среда                                          | 22,1                    | 12,0                    | 0,02                    | 1,18                    |

Как видно из табл. 3.2, элементный состав всех экспериментальных вариантов отличался от элементного состава контрольной питательной среды, что послужило поводом для оценки элементного состава каждого компонента, входящего в состав экспериментальных вариантов. В табл. 3.3

представлен элементный анализ крахмалов растворимых, мясных экстрактов и агаров бактериологических, а в табл. 3.4 – гидролизатов казеина.

Таблица 3.3 – Элементный состав крахмалов растворимых, мясных экстрактов и агаров бактериологических, входящих в состав экспериментальных вариантов питательной среды

| Компоненты питательной среды            | Ca <sup>2+</sup> ,<br>мг/г | Mg <sup>2+</sup> ,<br>мг/г | Mn <sup>2+</sup> ,<br>мг/г | Zn <sup>2+</sup> ,<br>мг/г |
|-----------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Крахмал-Химприбор                       | 0,008                      | 0,007                      | 0,001                      | 0,001                      |
| Крахмал-Acros                           | 0,009                      | 0,005                      | 0,001                      | 0,002                      |
| Мясной экстракт Pronadisa               | 0,3                        | 0,4                        | 0,002                      | 0,07                       |
| Мясной экстракт HiMedia                 | 0,4                        | 0,6                        | 0,003                      | 0,06                       |
| Агар бактериологический BD BBL          | 0,06                       | 0,015                      | 5×10 <sup>-5</sup>         | 0,002                      |
| Агар бактериологический BD Difco        | 0,04                       | 0,02                       | 4×10 <sup>-5</sup>         | 0,004                      |
| Агар бактериологический Conda Pronadisa | 0,05                       | 0,01                       | 7×10 <sup>-5</sup>         | 0,003                      |
| Агар бактериологический НМ              | 0,03                       | 0,017                      | 5×10 <sup>-5</sup>         | 0,0015                     |

Как видно из табл. 3.3, во всех исследуемых образцах, не зависимо от их происхождения, содержатся незначительные количества ионов Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup>.

В табл. 3.4 приведен элементный состав гидролизатов казеина и расчётная концентрация ионов двухвалентных металлов в казеиновых кислотах технических, входящих в состав контрольной питательной среды. Расчётные концентрации определяли, исходя из элементного состава контрольной питательной среды, пренебрегая остальными компонентами.

Таблица 3.4 – Элементный состав кислотных гидролизатов казеина, входящих в состав экспериментальных вариантов питательной среды

| Гидролизаты казеина | Ca <sup>2+</sup> ,<br>мг/г | Mg <sup>2+</sup> ,<br>мг/г | Mn <sup>2+</sup> ,<br>мг/г | Zn <sup>2+</sup> ,<br>мг/г |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1                   | 2                          | 3                          | 4                          | 5                          |

Продолжение табл. 3.4

| 1                                                        | 2   | 3    | 4          | 5    |
|----------------------------------------------------------|-----|------|------------|------|
| Кислотный гидролизат казеина (ГК-Оболенск)               | 1,8 | 1,0  | 0,46       | 0,29 |
| Кислотный гидролизат казеина технический (ГК-НМ)         | 2,0 | 1,1  | 0,72       | 0,31 |
| Кислотный гидролизат казеина технический (ГК-Merck)      | 2,1 | 1,2  | 0,45       | 0,41 |
| Казаминовые кислоты технические BD                       | 1,9 | 1,3  | 0,50       | 0,36 |
| Кислотный гидролизат казеина ГК-НМ2                      | 2,0 | 1,35 | 0,78       | 0,28 |
| Кислотный гидролизат казеина ГК-НМ3                      | 2,5 | 1,0  | 0,59       | 0,48 |
| Казаминовые кислоты технические (расчетная концентрация) | 1,2 | 0,6  | <0,00<br>1 | 0,03 |

Как видно из табл. 3.4, содержание ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  во всех исследованных коммерческих гидролизатах казеина превышало расчётное содержание тех же ионов в казаминовых кислотах технических.

Проведённые исследования показали, что питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к АМП не может быть изготовлена из коммерческих гидролизатов казеина из-за несбалансированного содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , тимидина и некорректного значения pH. Полученные результаты послужили поводом для разработки технологии производства солянокислотного гидролизата казеина с определёнными физико-химическими показателями, сбалансированным содержанием ионов двухвалентных металлов и тимидина с целью использования его в качестве основы питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к АМП.

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

На основании требований стандартов EUCAST [8] и ISO/TS 16782:2016 [58] к качеству питательной среды, используемой для определения чувствительности микроорганизмов к АМП, были сформулированы требования к качеству солянокислотного гидролизата казеина (СГК):

- в СГК концентрация хлор-ионов должна соответствовать концентрациям в технических гидролизатах казеина (от 18 % до 24,0 %) (см. табл. 3.1);

- 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;

- 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;

- значение pH СГК должно обеспечивать получение питательной среды с pH 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.

В результате проведенного гидролиза был получен гидролизат со следующими характеристиками: значение pH 0,2-0,4, содержание аминного азота от 7,0 % до 8,0 %, а содержание хлор-ионов – от 57,0 % до 61,0 %.

### **3.2.1 Получение солянокислотного гидролизата казеина с требуемым содержанием хлор-ионов**

В ходе исследований отработаны условия деионизации и изучено влияние режима деионизации на качество разрабатываемого СГК. Для этого деионизацию проводили до значения pH 5,0 с шагом 0,5. Как показали результаты исследований, для получения СГК с содержанием хлор-ионов от 18,0 % до 24,0 %, процесс деионизации необходимо проводить до значения pH от 3,5 до 4,5 (табл. 3.5).

Таблица 3.5 – Влияние режима деионизации солянокислотного гидролизата казеина на содержание хлор-ионов

| Содержание хлор-ионов, % | pH <sub>исх</sub> 0,2 | pH 1,5 | pH 2,0 | pH 3,0 | pH 3,5 | pH 4,5 | pH 5,0 |
|--------------------------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                          | 60±2                  | 41±3   | 35±2   | 29±2   | 22±1   | 20±2   | 14± 3  |

Как видно из табл. 3.5, в процессе деионизации содержание хлор-ионов в СГК при значении pH 4,5 снижается примерно в три раза с  $(60,0 \pm 2,0)$  % до  $(20,0 \pm 2,0)$  % и приближается к концентрации хлор-ионов в кислотных гидролизатах казеина технических (табл. 3.1).

### **3.2.2 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 pH. Для максимального извлечения тимидина определяли оптимальные значения

pH при проведении деионизации до pH от 1,6 до 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 показатель pH до значения от 7,3 до 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 определяли чувствительность *E. faecalis* ATCC 29212 к триметоприму/сульфаметоксазолу. Затем сравнивали полученные значения диаметров зон подавления роста с допустимыми (табл. 3.6).

Таблица 3.6 – Влияние значений pH при обработке солянокислотного гидролизата казеина активированным углем на величину диаметров зон подавления роста *E. faecalis* ATCC 29212 вокруг диска с триметопримом/сульфаметоксазолом

| Питательные среды                                                   | Разрабатываемая питательная среда<br>на основе СГК деионизованного до pH |      |      |      |      |      |      |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                                                                     | 1,6                                                                      | 1,7  | 1,8  | 1,9  | 2,0  | 2,1  | 2,2  |
| Диаметры зон<br>подавления роста, мм                                | 24±1                                                                     | 25±1 | 26±1 | 29±1 | 30±1 | 26±1 | 25±1 |
| Диаметры зон<br>подавления роста на<br>МХА-BBL, мм                  | 30±1                                                                     |      |      |      |      |      |      |
| Допустимый диапазон значений– (26-32), мм. Целевое значение – 30 мм |                                                                          |      |      |      |      |      |      |

Как видно из табл. 3.6, оптимальный интервал значений pH при проведении деионизации СГК составил от 1,9 до 2,0, так как только при использовании данного СГК в составе питательной среды были получены диаметры зон подавления роста, находящиеся в близком к целевому значению диапазоне (от 28 мм до 31 мм). При использовании СГК, деионизованного до pH ниже 1,6 и выше 2,2, диаметры зон подавления роста заметно снижались и выходили за пределы допустимого интервала. Таким

образом, для получения СГК с содержанием тимидина менее 0,001 мг/г деионизацию СГК необходимо проводить до значения рН от 1,9 до 2,0.

Таким образом, для получения СГК с оптимальным содержанием хлор-ионов и содержанием тимидина менее 0,001 мг/г деионизацию необходимо проводить в два этапа. На первом этапе до рН от 1,9 до 2,0, с последующей обработкой активированным углем и фильтрацией, а на втором этапе – до рН от 3,5 до 4,5.

Исходя из оптимальной концентрации тимидина в СГК менее 0,001 мг/г, использование которого в составе питательной среды обеспечивает получение достоверных результатов определения чувствительности микроорганизмов к сульфаниламидным препаратам, рассчитана оптимальная концентрация тимидина в питательной среде – менее 0,03 мг/л.

### **3.2.3 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 рН от 7,5 до 10,0 нерастворимые или малорастворимые в воде гидроксиды, а практически нерастворимый в воде гидроксид цинка образуется при рН от 10,0 до 12,5 [35], поэтому в работе сначала проводили осаждение данных ионов в виде гидроксидов, а затем, при необходимости, вносили их расчетное количество в виде солей.

#### **3.2.3.1 Осаждение ионов $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ и $\text{Mn}^{2+}$**

Для осаждения ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  изменяли значение рН СГК от 7,5 до 10,0 с шагом 0,1 с помощью концентрированного раствора NaOH. Затем каждую пробу нагревали до температуры  $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ , выдерживали в течение  $(2,0 \pm 0,5)$  мин до выпадения нерастворимого осадка, который затем

отфильтровывали, и устанавливали значение pH каждой пробы СГК в диапазоне от 7,3 до 7,5 с помощью концентрированного раствора HCl.

Для оценки эффективности осаждения готовили экспериментальные варианты питательной среды, 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 (табл. 3.7) – для оценки эффективности осаждения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  – и *E. coli* ATCC 25922 вокруг диска с тигециклином (табл. 3.8.) – для оценки эффективности осаждения ионов  $\text{Mn}^{2+}$ .

В табл. 3.7 приведены значения диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг гентамицина, полученные на экспериментальных вариантах, приготовленных на основе СГК, обработанного в диапазоне pH от 8,2 до 9,3, так как при значениях pH выше и ниже отмеченного интервала, изменений в значениях диаметров не отмечено.

Таблица 3.7 – Значения диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг диска с гентамицином, полученных на экспериментальных вариантах

| Показатель                                   | Разрабатываемая питательная среда на основе СГК, обработанного при pH |         |         |         |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|
|                                              | 8,2-8,4                                                               | 8,5-8,7 | 8,8-9,0 | 9,1-9,3 |
| Диаметры зон подавления роста, мм            | 15±2                                                                  | 24±1    | 25±1    | 15±1    |
| Диаметры зон подавления роста на МХА-BBL, мм | 20±1                                                                  |         |         |         |
| Требования нормативных документов            | Допустимый диапазон значений – (17-23) мм, целевое значение – 20 мм   |         |         |         |

Как видно из табл. 3.7, увеличение значений диаметров зон подавления роста тест-штамма вокруг диска с гентамицином отмечено для вариантов питательной среды, содержащих СГК, которые обрабатывали при значениях

pH от 8,5 до 9,0. Проведенные результаты, вероятнее всего, свидетельствуют об освобождении СГК от ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  в данном диапазоне pH.

Таблица 3.8 – Значения диаметров зон подавления роста *E. coli* ATCC 25922 вокруг диска с тигециклином, полученных на экспериментальных вариантах

| Показатель                                   | Разрабатываемая питательная среда на основе СГК, обработанного при pH |         |         |         |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|
|                                              | 8,2-8,4                                                               | 8,5-8,7 | 8,8-9,0 | 9,1-9,3 |
| Диаметры зон подавления роста, мм            | 18±2                                                                  | 23±1    | 24±1    | 19±1    |
| Диаметры зон подавления роста на МХА-BBL, мм | 24±1                                                                  |         |         |         |
| Требования нормативных документов, мм        | Допустимый диапазон – 20-27,<br>Целевое значение – 24                 |         |         |         |

Как видно из табл. 3.8, значения диаметров зон подавления роста *E. coli* ATCC 25922 вокруг диска с тигециклином близки к целевым значениям или отличались от них на ±1 мм на экспериментальных вариантах питательной среды, в состав которых входит СГК, обработанный в диапазоне pH от 8,5 до 9,0. При использовании СГК, обработанного при pH ниже 8,2 и выше 9,3, диаметры зон подавления роста тест-штамма заметно снижались и не соответствовали допустимому интервалу.

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).

### 3.2.3.2 Осаждение ионов $\text{Zn}^{2+}$

Осаждение проводили при изменении значений pH СГК в интервале от 10,0 до 12,5 с шагом 0,1 с помощью концентрированного раствора NaOH. Затем каждую пробу нагревали до температуры (100±1) °С, выдерживали в течение (2,0±0,5) мин до выпадения нерастворимого осадка, который затем

отфильтровывали, и устанавливали значение pH в диапазоне от 7,3 до 7,5 с помощью концентрированного раствора HCl. Эффективность осаждения оценивали по изменению значения диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг дисков с имипенемом на экспериментальных вариантах питательной среды (табл. 3.9).

Таблица 3.9 – Значения диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг диска с имипенемом, полученных на экспериментальных вариантах

| Показатель                               | Разрабатываемая питательная среда<br>на основе СГК, обработанного при pH |               |               |               |               |               |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                                          | 10,7-<br>10,9                                                            | 11,0-<br>11,2 | 11,3-<br>11,5 | 11,6-<br>11,7 | 11,8-<br>12,0 | 12,1-<br>12,3 |
| Диаметры зон подавления<br>роста, мм     | 19±1                                                                     | 22±1          | 24±1          | 24±1          | 24±1          | 19±1          |
| Требования нормативных<br>документов, мм | Допустимый диапазон значений – 20-28<br>Целевое значение – 24            |               |               |               |               |               |

Как видно из табл. 3.9, значения диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг диска с имипенемом соответствуют допустимому диапазону на вариантах питательной среды с использованием СГК, обработанного в интервале pH от 11,0 до 12,0. При использовании экспериментальных образцов СГК, обработанных при pH ниже 11,0 и выше 12,0, диаметры зон заметно снижались и не соответствовали допустимому интервалу. Анализ элементного состава показал, что концентрация ионов  $Zn^{2+}$  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  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  и  $Mn^{+2}$ : до  $(0,23 \pm 0,02)$  мг/г,  $(0,09 \pm 0,001)$  мг/г и  $(0,02 \pm 0,005)$  мг/г, соответственно (табл. 3.11).

Значения диаметров зон подавления роста 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 от 8,5 до 9,0 и от 11,0 до 12,0, 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  $Zn^{2+}$ .

### 3.2.3.3 Определение требований к содержанию ионов $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Mn^{2+}$ и $Zn^{2+}$ в солянокислотном гидролизате казеина

Определение оптимального содержания данных ионов проводили путем приготовления экспериментальных вариантов питательной среды, в состав которых входили образцы СГК, обогащенных 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.

На экспериментальных вариантах тестировали пары тест-штамм–АМП: *P. aeruginosa* ATCC 27853–гентамицин, *E. coli* ATCC 25922–тигециклин, *P. aeruginosa* ATCC 27853–имипенем. Затем, по значениям диаметров зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов вокруг дисков с АМП выбирали варианты, на которых полученные значения соответствовали допустимым. Концентрации ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  в выбранных вариантах питательных сред определяли как оптимальные.

Оптимальные концентрации ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  составили (20,0–25,0) мг/л и (10,0–12,5) мг/л, соответственно. Использование питательной

среды с выбранными концентрациями обеспечивало получение значений диаметров зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов вокруг АМП, соответствующих требованиям стандарта EUCAST и ISO/TS 16782:2016 «Clinical laboratory testing – Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller-Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing».

Допустимая концентрация ионов  $Mn^{2+}$  в питательной среде соответствовала требованиям ISO/TS 16782:2016 и не превышала 8,0 мг/л.

В ходе исследований показано, что допустимая концентрация ионов  $Zn^{2+}$  в разрабатываемой питательной среде для получения значений диаметров зон подавления роста пар тест-штамм–АМП, укладывающихся в допустимый интервал, не должна превышать 1,0 мг/л. Полученная оптимальная концентрация ионов  $Zn^{2+}$  отличалась от требований ISO/TS 16782:2016 (не более 3,0 мг/л).

Исходя из оптимальных концентраций ионов двухвалентных металлов в разрабатываемой питательной среде рассчитаны их концентрации в СГК: концентрация ионов  $Ca^{2+}$  должна находиться в интервале (1,15–1,45) мг/г,  $Mg^{2+}$  – (0,6–0,7) мг/г,  $Mn^{2+}$  должна быть не более 0,5 мг/г, а  $Zn^{2+}$  – не более 0,06 мг/г.

### **3.2.4 Получение солянокислотного гидролизата казеина с определенным значением pH**

В работе изучали зависимость pH СГК на изменение значения pH готовой питательной среды и установили, что значение pH сухого СГК должно соответствовать интервалу от 7,3 до 7,5.

### 3.3 Технологическая схема производства солянокислотного гидролизата казеина

Суммируя вышеизложенные этапы, разработана технологическая схема производства СГК, которая представлена на рис. 3.1.

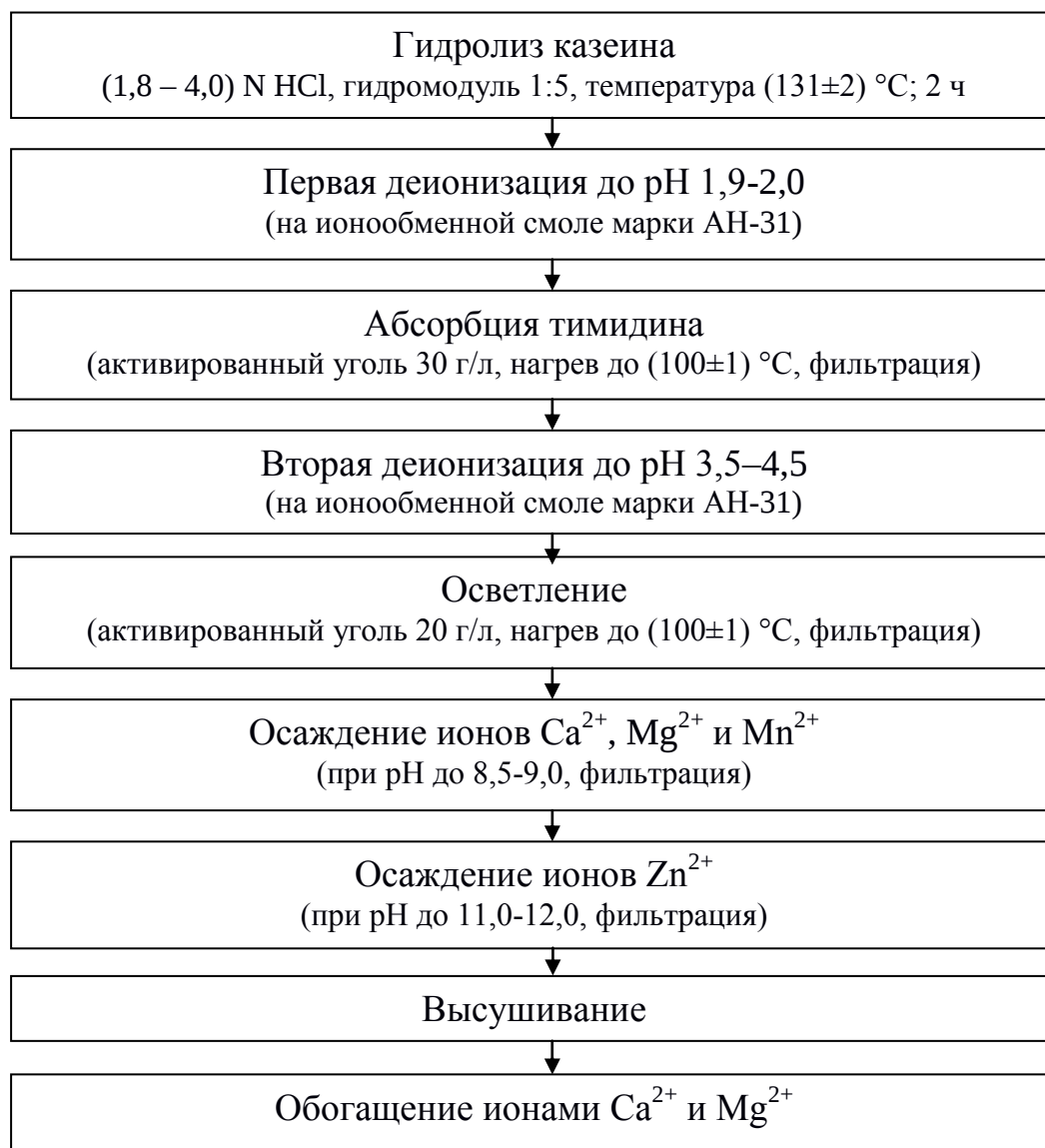


Рисунок 3.1 – Технологическая схема производства СГК

Описание технологической схемы производства СГК:

- на первой стадии проводят гидролиз казеина с помощью соляной кислоты с концентрацией от 1,8 N до 4,0 N при гидромодуле 1:5 и температуре (131±2) °C в течение 2 ч;
- на второй стадии проводят первую деионизацию до pH 1,9-2,0 на анионообменной смоле марки АН-31;

- на третьей стадии проводят абсорбцию тимидина путем добавления активированного угля в количестве 30,0 г/л и нагревания до  $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ , с последующим выдерживанием в течение 15 мин, охлаждением до  $(30 \pm 10)^\circ\text{C}$  и фильтрацией;
- на четвёртой стадии проводят вторую деионизацию до значения pH от 3,5 до 4,5 на анионообменной смоле марки АН-31 для снижения содержания хлор-ионов;
- на пятой стадии проводят осветление СГК, добавляя 20,0 г/л активированного угля, нагревая до  $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ , выдерживая в течение 15 мин, охлаждая до  $(30 \pm 10)^\circ\text{C}$  и фильтруя;
- на шестой стадии проводят осаждение ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ , корректируя значение pH СГК от 8,5 до 9,0 при помощи концентрированного раствора гидроксида натрия. Затем гидролизат нагревают до  $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ , выдерживают в течение  $(2,0 \pm 0,5)$  мин и фильтруют;
- на седьмой стадии проводят осаждение ионов  $\text{Zn}^{2+}$  по схеме, описанной на шестой стадии, но при значении pH от 11,0 до 12,0;
- на восьмой стадии проводят высушивание СГК на распылительной сушильной установке;
- на девятой стадии проводят обогащение СГК ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  – в смесителе смешивают СГК с расчетным количеством сухих навесок глюконата кальция и хлорида магния.

В табл. 3.10 приведены физико-химические показатели СГК на каждой стадии его получения.

Таблица 3.10 – Физико-химические показатели качества солянокислотного гидролизата казеина на каждой стадии его получения

| Изменение физико-химических показателей SGK                                                                                         | Стадии производства |                                         |                                 |                                                                       |                                 |           |                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                     | Гидролиз            | Первая деионизация + абсорбция тимидина | Вторая деионизация + осветление | Удаление ионов $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ и $\text{Mn}^{2+}$ | Удаление ионов $\text{Zn}^{2+}$ | Сушка     | Обогащение SGK ионами $\text{Ca}^{2+}$ и $\text{Mg}^{2+}$ |
| pH                                                                                                                                  | 0,2–0,4             | 1,9–2,0                                 | 3,5–4,5                         | 8,5–9,0                                                               | 11,0–12,0                       | 7,3–7,5   | 7,3–7,5                                                   |
| Аминный азот*, %                                                                                                                    | 7,0–8,0             | 5,9–6,9                                 | 5,5–6,8                         | 5,2–6,7                                                               | 4,9–6,6                         | 4,5–6,5   | 4,5–6,5                                                   |
| Хлор-ионы*, %                                                                                                                       | 57,0–61,0           | 30,0–37,0                               | 17,0–21,0                       | 18,0–22,0                                                             | 18,0–24,0                       | 18,0–24,0 | 18,0–24,0                                                 |
| Примечание – Содержание аминного азота и хлор-ионов для всех этапов, кроме этапа «Сушка», представлены в пересчете на сухой остаток |                     |                                         |                                 |                                                                       |                                 |           |                                                           |

Как видно из табл. 3.10, в результате двухстадийной деионизации в разработанном SGK удалось снизить содержание хлор-ионов с  $(59,0 \pm 2,0)$  % на первой стадии гидролиза до  $(19,0 \pm 2,0)$  % после второй деионизации. Изменение элементного состава SGK представлено в табл. 3.11.

Таблица 3.11 – Изменение элементного состава солянокислотного гидролизата казеина на каждой стадии производства

| Стадии производства                                                   | $\text{Ca}^{2+}$ , мг/г | $\text{Mg}^{2+}$ , мг/г | $\text{Mn}^{2+}$ , мг/г | $\text{Zn}^{2+}$ , мг/г |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Гидролиз                                                              | $196 \pm 3,0$           | $19,1 \pm 2,0$          | $2,43 \pm 0,2$          | $5,1 \pm 0,5$           |
| Первая деионизация                                                    | $45,8 \pm 1,5$          | $3,9 \pm 0,5$           | $1,92 \pm 0,05$         | $3,29 \pm 0,3$          |
| Абсорбция тимидина                                                    | $43,8 \pm 2,0$          | $3,8 \pm 0,5$           | $1,79 \pm 0,02$         | $2,12 \pm 0,3$          |
| Вторая деионизация                                                    | $42,9 \pm 2,0$          | $3,5 \pm 0,7$           | $1,50 \pm 0,02$         | $1,19 \pm 0,3$          |
| Осветление                                                            | $41,9 \pm 3,0$          | $2,8 \pm 0,8$           | $1,32 \pm 0,01$         | $1,16 \pm 0,2$          |
| Удаление ионов $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ и $\text{Mn}^{2+}$ | $4,9 \pm 0,5$           | $0,75 \pm 0,2$          | $0,025 \pm 0,005$       | $1,15 \pm 0,2$          |
| Удаление ионов $\text{Zn}^{2+}$                                       | $0,23 \pm 0,02$         | $0,09 \pm 0,001$        | $0,02 \pm 0,005$        | $0,03 \pm 0,005$        |
| Сушка                                                                 | $0,23 \pm 0,01$         | $0,08 \pm 0,001$        | $0,01 \pm 0,005$        | $0,03 \pm 0,005$        |
| Обогащение ионами $\text{Ca}^{2+}$ и $\text{Mg}^{2+}$                 | $1,3 \pm 0,15$          | $0,65 \pm 0,05$         | $0,01 \pm 0,005$        | $0,02 \pm 0,005$        |

Как видно из табл. 3.11, в результате обработки в СГК отмечено снижение концентраций ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ . После стадии «Сушка» СГК обогащают растворимыми солями  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  для получения питательной среды с оптимальным содержанием ионов двухвалентных металлов.

### **3.4 Характеристики солянокислотного гидролизата казеина**

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

#### **3.4.1 Физико-химические свойства**

Все наработанные серии представляли собой сухой однородный мелкодисперсный порошок от светло-желтого до желтого цвета, хорошо растворимый в воде. Степень гидролиза казеина составляла от 70,0 % до 80,0 %; pH от 7,3 до 7,5; содержание аминного азота от 4,5 % до 6,5 %; содержание хлор-ионов от 18,0 % до 24,0 %; содержание общего азота от 9,0 % до 13,0 %; потеря в массе при высушивании не более 7,0 %.

#### **3.4.2 Элементный состав**

Элементный состав СГК сравнивали с элементным составом казеиновых кислот технических, входящих в состав контрольной питательной среды (МХА-BBL) (табл. 3.12). В табл. 3.12 приведены только те элементы, концентрации которых превышали величину  $10^{-3}$  мг/г.

Таблица 3.12 – Элементный состав солянокислотного гидролизата казеина и казаминовых кислот технических (расчетная концентрация)

| Элемент       | СГК, мг/г                  | Казаминовые кислоты<br>технические<br>(расчетная 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 (K)     | 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                                                            |
| Ванадий (V)   | 0,0004±4×10 <sup>-5</sup>  | 0,0007±2×10 <sup>-5</sup>                                            |
| Медь (Cu)     | 0,0004±1×10 <sup>-5</sup>  | 0,0005±3×10 <sup>-5</sup>                                            |
| Молибден (Mo) | 0,00021±2×10 <sup>-5</sup> | 0,00011±1×10 <sup>-5</sup>                                           |
| Стронций (Sr) | 0,0005±2×10 <sup>-5</sup>  | 0,0004±2×10 <sup>-5</sup>                                            |
| Хром (Cr)     | 0,0028±2×10 <sup>-4</sup>  | 0,0021±1×10 <sup>-4</sup>                                            |
| Титан (Ti)    | 0,002±3×10 <sup>-4</sup>   | 0,001±4×10 <sup>-4</sup>                                             |
| Никель (Ni)   | 0,0083±5×10 <sup>-4</sup>  | 0,0001±1×10 <sup>-5</sup>                                            |
| Рубидий (Rb)  | 0,00043±4×10 <sup>-5</sup> | 0,0005±1×10 <sup>-5</sup>                                            |
| Вольфрам (W)  | 0,00015±3×10 <sup>-5</sup> | 0,0003±2×10 <sup>-5</sup>                                            |
| Цезий (Cs)    | 0,00008±4×10 <sup>-6</sup> | 0,00007±1×10 <sup>-6</sup>                                           |
| Ниобий (Nb)   | 0,00002±1×10 <sup>-6</sup> | 0,00001±2×10 <sup>-6</sup>                                           |
| Тантал (Ta)   | 0,00002±1×10 <sup>-7</sup> | 0,00001±1×10 <sup>-7</sup>                                           |

Как видно из табл. 3.12, элементный состав СГК практически не отличается от элементного состава казаминовых кислот технических, определенного расчётно.

### 3.4.3 Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций

Изучение молекулярно-массового распределения пептидных фракций показало, что 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, в то же время пептидные фракции с молекулярной массой более 10 kD в нем отсутствуют, что говорит о высокой степени расщепления белка. На рис. 3.3 представлен профиль молекулярно-массового распределения пептидных фракций.

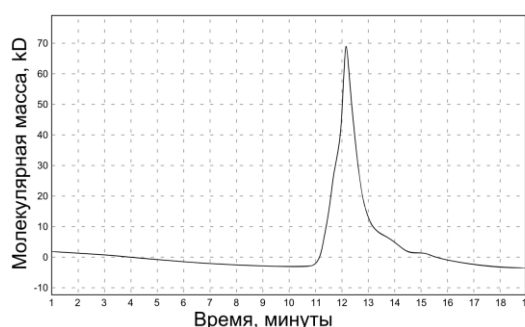
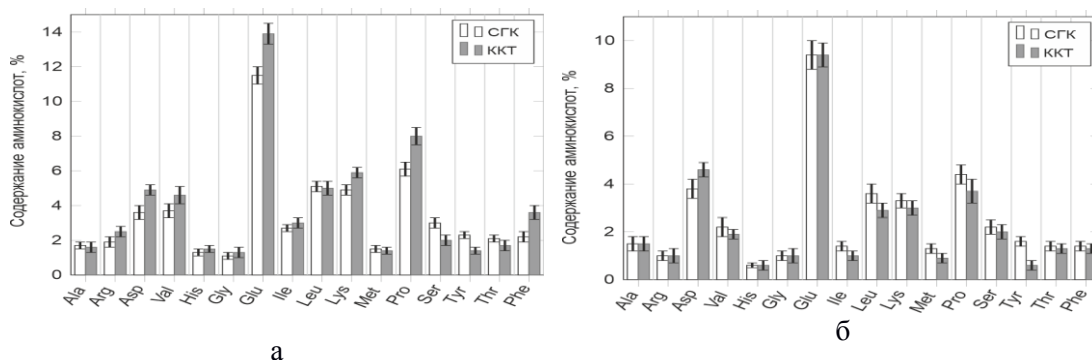


Рисунок 3.2 – Профиль молекулярно-массового распределения пептидных фракций в солянокислотном гидролизате казеина

### 3.4.4 Аминокислотный состав

Содержание общих и свободных аминокислот в СГК и казеиновых кислотах технических (ККТ) представлено на рис. 3.4.



Примечания: Ala – аланин, Arg – аргинин, Asp – аспарагиновая кислота, Val – валин, His – гистидин, Gly – глицин, Glu – глутаминовая кислота, Ile – изолейцин, Leu – лейцин, Lys – лизин, Met – метионин, Pro – пролин, Ser – серин, Tyr – тирозин, Thr – треонин, Phe – фенилаланин

Рисунок 3.3 – Содержание общих (а) и свободных (б) аминокислот в солянокислотном гидролизате казеина (СГК) и казеиновых кислотах технических (ККТ), %

Как видно из рис. 3.3, исследуемые образцы практически не различались между собой по аминокислотному составу. В обоих гидролизатах преобладали глутаминовая кислота и пролин. Содержание свободных аминокислот в SGK составляло  $(40,1 \pm 2,7) \%$ , в KKT –  $(36,7 \pm 2,2) \%$ , а общих  $(54,7 \pm 2,5) \%$  и  $(62,3 \pm 2,1) \%$  соответственно.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ «РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА СОЛЯНОКИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗАТА КАЗЕИНА»**

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

Разработанная технология включает гидролиз белка соляной кислотой; двухстадийную деионизацию для освобождения от тимидина и осветления; осаждение ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ ; распылительное высушивание.

Содержание ионов  $\text{Ca}^{+2}$  и  $\text{Mg}^{+2}$  в разработанном солянокислотном гидролизате казеина составляет  $(1,3 \pm 0,15) \text{ мг/г}$  и  $(0,65 \pm 0,05) \text{ мг/г}$  соответственно; содержание ионов  $\text{Mn}^{+2}$  не более  $0,5 \text{ мг/г}$ , содержание ионов  $\text{Zn}^{+2}$  не более  $0,06 \text{ мг/г}$ , а содержание тимидина менее  $0,001 \text{ мг/г}$ .

Изучены химические характеристики солянокислотного гидролизата казеина: степень гидролиза от 70% до 80 %; значение pH среды от 7,3 до 7,5; содержание аминного азота составляет от 4,5% до 6,5 %, содержание хлор-ионов – от 19% до 24 %, содержание низкомолекулярных пептидных

фракций с массой до 3 kD – 90 %, содержание свободных аминокислот составляет  $(40,1 \pm 2,7)$  %, а общих аминокислот –  $(54,7 \pm 2,5)$  %.

На производство солянокислотного гидролизата казеина подготовлена нормативно-техническая документация: Технические условия «Солянокислотный гидролизат казеина» ТУ 9385-182-78095326-2012 и Промышленный регламент «Солянокислотный гидролизат казеина» ПР 78095326-12-2012.

## Глава 4. РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Использование разработанного солянокислотного гидролизата казеина позволило сконструировать питательную среду для определения чувствительности микроорганизмов к АМП, состав которой аналогичен составу агара Мюллера-Хинтон (табл. 4.1).

Таблица 4.1 – Состав разработанной питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

|                                                                                                                          |                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Солянокислотный гидролизат казеина, модифицированный, сухой (СГК модифицированный), сухой ТУ 9385-182-78095326-2012..... | 17,5 г/л       |
| Мясной экстракт (Conda Pronadisa, Испания) кат. №1700.00.....                                                            | 2,0 г/л        |
| Крахмал растворимый (амилодекстрин) ГОСТ 10163-76.....                                                                   | 1,5 г/л        |
| Агар бактериологический (Conda Pronadisa, Испания) кат. №1814.....                                                       | (14,5±2,5)*г/л |
| Примечание – Изменение концентрации агара связано с различной прочностью каждой его партии                               |                |

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.

В ходе исследований изучены физико-химические и биологические показатели качества питательной среды и определены критерии ее пригодности.

### 4.1 Физико-химические показатели качества питательной среды

Для определения показателей качества питательной среды изготовлено 10 опытно-промышленных серий из 10 серий СГК. Образцы всех серий представляли собой мелкодисперсный порошок кремового цвета,  $(35,5 \pm 2,5)$  г которого полностью растворялся в 1 л дистиллированной воды с образованием прозрачного раствора желтого цвета. В табл. 4.2 приведены их физико-химические характеристики.

Таблица 4.2 – Физико-химические показатели качества опытно-промышленных серий питательной среды

| Физико-химические характеристики  | Серия № |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-----------------------------------|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                   | 1       | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |
| рН                                | 7,3     | 7,2  | 7,3  | 7,2  | 7,2  | 7,2  | 7,25 | 7,4  | 7,3  | 7,25 |
| Содержание аминного азота, %      | 3,1     | 3,3  | 2,7  | 3,4  | 3,3  | 3,2  | 3,4  | 2,9  | 3,3  | 3,0  |
| Содержание хлор-ионов (NaCl), %   | 15,5    | 17,2 | 14,0 | 16,5 | 17,0 | 16,9 | 14,2 | 14,9 | 16,7 | 15,6 |
| Потеря в массе при высушивании, % | 5,4     | 4,0  | 6,8  | 4,1  | 4,3  | 3,6  | 6,7  | 4,2  | 5,9  | 4,0  |
| Прочность студня по Валенту, г    | 530     | 594  | 520  | 500  | 530  | 555  | 580  | 563  | 547  | 600  |

Как видно из табл. 4.2, опытно-промышленные серии питательной среды имели следующие физико-химические характеристики: значение рН от 7,2 до 7,4, содержание аминного азота от 2,7 % до 3,4 %, содержание хлор-ионов в пересчете на натрия хлорид от 14,0 % до 17,0 %, потеря в массе при высушивании не более 7,0 %, а прочность студня среды по Валенту от 500 г до 600 г.

## 4.2 Биологические показатели качества разработанной питательной среды

### 4.2.1 Показатель чувствительности питательной среды, стабильности основных биологических свойств и скорости роста микроорганизмов

Все опытно-промышленные серии разработанной питательной среды

обеспечивали визуально обнаруживаемый рост тест-штаммов микроорганизмов с обычными питательными потребностями при посеве по 0,1 мл из разведения  $10^{-6}$  через  $(18 \pm 2)$  ч при температуре инкубации  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ : *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. При добавлении 5 % лошадиной крови и 20,0 мг/л  $\beta$ -НАД опытно-промышленные серии обеспечивали рост тест-штаммов *S. pneumoniae* ATCC 49619 и *H. influenzae* ATCC 49766 в виде полупрозрачных четко очерченных колоний диаметром  $(0,8-1,0)$  мм и в виде полупрозрачных слизистых колоний сероватого цвета диаметром  $(1,6-2,0)$  мм, соответственно.

#### **4.2.2 Показатель чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом**

На опытно-промышленных сериях определяли значения диаметров зон подавления роста тест-штаммов с обычными и со сложными питательными потребностями вокруг дисков с АМП, рекомендованные стандартом EUCAST для контроля качества питательных сред: *E. coli* ATCC 25922 вокруг 40 АМП, *S. aureus* ATCC 29213 – 23 АМП, *S. aureus* ATCC 25922 – 36 АМП, *P. aeruginosa* ATCC 27853 – 16 АМП, *E. faecalis* ATCC 29212 – 11 АМП, *S. pneumoniae* ATCC 49619 – 27 АМП, а *H. influenzae* ATCC 49766 – 22 АМП (табл. 4.3).

Таблица 4.3 – Значения диаметров зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов вокруг дисков с антимикробными препаратами на опытно-промышленных сериях питательной среды

| АМП, мкг                                           | <i>E. coli</i> ATCC 25922 |                         | <i>S. aureus</i> ATCC 29213 |                         | <i>S. aureus</i> ATCC 25922 |                         | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 |                         | <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 |                         | <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 |                         | <i>H. influenzae</i> ATCC 49766 |                         |
|----------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|
|                                                    | Допустимые значения, мм   | Полученные значения, мм | Допустимые значения, мм     | Полученные значения, мм | Допустимые значения, мм     | Полученные значения, мм | Допустимые значения, мм         | Полученные значения, мм | Допустимые значения, мм       | Полученные значения, мм | Допустимые значения, мм         | Полученные значения, мм | Допустимые значения, мм         | Полученные значения, мм |
| 1                                                  | 2                         | 3                       | 4                           | 5                       | 6                           | 7                       | 8                               | 9                       | 10                            | 11                      | 12                              | 13                      | 14                              | 15                      |
| Ампициллин 10 мкг                                  | 15-22                     | 18±1                    | -*                          | -*                      | 27-35                       | 31±1                    | -*                              | -*                      | -*                            | -*                      | -*                              | -*                      | -*                              | -*                      |
| Ампициллин 2 мкг                                   | -*                        | -*                      | 15-21                       | 18±1                    | -*                          | -*                      | -*                              | -*                      | 15-21                         | 18±1                    | 25-31                           | 26±1                    | 19-25                           | 20±1                    |
| Ампициллин/<br>сульбактам 10-10 мкг                | 19-24                     | 22±1                    | -*                          | -*                      | 29-37                       | 33±1                    | -*                              | -*                      | -*                            | -*                      | -*                              | -*                      | -*                              | -*                      |
| Амоксициллин/<br>клавулановая кислота<br>20-10 мкг | 18-24                     | 21±1                    | -*                          | -*                      | 28-36                       | 34±1                    | -*                              | -*                      | -*                            | -*                      | -*                              | -*                      | 17-23                           | 20±1                    |
| Бензилпенициллин 1ЕД                               | -*                        | -*                      | 12-18                       | 15±1                    | -*                          | -*                      | -*                              | -*                      | -*                            | -*                      | 16-22                           | 19±1                    | 15-21                           | 18±1                    |
| Карбенициллин 100 мкг                              | 23-29                     | 26±1                    | -*                          | -*                      | -*                          | -*                      | -*                              | -*                      | -*                            | -*                      | -*                              | -*                      | -*                              | -*                      |
| Мециллин 10 мкг                                    | 24-30                     | 27±1                    | -*                          | -*                      | -*                          | -*                      | -*                              | -*                      | -*                            | -*                      | -*                              | -*                      | -*                              | -*                      |
| Пиперацillin 30 мкг                                | 21-27                     | 24±1                    | -*                          | -*                      | -*                          | -*                      | -*                              | -*                      | -*                            | -*                      | -*                              | -*                      | -*                              | -*                      |
| Пиперацillin/<br>Тазобактам 30-6 мкг               | 21-27                     | 24±1                    | -*                          | -*                      | -*                          | -*                      | 23-29                           | 26±1                    | -*                            | -*                      | -*                              | -*                      | -*                              | -*                      |
| Тикарциллин 75 мкг                                 | 24-30                     | 27±1                    | -*                          | -*                      | -*                          | -*                      | -*                              | -*                      | -*                            | -*                      | -*                              | -*                      | -*                              | -*                      |
| Тикарциллин/ клавулановая<br>кислота 75/10мкг      | 24-30                     | 27±1                    | -*                          | -*                      | 29-37                       | 33±1                    | 20-28                           | 24±1                    | -*                            | -*                      | -*                              | -*                      | -*                              | -*                      |
| Цефуросксим 30 мкг                                 | 20-26                     | 23±1                    | -*                          | -*                      | 27-35                       | 31±1                    | -*                              | -*                      | -*                            | -*                      | 28-34                           | 31±1                    | -*                              | -*                      |

Продолжение таблицы 4.3.

| 1                              | 2     | 3    | 4     | 5    | 6     | 7    | 8     | 9    | 10    | 11   | 12    | 13   | 14    | 15   |
|--------------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| Цефокситин 30 мкг              | 23-29 | 26±1 | 24-30 | 27±1 | 23-29 | 26±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   |
| Цефотаксим 5 мкг               | 25-31 | 28±1 | _*    | _*   | 25-31 | 28±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | 28-34 | 31±1 | 29-37 | 33±1 |
| Цефподоксим 10 мкг             | 23-28 | 25±1 | _*    | _*   | 19-25 | 22±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | 29-35 | 32±1 | 30-36 | 33±1 |
| Цефтриаксон 30 мкг             | 29-35 | 32±1 | _*    | _*   | 22-28 | 25±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | 32-38 | 35±1 | 34-42 | 38±1 |
| Цефтазидим 10 мкг              | 23-29 | 26±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | 21-27 | 24±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   |
| Цефепим 30 мкг                 | 31-37 | 34±1 | _*    | _*   | 23-29 | 26±1 | 25-31 | 28±1 | _*    | _*   | 31-37 | 34±1 | 30-36 | 33±1 |
| Цефтаролин 5 мкг               | 24-30 | 27±1 | 24-30 | 27±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   |
| Азтреонам 30 мкг               | 28-36 | 32±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | 23-29 | 26±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   |
| Эртапенем 10 мкг               | 29-36 | 33±1 | _*    | _*   | 24-31 | 27±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | 28-34 | 31±1 | 27-33 | 30±1 |
| Меропенем 10 мкг               | 28-35 | 32±1 | _*    | _*   | 29-37 | 33±1 | 27-33 | 29±1 | _*    | _*   | 30-38 | 34±1 | 27-35 | 31±1 |
| Имипенем 10 мкг                | 26-32 | 29±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | 20-28 | 24±1 | 24-30 | 27±1 | 34-42 | 38±1 | 24-30 | 27±1 |
| Дорипенем 10 мкг               | 27-35 | 31±1 | _*    | _*   | 33-42 | 37±1 | 28-35 | 32±1 | _*    | _*   | 31-37 | 34±1 | 26-32 | 29±1 |
| Канамицин 30 мкг               | 17-25 | 21±1 | _*    | _*   | 19-26 | 22±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   |
| Тобрамицин 10 мкг              | 18-26 | 22±1 | 20-26 | 23±1 | 19-29 | 24±1 | 20-26 | 23±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   |
| Гентамицин 10 мкг              | 19-26 | 23±1 | 19-25 | 22±1 | 19-27 | 23±1 | 17-23 | 20±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   |
| Гентамицин 30 мкг              | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | 12-18 | 15±1 | _*    | _*   | _*    | _*   |
| Амикацин 30 мкг                | 19-26 | 23±1 | 18-24 | 21±1 | 20-26 | 23±1 | 18-26 | 22±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   |
| Нетилмицин 10 мкг              | 18-24 | 21±1 | 20-26 | 23±1 | _*    | _*   | 15-21 | 18±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   |
| Стрептомицин 300 мкг           | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | 14-20 | 17±1 | _*    | _*   | _*    | _*   |
| Налидиксовая кислота<br>30 мкг | 22-28 | 25±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | 27-33 | 30±1 |
| Норфлоксацин 10 мкг            | 28-35 | 32±1 | 18-24 | 21±1 | 17-23 | 20±1 | _*    | _*   | 16-22 | 19±1 | 18-24 | 21±1 | _*    | _*   |
| Офлоксацин 50 мкг              | 29-33 | 31±1 | 21-27 | 24±1 | 24-28 | 26±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | 18-24 | 21±1 | 31-37 | 34±1 |
| Перфлоксацин 5 мкг             | 26-32 | 29±1 | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   | _*    | _*   |
| Ципрофлоксацин 5 мкг           | 29-37 | 32±1 | 21-27 | 24±1 | 22-30 | 26±1 | 25-33 | 29±1 | 19-25 | 22±1 | 22-28 | 25±1 | 32-40 | 36±1 |
| Левифлоксацин 5 мкг            | 29-37 | 33±1 | 23-29 | 26±1 | 29-37 | 33±1 | 19-26 | 22±1 | 19-25 | 22±1 | 21-27 | 24±1 | 31-39 | 35±1 |

Продолжение табл. 4.3

| 1                                                 | 2     | 3    | 4     | 5    | 6     | 7    | 8     | 9    | 10    | 11   | 12    | 13   | 14    | 15   |
|---------------------------------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| Моксифлоксацин 5 мг                               | 28-35 | 32±1 | 25-31 | 28±1 | 28-35 | 31±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | 24-30 | 27±1 | 30-36 | 33±1 |
| Эритромицин 15 мг                                 | -*    | -*   | 23-29 | 26±1 | 22-30 | 26±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | 26-32 | 29±1 | 10-16 | 13±1 |
| Кларитромицин 15 мг                               | -*    | -*   | -*    | -*   | 26-32 | 29±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | -*    | -*   | -*    | -*   |
| Азитромицин 15 мг                                 | -*    | -*   | -*    | -*   | 21-26 | 24±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | -*    | -*   | -*    | -*   |
| Тетрацилин 30 мг                                  | -*    | -*   | 32-31 | 27±1 | 24-30 | 27±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | 28-34 | 31±1 | 28-34 | 31±1 |
| Доксицилин 30 мг                                  | -*    | -*   | -*    | -*   | 23-29 | 26±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | -*    | -*   | -*    | -*   |
| Миноцилин 30 мг                                   | -*    | -*   | 23-29 | 24±1 | 25-30 | 29±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | 25-31 | 26±1 | 26-32 | 27±1 |
| Тигецилин 15 мг                                   | 20-27 | 24±1 | 19-25 | 22±1 | 20-25 | 22±1 | -*    | -*   | 20-26 | 23±1 | 24-30 | 27±1 | -*    | -*   |
| Колистин 10 мг                                    | 11-17 | 13±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | 11-17 | 14±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | -*    | -*   |
| Полимиксин 300 ЕД                                 | 13-19 | 15±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | 14-18 | 16±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | -*    | -*   |
| Ванкомицин 5 мг                                   | -*    | -*   | -*    | -*   | -*    | -*   | -*    | -*   | 10-16 | 13±1 | 17-23 | 20±1 | -*    | -*   |
| Тейкопланин 30 мг                                 | -*    | -*   | -*    | -*   | 15-21 | 18±1 | -*    | -*   | 15-21 | 18±1 | 18-24 | 21±1 | -*    | -*   |
| Рифампицин 5 мг                                   | -*    | -*   | 30-36 | 33±1 | 26-34 | 30±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | 26-32 | 29±1 | 21-27 | 24±1 |
| Клиндамицин 2 мг                                  | -*    | -*   | 23-29 | 26±1 | 24-30 | 27±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | 22-28 | 25±1 | -*    | -*   |
| Триметоприм/<br>сульфаметоксазол<br>1,25-23,75 мг | 23-29 | 26±1 | 26-32 | 29±1 | 24-30 | 27±1 | -*    | -*   | 26-34 | 30±1 | 18-26 | 22±1 | 27-35 | 31±1 |
| Нитрофурантоин 100 мг                             | 17-23 | 18±1 | 17-23 | 20±1 | 18-22 | 20±1 | -*    | -*   | 18-24 | 21±1 | 25-31 | 26±1 | -*    | -*   |
| Хлорамфеникол 30 мг                               | 21-27 | 24±1 | 20-28 | 24±1 | 19-26 | 22±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | 24-30 | 27±1 | 31-37 | 34±1 |
| Фузидовая кислота 10 мг                           | -*    | -*   | 26-32 | 29±1 | 24-32 | 28±1 | -*    | -*   | -*    | -*   | -*    | -*   | -*    | -*   |

Примечание – \* тестирование данного тест-штамма микроорганизма к АМП не проводится

Как видно из табл. 4.3, значения диаметров зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов вокруг дисков с АМП соответствовали целевым значениям для 82 % тестов, а для 18 % тестов отклонялись от целевого значения на  $(1,5 \pm 0,5)$  мм, но не выходили за рамки допустимых интервалов.

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/сульфометоксазол, – чувствительных к изменению содержания ионов двухвалентных металлов и тимидина, отклонения диаметров от целевых значений были более заметны и зависели от серий СГК с различающимися концентрациями ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и тимидина.

Качество разработанной питательной среды изучали также на расширенном наборе тест-штаммов микроорганизмов, обладающих известными механизмами резистентности: *K. pneumoniae* ATCC 700603 – продуцент  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра (SHV-18), метициллинорезистентный *S. aureus* ATCC 43300, обладающий геном резистентности *tesA*, ванкомицинорезистентный *E. faecalis* ATCC 51299, обладающий геном резистентности *vanB* и обладающий высоким уровнем резистентности к аминогликозидам. Чувствительность перечисленных тест-штаммов микроорганизмов определяли к следующим АМП: *K. pneumoniae* ATCC 700603 к цефотаксиму, цефтриаксону, цефтазидиму и цефподоксиму; *S. aureus* ATCC 43300 к цефокситину; *E. faecalis* ATCC 51299 к тейкопланину, ванкомицину, гентамицину и стрептомицину.

Кроме того, разработанную питательную среду валидировали в отношении работы с комбинированными дисками, у которых один компонент ингибирует  $\beta$ -лактамазы. Для этого тестировали *K. pneumoniae* ATCC 700603 и пиперациллин/тазобактам, а также *S. aureus* ATCC 29213,

который является слабым продуцентом  $\beta$ -лактамаз, и амоксициллин/клавулановую кислоту. Как показали результаты тестирования, полученные значения диаметров зон подавления роста всех комбинаций тест-штамм-АМП соответствовали допустимым диапазонам, а для 26 из 33 тестов значения соответствовали целевому.

Как показали результаты исследования, 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  $\beta$ -лактамаз.

#### 4.3 Определение сроков годности питательной среды

Для определения срока годности 3 опытно-промышленные серии питательной среды хранили в термостате при температуре 40 °С, превышающей рекомендованную температуру хранения на 20 °С (метод «ускоренного старения»). Срок проведения эксперимента составил 9 мес. с выемкой проб через 3, 6, 7, 8 и 9 мес. хранения. В течение всего периода проведения эксперимента у образцов не выявлено изменений физико-химических показателей. Биологические показатели оставались стабильными в течение 7 мес. хранения. Через 8 мес. хранения отмечены ухудшение роста тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212 и несоответствие значений диаметров их зон подавления роста вокруг дисков с АМП допустимому интервалу. Через 9 мес. хранения получены аналогичные результаты.

В соответствии с МУК 4.2.2316-08 и ОФС.1.1.0009.15 срок хранения разработанной питательной среды без ухудшения биологических показателей составил 24 мес. (28 мес. минус 3 мес.). Для подтверждения полученных результатов провели исследование методом выемки проб при

рекомендованных условиях хранения. Образцы трёх серий питательной среды хранили 30 мес., делая выемку проб один раз в 3 мес. За весь период проведения эксперимента изменений физико-химических и биологических показателей питательной среды не выявлено, что подтвердило адекватность установленного срока годности.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ «РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК»**

Использование разработанного солянокислотного гидролизата казеина позволило сконструировать питательную среду для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, состав которой аналогичен составу агара Мюллера-Хинтон.

В ходе проделанной работы определены физико-химические показатели качества разработанной питательной среды (агара Мюллера-Хинтон), определен показатель стабильности основных биологических свойств и скорость роста тест-штаммов микроорганизмов, а также показатель чувствительности разработанной питательной среды. Полученные значения использовали при оформлении технических условий на разработанную питательную среду.

На разработанном агаре Мюллера-Хинтон диско-диффузионным методом были получены значения диаметров зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов с обычными и со сложными питательными потребностями и обладающих известными механизмами резистентности вокруг дисков с АМП 42 наименований, включая комбинированные диски, содержащие ингибитор  $\beta$ -лактамаз, были получены значения, соответствующие допустимому диапазону, причем более 80 % этих значений соответствовали целевым.

Для проведения контроля качества питательной среды из расширенного списка тест-штаммов микроорганизмов и антимикробных препаратов был определен минимально достаточный набор тест-штамм–АМП наиболее чувствительных к изменению содержания ионов двухвалентных металлов и тимидина, которые вошли в технические условия: *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/сульфометоксазол.

Определен срок годности разработанной питательной среды, который составляет 2 года.

Таким образом, в результате проделанной работы определены критерии качества разработанной питательной среды: физико-химические показатели, биологические показатели и срок годности.

Отсутствие существенных отличий в показателях качества между 10 сериями разработанной питательной среды позволило использовать в дальнейших исследованиях только три серии питательной среды.

## Глава 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Испытания разработанной питательной среды (МХА-Оболенск) при определении чувствительности музейных и клинических штаммов различных групп микроорганизмов, включая *Photorhabdus* spp., проводили диско-диффузионным методом и методом градиентной диффузии (Е-тесты).

### 5.1 Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов

В испытаниях определяли чувствительность 10 тест-штаммов, относящихся к микроорганизмам с обычными и со сложными питательными потребностями, к восьми АМП диско-диффузионным методом в сравнении с семью аналогичными питательными средами: МХА-BBL, МХА-Difco, МХА-НМ, МХА-Bio-Rad, МХА-Merk, МХА-НИЦФ, АГВ. 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, цiproфлоксацин, имипенем, меропенем, тигециклин и триметоприм/ сульфаметоксазол. Для культивирования микроорганизмов со сложными питательными потребностями во все исследуемые питательные среды вносили 5 % лошадиную кровь и 20,0 мг/л  $\beta$ -НАД.

Как показали результаты исследований, в основном, для всех тест-штаммов на всех исследуемых питательных средах получены значения диаметров зон подавления роста, укладывающиеся в допустимые диапазоны. Исключением составили пары тест-штамм–АМП, чувствительные к содержанию ионов двухвалентных металлов и тимидина: *E. coli* ATCC 25922 – тигециклин, *P. aeruginosa* ATCC 27853 – гентамицин, тобрамицин, амикацин, цiproфлоксацин, имипенем и меропенем, *E. faecalis* ATCC 29212 – триметоприм/сульфаметоксазол. Результаты их тестирования в оценочных категориях (см. раздел 2.2.3.1) представлены в табл. 5.1.

Таблица 5.1 – Оценка диаметров зон подавления роста тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *E. faecalis* ATCC 29212 относительно допустимых и целевых значений

[illegible]

Как видно из табл. 5.1, полученные данные, в основном, соответствовали целевому значению или отклонялись от него на 1 мм («L» и «H»-отклонения).

Ошибки в виде отклонений значений диаметров зон подавления роста, выходящие за рамки нижних допустимых пределов «LE» были обнаружены при тестировании *E. coli* ATCC 25922 и тигециклина на МХА-Merck, существенные VH-отклонения на МХА-НИЦФ и VL-отклонения на АГВ.

Также ошибки, относящие к категории «LE», были обнаружены при определении чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к гентамицину, тобрамицину и амикацину на МХА-НМ, а на МХА-НИЦФ и АГВ, напротив, были обнаружены ошибки, относящиеся к категории «HE». На МХА-Bio-Rad были отмечены существенные VL-отклонения.

При тестировании чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к ципрофлоксацину наблюдались LE-ошибки на МХА-НМ, а на МХА-Merck регистрировали существенное VH-отклонение.

Определение чувствительности к карбапенемам показало отсутствие ошибок и существенных отклонений от целевых значений при анализе чувствительности к имипенему, а при анализе к меропенему, напротив, выявлена LE-ошибка на МХА-BBL.

При определении чувствительности *E. faecalis* ATCC 29212 к триметоприму/сульфаметоксазолу отмечено полное отсутствие зон подавления роста на питательных средах МХА-НИЦФ и АГВ, которые были отмечены в таблице как «LE» ошибки, что свидетельствует, вероятнее всего, о превышении в данных питательных средах концентрации тимидина.

Возможной причиной полученных «LE» и «HE» ошибок могут являться отклонения в содержании ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и тимидина в исследуемых питательных средах, выделенные серым цветом в табл. 5.2.

Таблица 5.2 – Элементный состав питательных сред восьми фирм-производителей

| Концентрация,<br>мг/л | МХА-BBL          | МХА-Difco        | МХА-Bio-<br>Rad  | МХА-НМ           | МХА-<br>Merck     | МХА-<br>НИЦФ   | АГВ              | МХА-Оболенск     |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|----------------|------------------|------------------|
| Кальций (Ca)          | 20,10±2,0        | 19,62±1,0        | 24,20±2,0        | 34,20±0,9        | 18,30±0,9         | 7,6±0,3        | 9,8±0,6          | 21,50±3,0        |
| Магний (Mg)           | 11,00±0,2        | 9,45±0,5         | 10,64±1,0        | 26,98±0,5        | 10,14±0,4         | 9,26±1,0       | 8,7±0,5          | 11,60±4,0        |
| Марганец (Mn)         | 0,15±0,03        | 0,24±0,04        | 0,20±0,03        | 0,11±0,02        | 23,12±2,0         | 0,11±0,01      | 2,2±0,6          | 0,16±0,03        |
| Цинк (Zn)             | 1,18±0,05        | 0,35±0,01        | 0,46±0,02        | 0,43±0,03        | 0,51±0,06         | 0,42±0,02      | 0,98±0,5         | 0,30±0,06        |
| Железо (Fe)           | 0,76±0,01        | 0,65±0,02        | 0,50±0,03        | 0,72±0,01        | 0,82±0,02         | 4,94±0,04      | 1,02±0,03        | 0,23±0,02        |
| Калий (Ka)            | 68,78±2,0        | 62,32±1,0        | 113,62±1,0       | 231,40±1,5       | 49,98±1,0         | 254,6±1,5      | 59,3±1,0         | 66,70±1,0        |
| Натрий (Na)           | 3146,40±<br>23,0 | 2983,00±<br>20,0 | 3268,00±<br>19,0 | 2017,80±<br>10,0 | 2077,40±<br>12,0  | 3720±<br>10,0  | 3049,00±<br>20,0 | 2300,00±<br>13,0 |
| Фосфор (P)            | 115,52±4,0       | 137,18±3,0       | 158,84±5,0       | 120,08±5,0       | 105,40±4,0        | 115,08±5,0     | 109,58±3,0       | 83,16±5,0        |
| Сера (S)              | 202,16±1,0       | 210,52±6,0       | 183,92±4,0       | 251,18±5,0       | 169,66±5,0        | 156,03±5,0     | 192,52±6,0       | 158,40±2,0       |
| Кремний (Si)          | 4,56±0,03        | 8,74±0,02        | 3,11±0,05        | 6,84±0,03        | 3,40±0,04         | 4,14±0,03      | 2,03±0,02        | 2,31±0,02        |
| Алюминий (Al)         | 0,53±0,02        | 0,30±0,01        | <0,030           | 0,11±0,01        | 0,14±0,02         | 0,1±0,01       | 0,10±0,01        | <0.026           |
| Барий (Ba)            | 0,065±<br>0,001  | 0,16±<br>0,01    | 0,068±<br>0,001  | <0.0038          | 0,0034±<br>0,0001 | <0.0038        | 0,01±<br>0,001   | <0.0033          |
| Ванадий (V)           | 0,027±0,001      | 0,15±0,01        | 0,011±0,0001     | 0,023±0,001      | 0,10±0,001        | 0,008±0,001    | 0,032±0,01       | 0,01±0,0001      |
| Медь (Cu)             | <0,004           | <0,004           | 0,011±0,002      | <0.004           | <0.0034           | 0,23±0,01      | <0,004           | 0,20±0,01        |
| Молибден (Mo)         | 0,04±0,002       | 0,023±0,001      | 0,027±0,002      | 0,046±0,001      | 0,04±0,001        | 0,022±0,001    | 0,03±0,001       | 0,007±0,001      |
| Свинец (Pb)           | 0,22±0,01        | <0,011           | 0,023±<br>0,001  | 0,06±<br>0,001   | 0,014±<br>0,002   | 0,03±<br>0,001 | <0,011           | 0,08±<br>0,001   |
| Стронций (Sr)         | 0,06±0,001       | 0,19±0,05        | 0,11±0,04        | 0,22±0,05        | 0,03±0,02         | 0,08±0,05      | 0,09±0,05        | <0.0033          |
| Хром (Cr)             | 0,076±0,001      | 0,027±0,005      | 0,046±0,001      | 0,008±0,0001     | 0,03±0,001        | 0,15±0,01      | 0,057±0,005      | 0,046±0,001      |

Как видно из табл. 5.2, элементный состав всех протестированных питательных сред между собой отличался незначительно, кроме концентраций ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ . Наибольшее содержание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  обнаружено в МХА-НМ, что, вероятнее всего, объясняет получение «LE» при тестировании на данной питательной среде *P. aeruginosa* ATCC 27853 к аминогликозидам и к ципрофлоксацину, а наименьшее содержание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  обнаружено в МХА-НИЦФ и АГВ, что объясняет получение «HE» ошибок.

Концентрация ионов  $\text{Zn}^{2+}$  во всех образцах питательных сред находится ниже значения 1,0 мг/л и только в МХА-BBL это значение составляет 1,18 мг/л, что, вероятнее всего, приводит к получению LE-ошибке при определении чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к меропенему. Концентрация ионов  $\text{Mn}^{2+}$  во всех исследованных образцах соответствовала требованиям ISO/TS 16782:2016 и составляла менее 8,0 мг/л, кроме МХА-Merck. Для данной питательной среды это значение составляло 23,02 мг/л и привело к получению LE-ошибки при тестировании *E. coli* ATCC 25922 и тигециклина.

Таким образом, сравнительные испытания показали, что разработанная питательная среда (МХА-Оболensk) обеспечивает получение достоверных результатов определения чувствительности микроорганизмов к аминогликозидам, фторхинолонам, тигециклину, карбапенемам и сульфаниламидным препаратам, что связано со сбалансированным содержанием ионов двухвалентных металлов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) и тимидина.

## 5.2 Чувствительность штаммов микроорганизмов, возбудителей ИСМП

На МХА-Оболensk определяли чувствительность 18 штаммов, преимущественно *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis*, из-за их клинической значимости в качестве возбудителей ИСМП [107]. Исследуемые штаммы были охарактеризованы по чувствительности к АМП и наличию генетических детерминант антибиотикорезистентности (табл. 5.3).

Таблица 5.3 – Характеристика штаммов микроорганизмов, возбудителей ИСМП, использованных для тестирования МХА-Оболенск

| Вид микроорганизма                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Штамм      | Резистентность к АМП                                                          | Генетические детерминанты антибиотикорезистентности                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>K. pneumoniae</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | B-1822/14  | AMC, CEF, CTA, CAZ, FEP, EPM, GEN, TOB, AMI, CIP, TET, TGC, CTZ, NIT, CM      | <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>                                                            |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | B-1969/14  | AMC, CEF, CTA, CEX, EPM, IMI, TOB, CIP, CTZ, NIT, CM                          | <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>                                                                                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | B-352K/15  | AMC, CEF, CEX, CTA, CAZ, FEP, EPM, GEN, TOB, CIP, NIT, CM                     | <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-244</sub>                                                        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | B-369/15   | AMC, CEF, CEX, CTA, CAZ, FEP, EPM, GEN, TOB, CIP, TGC, CTZ, NIT, CM           | <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-244</sub>                                                        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 410        | AMC, CEF, CEX, CTA, CAZ, FEP, EPM, GEN, TOB, CIP, CTZ, NIT, CM                | <i>bla</i> <sub>NDM</sub>                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 409        | AMC, CEF, CEX, CTA, CAZ, FEP, EPM, GEN, TOB, CIP, CTZ, NIT, CM                | <i>bla</i> <sub>NDM</sub>                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | I-1627     | AMP, TCA                                                                      | <i>bla</i> <sub>SHV</sub>                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | I-2135     | AMP, TCA                                                                      | <i>bla</i> <sub>SHV</sub>                                                                                                                         |
| <i>A. baumannii</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | B-740/14   | AMC, CEF, CEX, CTX, CTA, CAZ, FEP, IMI, GEN, TOB, AMI, CIP, CTZ, NIT, CM      | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>                 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | B-2137/14A | AMC, CEF, CEX, CTX, CTA, CAZ, FEP, IMI, GEN, TOB, AMI, CIP, TET, CTZ, NIT, CM | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> , <i>int2</i>  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | B-774/15A  | AMC, CEF, CEX, CTX, CTA, CAZ, FEP, IMI, GEN, TOB, AMI, CIP, NIT, CM           | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-115</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> , <i>int1</i> |
| <i>P. aeruginosa</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | B-458/14   | AMC, CAZ, TCA, TCC, PIP, FEP, IMI, MER, GEN, TOB, CIP, PEF, CTZ               | <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> , <i>int1</i>                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | B-519/14P  | AMC, CAZ, TCA, TCC, PIP, FEP, IMI, MER, GEN, TOB, CIP, PEF, CTZ               | <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>                                                                                         |
| <i>P. mirabilis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | B-757M     | CEF, CTA, FEP, TET, TGC, GEN, TOB, CIP, NIT, CM                               | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-244</sub> , <i>int2</i>                                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | B-912/14   | CEF, TET, TGC, CIP, NIT, CM                                                   | <i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>int1</i> , <i>int2</i>                                                                                         |
| <i>S. marcescens</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | B-208/15   | CEF, CTA, FEP, GEN, TOB, CIP, NIT, CM                                         | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub>                                                                                         |
| <i>E. aerogenes</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | B-658/15   | CEF, CEX, CTX, FEP, AZR, GEN, AMI, NET, CTZ                                   | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>int1</i>                                                                           |
| <i>E. coli</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | B-529/15   | AMC, CEF, CTX, CAZ, FEP, CIP, CTZ                                             | <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>                                                                                                                    |
| Примечание – AMC – амоксициллин/клавулановая кислота, AMP – ампициллин, CEF – цефуроксим, CEX – цефокситин, CTX – цефотаксим, CTA – цефтриаксон, CAZ – цефтазидим, TCA – тикарциллин, TCC – тикарциллин/клавулановая кислота, PIP – пиперацillin, FEP – цефепим, EPM – эртапенем, AZR – азтреонам, IMI – имипенем, MER – меропенем, TET – тетрациклин, TGC – тигециклин, CIP – ципрофлоксацин, PEF – пефлоксацин, CM – хлорамфеникол, GEN – гентамицин, TOB – тобрамицин, AMI – амикацин, CTZ – триметоприм/сульфаметоксазол, NET – нетилмицин, NIT – нитрофурантоин; <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub> – гены бета-лактамаз SHV, CTX-M, OXA, NDM, TEM, и VIM типов; <i>int1</i> – интегрон класса 1, <i>int2</i> – интегрон класса 2. |            |                                                                               |                                                                                                                                                   |

Как видно из табл. 5.3, у всех исследованных штаммов было отмечено наличие генетических детерминант антибиотикорезистентности.

При тестировании этих штаммов микроорганизмов к 28 АМП диско-диффузионным методом на МХА-Оболенск были получены значения диаметров зон подавления роста исследованных штаммов совпадающих с контрольной питательной средой (МХА-BBL) практически для всех АМП. Полученные значения отличались максимально на  $\pm 3$  мм, что не влияло на результаты интерпретации в соответствии с клиническими критериями чувствительности (табл. 5.4).

Таблица 5.4 – Результаты определения чувствительности штаммов микроорганизмов, возбудителей ИСМП, к антимикробным препаратам на МХА-Оболенск и МХА-BBL диско-диффузионным методом

| Штаммы микроорганизмов                                                                                                                                                                                              | Количество АМП, шт | Всего проделанных тестов*, шт | Количество совпавших тестов**, шт | Полученные несоответствия                                            |                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                     |                    |                               |                                   | МХА-Оболенск                                                         | МХА-BBL                                                     |
| <i>K. pneumoniae</i> (n=8)                                                                                                                                                                                          | 28                 | 672                           | 669                               | <i>K. pneumoniae</i> В-1969/14 – умеренно-резистентный к миноциклину | <i>K. pneumoniae</i> В-1969/14 – резистентный к миноциклину |
| <i>A. baumannii</i> (n=3)                                                                                                                                                                                           | 28                 | 252                           | 252                               | _***                                                                 | _***                                                        |
| <i>P. aeruginosa</i> (n=2)                                                                                                                                                                                          | 28                 | 168                           | 165                               | <i>P. aeruginosa</i> В-519/14Р – чувствительный к цефтазидиму        | <i>P. aeruginosa</i> В-519/14Р – резистентный к цефтазидиму |
| <i>P. mirabilis</i> (n=2)                                                                                                                                                                                           | 28                 | 168                           | 168                               | _***                                                                 | _***                                                        |
| <i>S. marcescens</i> (n=1)                                                                                                                                                                                          | 28                 | 84                            | 84                                | _***                                                                 | _***                                                        |
| <i>E. aerogenes</i> (n=1)                                                                                                                                                                                           | 28                 | 84                            | 84                                | _***                                                                 | _***                                                        |
| <i>E. coli</i> (n=1)                                                                                                                                                                                                | 28                 | 84                            | 84                                | _***                                                                 | _***                                                        |
| Итого                                                                                                                                                                                                               | 28                 | 1512                          | 1506                              |                                                                      |                                                             |
| Примечание – * - определение чувствительности к каждому АМП выполняли в трех повторах; ** – данные в сравнении с результатами тестов, полученных на контрольной питательной среде; *** – несоответствия не выявлены |                    |                               |                                   |                                                                      |                                                             |

Как видно из табл. 5.4, в 1506 тестах (99,6 %) получили совпадающие результаты, в шести тестах (0,4 %) – результаты не совпадали. Штамм *P. aeruginosa* В-519/14Р классифицирован на МХА-Оболенск как чувствительный,

а на МХА-BBL как устойчивый к цефтазидиму. Штамм *K. pneumoniae* В-1969/14 определен на МХА-Оболенск как умеренно-резистентный, а на контрольной питательной среде (МХА-BBL) как устойчивый к миноциклину. Результаты, полученные на МХА-BBL, совпадали с данными, полученными с помощью Vitek 2 Compact. Методом ПЦР обнаружено наличие генетической детерминанты *bla*<sub>CTX-M</sub> у штамма *P. aeruginosa* В-519/14Р, что, вероятнее всего, свидетельствует об устойчивости данного штамма к цефалоспорином.

### 5.3 Чувствительность клинических штаммов микроорганизмов

При определении чувствительности 147 клинических штаммов, значения диаметров зон подавления роста вокруг АМП на МХА-Оболенск отличались от контрольной питательной среды (МХА-BBL) максимально на (1,5±0,5) мм. Полученные различия не влияли на определение клинических категорий чувствительности, за исключением одного несовпадающего результата (табл. 5.5). Таблица 5.5 – Результаты определения чувствительности клинических штаммов микроорганизмов к антимикробным препаратам на МХА-Оболенск и МХА-BBL

| Клинические штаммы                                                                                                                                                                                              | Количество АМП, шт | Всего проделанных тестов*, шт | Количество совпавших тестов**, шт | Полученные несоответствия                                             |                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                 |                    |                               |                                   | МХА-Оболенск                                                          | МХА-BBL                                                                   |
| <i>K. pneumoniae</i> (n=49)                                                                                                                                                                                     | 28                 | 4116                          | 4116                              | _***                                                                  | _***                                                                      |
| <i>A. baumannii</i> (n=49)                                                                                                                                                                                      | 28                 | 4116                          | 4116                              | _***                                                                  | _***                                                                      |
| <i>S. aureus</i> (n=14)                                                                                                                                                                                         | 8                  | 336                           | 336                               | _***                                                                  | _***                                                                      |
| <i>Enterococcus</i> spp.(n=14)                                                                                                                                                                                  | 9                  | 378                           | 378                               | _***                                                                  | _***                                                                      |
| <i>E. coli</i> (n=12)                                                                                                                                                                                           | 12                 | 432                           | 429                               | <i>E. coli</i> X 623 – устойчивый к амоксициллин/клавулановой кислоте | <i>E. coli</i> X 623 – чувствительный к амоксициллин/клавулановой кислоте |
| <i>P. aeruginosa</i> (n=9)                                                                                                                                                                                      | 11                 | 297                           | 297                               | _***                                                                  | _***                                                                      |
| Итого                                                                                                                                                                                                           | 28                 | 9675                          | 9672                              |                                                                       |                                                                           |
| Примечание – * - определение чувствительности к каждому АМП выполняли в трех повторах; ** - данные в сравнении с результатами тестов на контрольной питательной среде МХА-BBL; *** - несоответствия не выявлены |                    |                               |                                   |                                                                       |                                                                           |

Как видно из табл. 5.5, в 9672 тестах (99,7 %) получили совпадающие результаты, в трех тестах (0,3 %) результаты не совпадали. Штамм *E. coli* X 623 классифицирован на МХА-Оболенск как устойчивый, а на МХА-BBL – как чувствительный к амоксициллин/клавулановой кислоте, что совпадало с результатами, полученными на приборе Vitek 2 Compact.

Таким образом, на разработанной питательной среде проведено 11187 тестов диско-диффузионным методом и 702 теста методом градиентной диффузии, из которых количество совпавших с контрольной питательной средой составило 11178 тестов и 591 тест соответственно.

#### 5.4 Чувствительность штаммов *Photorhabdus* spp.

В работе проводили определение чувствительности нового возбудителя инфекционных болезней – *Photorhabdus* spp., который относится к роду *Morganellaceae*, семейству *Enterobacterales* и включает три вида подвижных, биOLUMИнесцентных, почвенных грамотрицательных бактерий: *P. temperata*, *P. luminescens* и *P. asymbiotica*. Бактерии всех трёх видов – симбионты нематод семейства *Heterorhabditidae*, но *P. asymbiotica*, в отличие от *P. temperata* и *P. luminescens*, являются патогенными для человека и вызывают инфекции мягких тканей и кожных покровов.

В работе впервые систематически изучена чувствительность *Photorhabdus* spp. к 20 АМП диско-диффузионным методом на разработанной питательной среде (МХА-Оболенск) и контрольной питательной среде (МХА-BBL) в соответствии с требованиями стандарта EUCAST. Ранее в отечественных исследованиях, посвященных изучению их чувствительности к АМП, процедура проведения тестирования была не систематизирована. Так, для постановки теста применялись питательные среды, не рекомендованные международными стандартами, например, агар Хоттингера [15, 62], 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  $(25\pm 1)^\circ\text{C}$  и  $(35\pm 1)^\circ\text{C}$ , имитирующих пребывание *Photorhabdus* spp. в организме нематод и человека, а 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 (табл. 5.6).

Таблица 5.6 – Результаты определения чувствительности штаммов *Photorhabdus* spp. к антимикробным препаратам на МХА-Оболensk

[illegible]

Как видно из табл. 5.6, почти все исследованные штаммы при обеих температурах выращивания были 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* Hb<sup>T</sup> был устойчив к ципрофлоксацину, а два штамма *P. luminescens*: Hb<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-BBL, не установлено. Несмотря на то, что температура (25±1) °С является для штаммов *Photorhabdus* spp. более благоприятной для инкубирования, чем (35±1)°С, 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.

## 5.5 Испытания питательной среды методом градиентной диффузии

Для штаммов микроорганизмов, возбудителей ИСМП (табл. 5.3), на разработанной (МХА-Оболensk) и контрольной питательной среде (МХА-BBL) проводили определение значений МПК антимикробных препаратов методом

градиентной диффузии (методом Е-тестов). В ходе исследования проведено по 702 теста на каждой среде (табл. 5.7).

Таблица 5.7 – Оценка значений минимальных подавляющих концентраций антимикробных препаратов, полученных на МХА-Оболенск и МХА-BBL методом градиентной диффузии

| Тест-штаммы                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Всего тестов*, шт | Количество совпавших тестов**, шт | Количество тестов, для которых значение МПК отличалось на одно двукратное разведение (наименования АМП)**, шт | Количество тестов, для которых значение МПК отличалось на два двукратных разведения (наименования АМП)** |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> (n=8)                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 312               | 177                               | 54<br>(AM, CT, TZ, IP, MER, CI, LE, GM, CL)                                                                   | 81<br>(AM, CT, TZ, IP, MER, CI, LE, GM, CL)                                                              |
| <i>A. baumannii</i> (n=3)                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 117               | 69                                | 30<br>(IP, MER, LE, GM, CI)                                                                                   | 18<br>(IP, MER, LE, GM, CI)                                                                              |
| <i>P. aeruginosa</i> (n=2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 78                | 51                                | 15<br>(IP, MER, LE, CI, GM)                                                                                   | 12<br>(GM, IP, MER, TZ)                                                                                  |
| <i>P. mirabilis</i> (n=2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 78                | 60                                | 18<br>(CT, IP, MER, CI, LE, GM)                                                                               | 0                                                                                                        |
| <i>S. marcescens</i> (n=1)                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 39                | 27                                | 12<br>(IP, MER, CI, LE)                                                                                       | 0                                                                                                        |
| <i>E. aerogenes</i> (n=1)                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 39                | 24                                | 15<br>(AM, CT, TZ, IP, MER)                                                                                   | 0                                                                                                        |
| <i>E. coli</i> (n=1)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 39                | 15                                | 24<br>(AM, CT, TZ, GM)                                                                                        | 0                                                                                                        |
| Итого                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 702               | 423                               | 168                                                                                                           | 111                                                                                                      |
| Примечание – * - определение чувствительности к каждому АМП выполняли в трех повторях; ** - данные в сравнении с результатами тестов на контрольной питательной среде. AM – ампициллин, CT – цефотаксим, TZ – цефтазидим, IP – имипенем, MER – меропенем, GM – гентамицин, CI – ципрофлоксацин, LE – левофлоксацин, CL – хлорамфеникол |                   |                                   |                                                                                                               |                                                                                                          |

Как видно из табл. 5.7, значения МПК антимикробных препаратов, полученных на МХА-Оболенск и МХА-BBL, совпадали в 423 тестах (60,2 %), различались на одно двукратное разведение, не выходя за рамки точности метода – в 168 тестах (23,9 %), различались на два двукратных разведения – в 111 тестах (15,8 %). Только один штамм (*K. pneumoniae* В-1969/14) интерпретировали как умеренно-резистентный к доксициклину на МХА-Оболенск и как чувствительный на МХА-BBL. Результаты тестирования данных штаммов на приборе Vitek 2 Compact совпадали с результатами, полученными на разработанной питательной среде (МХА-Оболенск).

## 5.6 Испытания питательной среды при выполнении СИМ-теста

На МХА-Оболенск и МХА-BBL СИМ-тестом тестировали штаммы, продуцирующие карбапенемазы, и оценивали экспериментальные данные по инаktivации карбапенемов клеточными лизатами штаммов-продуцентов карбапенемаз, полученные на двух питательных средах.

Для тестирования использовали штаммы, несущие гены карбапенемаз ОХА-48-типа ( $n=23$ ), ОХА-244-типа ( $n=2$ ), ОХА-40-типа ( $n=16$ ), ОХА-23-типа ( $n=1$ ), NDM-1 ( $n=2$ ) и не имеющие гены карбапенемаз ( $n=8$ ) (табл. 5.8).

Таблица 5.8 – Детекция карбапенемазной активности штаммов, продуцирующих карбапенемазы, CIM-тестом на МХА-Оболенск

| Штамм                                                                                                                                         | Гены карбапенемаз             | Результаты CIM-метода | Штамм                          | Гены карбапенемаз                 | Результаты CIM-метода |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> 410                                                                                                                      | <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>   | Положительный         | <i>K. pneumoniae</i> YKP203    | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>      | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> 409                                                                                                                      | <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>   | Положительный         | <i>K. pneumoniae</i> I-1627    | –                                 | Отрицательный         |
| <i>K. pneumoniae</i> B-352K/15                                                                                                                | <i>bla</i> <sub>OXA-244</sub> | Положительный         | <i>K. pneumoniae</i> I-2135    | –                                 | Отрицательный         |
| <i>K. pneumoniae</i> B-369/15                                                                                                                 | <i>bla</i> <sub>OXA-244</sub> | Положительный         | <i>K. pneumoniae</i> YKP1648   | –                                 | Отрицательный         |
| <i>K. pneumoniae</i> B-1822/14                                                                                                                | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>K. pneumoniae</i> YKP2111   | –                                 | Отрицательный         |
| <i>K. pneumoniae</i> B-1969/14                                                                                                                | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> B-740/14   | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP201                                                                                                                   | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> B-774/15A  | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP202                                                                                                                   | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> B-2137/14A | <i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP200                                                                                                                   | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB43      | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP16                                                                                                                    | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB61      | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP2160                                                                                                                  | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB66      | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP1645                                                                                                                  | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB118     | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP1747                                                                                                                  | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB127     | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP1643                                                                                                                  | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB179     | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP1646                                                                                                                  | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB144     | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP1644                                                                                                                  | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB121     | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP902                                                                                                                   | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB140     | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP533                                                                                                                   | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB220     | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP2395                                                                                                                  | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB224     | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP498                                                                                                                   | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB246     | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP522                                                                                                                   | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB268     | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP87                                                                                                                    | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB56      | <i>bla</i> <sub>OXA-40-like</sub> | Положительный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP669                                                                                                                   | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB199     | –                                 | Отрицательный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP2291                                                                                                                  | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB122     | –                                 | Отрицательный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP1142                                                                                                                  | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB246     | –                                 | Отрицательный         |
| <i>K. pneumoniae</i> YKP178                                                                                                                   | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>  | Положительный         | <i>A. baumannii</i> YAB245     | –                                 | Положительный         |
| Примечание – <i>bla</i> <sub>OXA</sub> и <i>bla</i> <sub>NDM</sub> – гены карбапенемаз OXA- и NDM- типов, «–» - отсутствие гена карбапенемазы |                               |                       |                                |                                   |                       |

Как видно из табл. 5.8, 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 гены 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 разработанной питательной среде (МХА-Оболенск) и контрольной питательной среде (МХА-BBL), не зафиксировано.

Таким образом, разработанная питательная среда (МХА-Оболенск) успешно прошла испытания для диско-диффузионного метода (рисунок 5.1 – Б, В и Г), метода Е-тестов (рисунок 5.1 – А), СИМ-теста и соответствует требованиям EUCAST и ISO/TS 16782:2016.

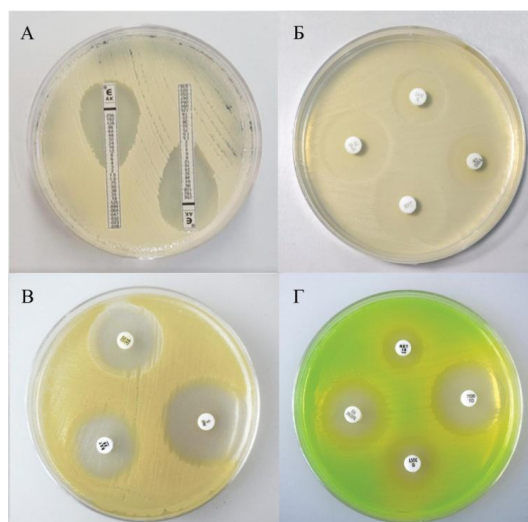


Рисунок 5.1 – Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам разными методами на разработанной питательной среде:

- А) Определение МПК *K. pneumoniae* 409 NDM к амоксициллину при помощи метода градиентной диффузии (Е-тесты); Б) Определение чувствительности *E. coli* X 627 к имипенему, левофлоксацину, триметоприм/сульфаметоксазолу и тигециклину диско-диффузионным методом; В) Определение чувствительности *S. aureus* Д 508 к тетрациклину, триметоприму/сульфаметоксазолу и рифампицину диско-диффузионным методом; Г) Определение чувствительности *P. aeruginosa* X 629 к нетилмицину, меропенему тобрамицину и левофлоксацину диско-диффузионным методом.

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 (регистрационное удостоверение № РЗН 2017/5962 от 10.07.2017 г.) (рис. 5.2).



Рисунок 5.2 – Регистрационное удостоверение на питательную среду для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон)

Цена питательной среды (агар Мюллера-Хинтон), рассчитанная с учётом затрат на сырьё, материалы, амортизационные отчисления и фонд оплаты труда, составляет около  $(5,5 \pm 0,5)$  тыс. рублей за 1 кг, а цена импортных аналогов, в среднем, составляет около  $(11,5 \pm 0,5)$  тыс. рублей за 1 кг [14].

## 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  $(131 \pm 2)^\circ\text{C}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  при значениях pH от 8,5 до 9,0 и ионов  $\text{Zn}^{2+}$  при значениях pH от 11,0 до 12,0.

Определены показатели качества: степень гидролиза  $(75,0 \pm 5)\%$ , значение pH 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 %. Концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в нем составляет от 1,15 мг/г до 1,45 мг/г,  $\text{Mg}^{2+}$  от 0,6 мг/г до 0,7 мг/г,  $\text{Mn}^{2+}$  не более 0,5 мг/г, а  $\text{Zn}^{2+}$  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  $(40,1 \pm 2,7)\%$ , а общих –  $(54,7 \pm 2,5)\%$ . 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 месяца.

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 *Photorhabdus* 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 проведённых 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 (Регистрационное удостоверение № РЗН 2017/5962 от 10.07.2017 г.). С 2017 г. успешно используется в бактериологических лабораториях РФ и является импортозамещающим препаратом для определения антибиотикочувствительности микроорганизмов.

## 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  $(131 \pm 2)$  °C в течение 2 ч; двухстадийную деионизацию на анионообменной смоле до значений pH от 1,9 до 2,0 и от 3,5 до 4,5; обработку активированным углем в двух диапазонах pH для освобождения от тимидина при значении pH от 1,9 до 2,0, для осветления при значении pH от 3,5 до 4,5, для освобождения от ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  при значении pH от 8,5 до 9,0, от ионов  $\text{Zn}^{2+}$  при значении pH 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 pH 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 ( $40,1 \pm 2,7\%$ ) и общих аминокислот ( $54,7 \pm 2,5\%$ ).

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  $\text{Ca}^{+2}$  ( $1,3 \pm 0,15$ ) мг/г и  $\text{Mg}^{+2}$  ( $0,65 \pm 0,05$ ) 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 сульфониламидам – 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 ( $25\pm 1$ ) °C и ( $35\pm 1$ ) °C на чувствительность *P. asymbiotica* US86, US88 и AU46 и *P. luminescens* Нб<sup>Т</sup> к антибиотикам группы пенициллинов (ампициллину, бензилпенициллину и амоксициллину/клавулановой кислоте); обосновано использование температуры ( $35\pm 1$ ) °C 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-Хинотон), 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.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

|             |                                                                                                                                             |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| АМП         | Антимикробные препараты                                                                                                                     |
| ГКПМ        | Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур                                                                    |
| ИСМП        | Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи                                                                                          |
| МПК         | Минимальные подавляющие концентрации                                                                                                        |
| МУК         | Методические указания                                                                                                                       |
| МХА         | Агар Мюллера-Хинтон                                                                                                                         |
| ФБУН ГНЦПМБ | Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»                             |
| СГК         | Солянокислотный гидролизат казеина                                                                                                          |
| ТУ          | Технические условия                                                                                                                         |
| АТСС        | Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection)                                                                   |
| CIM-тест    | Метод инактивации карбапенемаз (carbapenem inactivation method)                                                                             |
| CLSI        | Институт клинических и лабораторных стандартов (clinical and laboratory standards institute)                                                |
| EUCAST      | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам) |
| ISO         | Международная организация по стандартизации (international organization for standardization)                                                |
| S, I, R     | Клинические категории чувствительности: чувствительный (S), умеренно-резистентный (I), устойчивый (R)                                       |

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева, З.М. Сухая среда АГВ для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам / З.М. Андреева, Н.И. Гриднева, Е.А. Ведьмина, Н.И. Гивенталь // Лабораторное дело. – 1978. – V. 6. – P. 332-333.
2. Асланов, М.А. Получение белкового гидролизата из сырья животного происхождения для обогащения продуктов / М.А. Асланов, А.С. Дыдыкин, Н.Е. Солдатова // Пищевая промышленность. – 2018. – № 2. – С. 16-18.
3. Большов, М.А. Проточные методы определения элементов в растворах, основанные на сорбционном концентрировании и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой / М.А. Большов, В.К. Карандашев, Г.И. Цизин, Ю.А. Золотов / Журнал аналитической химии. – 2011. – Т. 66, № 6. – С. 564–581.
4. Васильева, Н.В. Определение чувствительности возбудителей ивазивного кандидоза к флуконазолу с использованием дисков различных производителей / Н.В. Васильева, И.В. Выборнова, Е.Р. Рауш, Т.С. Богомоллова // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 8-11.
5. Воложанская, С.В. Технология получения белковых гидролизатов из гидробионтов электрохимическим способом для производства микробиологических питательных сред: дис. канд. техн. наук: 03.00.23 / С.В. Воложанская. СПб., 2001. – 151 с. Иониты в химической технологии. / Под ред. Б.П. Никольского, П.Г. Романова. – Л.: Химия. – 1982. – 416 с.
6. Гренкова, Т.А. Отечественная виросомальная вакцина. Оценка эффективности и безопасности / Т.А. Гренкова, Е.П. Селькова, Н.В. Гудова // Медицинский совет. – 2015. – № 4. – С. 96-100.

7. Давыдов, Д.С. Национальная стратегия Российской Федерации по предупреждению распространения устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам: трудности и перспективы сдерживания одной из глобальных биологических угроз XXI века / Д.С. Давыдов // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Т. 18, № 1. – С. 50-56.

8. Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам [Электронный ресурс] / EUCAST (дата обр. 20.07.2018).

9. Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Таблицы контрольных точек для интерпретации МПК и диаметров зон [Электронный ресурс] / EUCAST, Version 8.0. – 2018. – URL: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_8.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf) (дата обр. 18.08.2018)

10. Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам [Электронный ресурс] / EUCAST, Version 10.0 2020. – URL: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_10.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf). (дата обр. 15.06.2018)

11. Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Повседневная и расширенная программа внутреннего контроля качества, рекомендованные EUCAST [Электронный ресурс] / EUCAST, Version 8.0. – 2018. – URL: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/QC/v\\_8.0\\_EUCAST\\_QC\\_tables\\_routine\\_and\\_extended\\_QC.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_8.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf) (дата обр. 09.08.2018).

12. Казахская советская энциклопедия / Казахстан. Национальная энциклопедия. – Алматы: Қазақ энциклопедиясы. – 2005. — Т. III.

13. Каталог продукции Conda Pronadisa [Электронный ресурс] <https://www.micro-lab.org/assets/userdata/documents/Инструкции> (дата обр. 11.11.2020).

14. Каталог продукции Germeon [Электронный ресурс] <https://germeon.ru/catalog/item/60501> 2021 (дата обр. 13.09.2021).

15. Киршева, Н.А. Определение строения о-специфических полисахаридных цепей липополисахарида *Photorhabdus asymbiotica subsp. asymbiotica* и устойчивости *Photorhabdus* spp. к полимиксину В / Н.А. Киршева, А.Н. Кондакова, Р.З. Шайхутдинова, С.А. Иванов, Г.М. Титарева, А.С. Шашков, С.В. Дентовская, Ю.А. Книрель, А.П. Анисимов // Современные технологии обеспечения биологической безопасности. – 2011. – С. 191-193.

16. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы in vitro. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 2. Оценка функциональных характеристик изделий для испытания антимикробной чувствительности: ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010. – М.: Национальный стандарт российской федерации, 2010. – 14 с.

17. Козлов, Р.С. Сравнение результатов определения чувствительности к антибиотикам на среде АГВ и агарх Мюллер-Хинтона и изосенситест / Л.С. Страчунский, Д.М. Ливермор, О.У. Стецюк, Е.П. Шаврикова // Антибиотики и химиотерапия. – 1996. – Т. 41, № 10. – С. 22-27.

18. Ласточкина, О.В. Биологические микрочипы – новый уровень лабораторных исследований / О.В. Ласточкина, П.В. Горелов // Аналитика. – 2017. – № 36. – С. 76-86.

19. Лисицына, Е. С. Обнаружение генетических маркеров резистентности к  $\beta$ -лактамам антибиотикам у грамотрицательных микроорганизмов с помощью ПЦР-диагностики / Е.С. Лисицына,

Т.В. Черненко, Е.Н. Ильина, И.В. Лазарева, В.А. Агеев, С.В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – № 60. – С. 17-22.

20. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков № 2675-83. – М. : Министерство здравоохранения СССР, 1983. – 16 с.

21. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания МУК 4.2.2316-08. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. — 67 с.

22. Миронов, А.Ю. Молекулярные механизмы резистентности к  $\beta$ -лактамам патогенов внутрибольничных инфекций / А.Ю. Миронов, И.В. Крапивина, Д.Е. Мудрак, Д.В. Иванов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 1. – С. 39–43.

23. Неклюдов, А.Д. Получение белковых гидролизатов с заданными свойствами / А.Д. Неклюдов, С.М. Навашин // Прикладная биохимия и микробиология. – 1986. – Т. 21, N. 1. – С 3-17.

24. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания (МУК 4.12.1890-04). – М: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

25. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Клинические рекомендации. 206 с. Версия 2018-03. URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf>.

26. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии. – Ж. : Всемирная организация здравоохранения, 1994. – 136 с.

27. Попов, Д. А. Сравнительная характеристика современных методов определения продукции карбапенемаз / Д. А. Попов // Клиническая

микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 125-133.

28. Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки /Межгосударственный стандарт ГОСТ 7636-85. – 1985.

29. Свириденко, Ю.Я. Научно-методические подходы к развитию технологии белковых гидролизатов для специального питания / Я.Ю. Свириденко, Д.С. Мяконосов, Д.В. Абрамов, Е.Г. Овчинников // Пищевая промышленность. – 2017. – № 5. – С. 48-50.

30. Скрыбин, Г.К. Биотехнология / Г.К. Скрыбин, В.К. Ерошин // Под ред. А.А. Баева. – М.: Наука. – 1984. – 232 с.

31. Сроки годности лекарственных средств: Общая фармакопейная статья ОФС.1.1.0009.15. – М: Министерство здравоохранения РФ, 2015.

32. Степчиков, К.А. Белковые гидролизаты. Технология получения и пути использования в кн.: Проблемы парентерального питания / К.А. Степчиков. – Рига: Зинатне. – 1969. – С. 55 – 59.

33. Стецюк, О.У. Сравнение результатов определения чувствительности к антибиотикам грамотрицательных аэробных бактерий диско-диффузионным методом на среде АГВ и агаре Мюллера-Хинтон / О.У. Стецюк, Г.К. Решедько // Лабораторная диагностика. – 2004. – Т. 6, № 2. – С. 155-167.

34. Стецюк, О.У. Среды и диски для определения чувствительности к антибиотикам / О.У. Стецюк // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т. 6, № 3. – С. 290-292.

35. Химическая энциклопедия: В 5 т. Т. 5 / под ред. Н. С. Зефирова. — М.: Большая Российская энциклопедия, 1998. – 783 с.

36. 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. – № 1. – С. 43-48.

37. Adrews, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations / J.M. Adrews // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2001. – Vol. 48, N. 1. – P. 5-16.

38. Ageevets, V.A. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia / V.A. Ageevets, I.V. Partina, E.S. Lisitsyna, E.N. Ilina, Y.V. Lobzin, S.A. Shlyapnikov, S.V. Sidorenko // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2014. – V. 44, N. 2. – P. 152-157.

39. Ahman, J. EUCAST evaluation of 21 brands of Mueller-Hinton dehydrated media for disc diffusion testing / J. Ahman, E. Matuschek, G. Kahlmeter // Clinical Microbiology and Infection. – 2020. – V. 26, N. 10. – P.1-5.

40. Ahman, J. The quality of antimicrobial discs from nine manufacturers – EUCAST evaluations in 2014 and 2017 / J. Ahman, E. Matuschek, G. Kahlmeter // Clinical Microbiology and Infection. – 2019. – V. 25. – P. 346-352.

41. Alos, J.I. Antibiotic resistance: A global crisis / J.I. Alos // Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica. – 2015. – V. 33, N. 10. – P.692-671.

42. Amsler, K. Comparison of Broth Microdilution, Agar Dilution, and Etest for Susceptibility Testing of Doripenem against Gram-Negative and Gram-Positive Pathogens / K. Amsler, C. Santoro, B. Foleno, K. Bush, R. Flamm // Journal of Clinical Microbiology. – 2010. – V. 48, N. 9. – P. 3353-3357.

43. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [Электронный ресурс] / WHO  
[https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/9789241564748\\_eng.pdf](https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/9789241564748_eng.pdf)  
 (дата обр. 19.12.2019 г.)

44. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance Chaired by Jim O'Neill.

December 2014. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. Chaired by Jim O'Neill. May 2016.

45. Bailey, A.L. Multicenter Evaluation of the Etest Gradient Diffusion Method for Ceftolozane-Tazobactam Susceptibility Testing of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* / A.L. Bailey, T. Armstrong, H.-P. Dwivedi, G.A. Denys, J. Hindler, S. Campeau, M. Traczewski, R. Humphries, C.A. Burnham // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2018. – V. 56, N. 9. – P. 717-725.

46. Baltekin, Ö. Antibiotic susceptibility testing in less than 30 min using direct single-cell imaging / Ö. Baltekin, A. Boucharin, E. Tano, D.I. Andersson, J. Elf // *PNAS*. – 2017. – V. 114. – P. 9170-9175.

47. Barry, A.L. Performances of Mueller-Hinton agars prepared by three manufacturers / A.L. Barry, L.J. Effinger // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1974. – V. 62, N. 1. – P. 113-120.

48. Bergeron, M.G. Influence of growth medium and supplement on growth of *Haemophilus influenzae* and on antibacterial activity of several antibiotics / M.G. Bergeron, P. Simard, P. Provencher // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1987. – V. 25, N. 4. – P. 650-655.

49. Blair, J.M. Molecular mechanisms of antibiotic resistance / J.M. Blair, M.A. Webber, A.J. Baylay, D.O. Ogbolu, L.J. Piddock // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – V. 13. – P. 42–51.

50. Brenner, V.C. Influence of Different Media and Bloods on the Results of Diffusion Antibiotic Susceptibility Tests / V.C. Brenner, J.C. Sherris // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1972. – V. 1, N. 2. – P. 116-122.

51. Brogan, D.M. Critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility / D.M. Brogan, E.A. Mossialos // *Global health*. – 2016. – V. 12. – P. 8.

52. Brown, D. F. J. Comparison of antibiotic discs from different sources / D.F.J. Brown, D. Kothari // Journal of clinical pathology. –1975. – V. 28. – P. 779-783.
53. Cantón, R. Etest® versus broth microdilution for ceftaroline MIC determination with *Staphylococcus aureus*: results from PREMIUM, a European multicenter study / R. Cantón, D.M. Livermore, M.I. Morosini, J. Díaz-Regañón, G.M. Rossolini // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2017. – V. 72. – P. 431-436.
54. Carmeli, Y. Ceftazidime-avibactam or best available therapy in patients with ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* complicated urinary tract infections or complicated intra-abdominal infections (REPRISE): a multicenter, pathogen-directed, phase 3 study / Y. Carmeli, J. Armstrong, P.J. Laud // The Lancet Infectious Diseases. – 2016. – V. 16. – P. 661-673.
55. Chapin, K.C. Validation of the Automated Reading and Incubation System with Sensititre Plates for Antimicrobial Susceptibility Testing / K.C. Chapin, M.C. Musgnug // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – V. 41, N. 5. – P. 1951-1956.
56. Christian, G. EUCAST update [Электронный ресурс] / Karolinska Institutet and Karolinska University Hospital. – USA, Carolina, 2020. — URL: [https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/EUCAST\\_Presentations/2020/EUCAST\\_update\\_Gen\\_Comm\\_all\\_presentations.pdf](https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_Presentations/2020/EUCAST_update_Gen_Comm_all_presentations.pdf) (дата обр. 26.08.2020).
57. Clinical and Laboratory Standards Institute / Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. – USA, 2015.
58. Clinical laboratory testing — Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller-Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing: ISO/TS 16782. – 2016. – 30 p.

59. Collins, A. M. A comparison between disk-plate and tube-dilution methods for antibiotic sensitivity testing of bacteria / A.M. Collins, G. Craig, E. Zaiman, T.E. Roy // Canadian journal of public health. Revue canadienne de santé publique. – 1954. – V. 45. – P. 430-439.

60. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Technical recommendations for in vitro susceptibility testing // Clinical Microbiology and Infection. – 1996. – Vol. 2. – P. 11-25.

61. Cooke, P. Different Effects of Zinc Ions on In Vitro Susceptibilities of *Stenotrophomonas maltophilia* to Imipenem and Meropenem / P. Cooke, J. Heritage, K. Kerr, P.M. Hawkey, E. Kenneth // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1996. – V. 40, N. 12. – P. 2909–2910.

62. Costa, S.C.P. The Emerging Human Pathogen *Phototransducibacter* *asymbiotica* is a Facultative Intracellular Bacterium and Induces Apoptosis of Macrophage-Like Cells / S.C.P. Costa, P.A. Girard, M. Brehelin, R. Zumbühl // Infection and Immunity. – 2009. – V. 77, N. 3. – P. 1022-1030.

63. D'Amato, R.F. Calcium and magnesium in Mueller-Hinton agar and their influence on disk diffusion susceptibility results / R.F. D'Amato, C. Thornsberry // Current Microbiology. – 1979. – V. 2. – P. 135–138.

64. D'Amato, R.F. Effect of Calcium and Magnesium Ions on the Susceptibility of *Pseudomonas* Species to Tetracycline, Gentamicin, Polymyxin B, and Carbenicillin / R.F. D'Amato, C. Thornsberry, C.N. Baker, L.A. Kirven // Antimicrobial Agents And Chemotherapy. – 1975. – V. 7, N. 5. – P. 596-600.

65. Daly, J.S. Effect of Zinc Concentration in Mueller-Hinton Agar on Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Imipenem / J.S. Daly, R.A. Dodge, R.H. Glew, D.T. Soja, B.A. Deluca, S. Hebert // Journal of Clinical Microbiology. – 1997. – V. 35, N. 4. – P.1027–1029.

66. Dashti, A. A. Can we rely on one laboratory test in detection of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae*? An evaluation of the Vitek 2 system and comparison with four other detection methods in Kuwait /

A.A. Dashti, M.M. Jadaon, F.M. Habeeb // Journal of Clinical Pathology. – 2009. – V. 62, N. 8. – P. 739-742.

67. Deutsches Institut für Normung. (1999) Medical Microbiology – Susceptibility Testing of Pathogens to Antimicrobial Agents / Berlin: DIN. – 1999. P. 58940-58944.

68. Doumith, M. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter spp.* clinical isolates from the UK / M. Doumith, M.J. Ellington, D.M. Livermore, N. Woodford // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2009. – V. 63. – P. 659-667.

69. Dyatlov, I. Novel blaCTX-M-2-type gene coding extended spectrum beta-lactamase CTX-M-115 discovered in nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates in Russia / I. Dyatlov, E. Astashkin, N. Kartsev, O. Ershova, E. Svetoch, V. Firstova, N. Fursova // Multidisciplinary Approaches for Studying and Combating Microbial Pathogens Ed. A. Mendez-Vilas. Brown Walker Press. Boca Raton. – 2015. – P. 107-110.

70. Ehrenberg, M. Medium-dependent control of the bacterial growth rate. / H. Bremer, P. Dennis // Biochimie. – 2013. – V. 95, N. 4. – P. 643-658.

71. Ellington, M. J. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee / M.J. Ellington, O. Ekelund, F.M. Arestrup, R. Canton, M. Doumith, C. Giske // Clinical Microbiology and Infection. – 2016. – V. 23, N. 1. – P. 2–22.

72. Ereemeev, N. L. Enzymatic hydrolysis of keratin-containing stock for obtaining protein hydrolysates / N.L. Ereemeev, I.V. Nikolaev, I.D. Keruchen'ko, E.V. Stepanova, A.D. Satrutdinov, S.V. Zinov'ev, D.Y. Ismailova, V.P. Khotchenkov, N.V. Tsurikova, A.P. Sinitsyn, V.G. Volik, O.V. Koroleva // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2009. – V. 45, N. 6. – P. 648-655.

73. Espinel-Ingroff, A. International and Multicenter Comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 Broth Microdilution Methods for Testing

Susceptibilities of *Candida* spp. to Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole / A. Espinel-Ingroff, F. Barchiesi, M. Cuenca-Estrella, M.A. Pfaller, M. Rinaldi, J.L. Rodriguez-Tudela, P.E. Verweij // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2005. – V. 43, N. 8. – P. 3884-3889.

74. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2003. – V.9. – P. 1-7.

75. Fei, C. Safety and clinical efficacy of tenvermectin, a novel antiparasitic 16-membered macrocyclic lactone antibiotics / C. Fei, R. She, G. Li, L. Zhang, W. Fan, S. Xia, F. Xue // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2018. – V. 117. – P. 154-160.

76. Fernandez-Mazarrasa, C. High concentrations of manganese in Mueller-Hinton agar increase MICs of tigecycline determined by Etest / C. Fernandez-Mazarrasa, O. Mazarrasa, J. Calvo, A. del Arco, L.J. Martínez-Martínez // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2009. – V. 47, N. 3. – P. 827–829.

77. Fursova, N.K. The spread of blaOXA-48 and blaOXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia / N.K. Fursova, E.I. Astashkin, A.I. Knyazeva, N.N. Kartsev, E.S. Leonova, O.N. Ershova, I.A. Alexandrova, N. V. Kurdyumova, S.Y. Sazikina, N.V. Volozhantsev, E.A. Svetoch, I.A. Dyatlov // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. – 2015. – V. 14, N. 1. – P. 46.

78. Gfeller, K.Y. Rapid biosensor for detection of antibiotic-selective growth of *Escherichia coli* / K.Y. Gfeller, N. Nugaeva, M. Hegner // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71. – P. 2626–2631.

79. Girardello, P.J. Cation concentration variability of four distinct Mueller-Hinton agar brands influences polymyxin B susceptibility results / P.J. Girardello, M. Bispo, T.M. Yamanaka, A.C. Galesa // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – V. 50, N. 7. – P. 2414 –2418.

80. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Электронный ресурс] who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\_Summary\_25Feb-ET\_NM\_WHO.pdf (дата обр. 24.04.2020 г.)

81. Howell, M. Application of a microcalorimetric method for determining drug susceptibility in *Mycobacterium* species / M. Howell, D. Wirz, A.U. Daniels, O. Braissant // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – V. 50. – P. 16–20.

82. Hudzicki, J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol / Hudzicki J. – USA: American Society for Microbiology, 2009. – 23 p.

83. Indiveri, M.C. Suitability of the broth-disk elution test for evaluating susceptibility of obligate anaerobes to trimethoprim-sulfonamides / M.C. Indiveri, D.C. Hirsh // *Journal of Veterinary Diagnostic Inves.* – 1991. – V. 3. – P. 215-217.

84. Jabeen, K. Comparison of double disc and combined disc method for the detection of extended spectrum beta lactamases in *Enterobacteriaceae* / K. Jabeen, A. Zafar, R. Hasan // *Journal Of Pakistan Medical Association*. – 2003. – V. 53, N. 11. – P. 534-540.

85. Jönsson, A. Performance characteristics of newer MIC gradient strip tests compared with the Etest for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* / A. Jönsson, S. Jacobsson, S. Foerster, M.J. Cole, M. Unemo // *Journal Of Pathology, Microbiology And Immunology*. – 2018. – V. 126. – P. 822–827.

86. Jorgensen, J.H. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices / J.H. Jorgensen, M.J. Ferraro // *Clinical Infectious Diseases*. – V. 49. – P. 1749-1755.

87. Joshi, A. Comparison of efficacy of three commercially available antibiotic discs / A. Joshi, V. Iyer, U. Balasubramaniam, A. Kagal, R. Bharadwaj // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2008. – V. 26, N. 2. – P. 160-162.

88. Kabo, G.J. Thermodynamic properties of starch and glucose / G.J. Kabo, O.V. Voitkevich, Y.U. Paulechka // Journal of Chemical Thermodynamics. – 2013. – V. 59. – P. 87-93.
89. Kenny, M.A. Cation Components of Mueller-Hinton Agar Affecting Testing of *Pseudomonas aeruginosa* Susceptibility to Gentamicin / M.A. Kenny, H.M. Pollock, B.H. Minshew, E. Casillas, F.D.Schoenknecht // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1980. – V. 17, N. 1. – P. 55-62.
90. Khan, Z.A. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing / Z.A. Khan, M.F. Siddiqui, S. Park // Diagnostics. – 2019. – V. 9, N. 49. – P. 2-17.
91. Kinnunen, P. Self-Assembled Magnetic Bead Biosensor for Measuring Bacterial Growth and Antimicrobial Susceptibility Testing / P. Kinnunen, B.H. McNaughton, T. Albertson, I. Sinn, S. Mofakham, R. Elbez, D. W. Newton, A. Hunt, R. Kopelman // Small. – 2012. – V. 8. – P. 2477-2482.
92. Knudsen, S.M. Determination of bacterial antibiotic resistance based on osmotic shock response / S.M. Knudsen, M.G. Muhlen, D.B. Schauer, S.R. Manalis // Analytical Chemistry. – 2009. – V. 81. – P. 7087–7090.
93. Koch, A.E. Reversal of the Antimicrobial Activity of Trimethoprim by Thymidine in Commercially Prepared Media / A.E. Koch, J.J. Burchall // Applied Microbiology. – 1971. – V. 22, N. 5. – P. 812–817.
94. Koeth, L. M. A Reference Broth Microdilution Method for Dalbavancin In Vitro Susceptibility Testing of Bacteria that Grow Aerobically / L.M. Koeth, J.M. DiFranco-Fisher, S. McCurdy // Journal of Visualized Experiments. – 2015. – V. 103. – P. 1-8.
95. Larrosa, M.N. From CLSI to EUCAST, a necessary step in Spanish laboratories / M.N. Larrosa, N. Benito, R. Cantón, A. Canut, E. Cercenado, F. Fernández-Cuenca, J. Guinea, A. López-Navas, M.Á. Moreno, A. Oliver, L. Martínez-Martínez // Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. – 2020. – V. 38, N. 2. – P. 79-83.

96. Lo-Ten-Foe, J.R. Comparative Evaluation of the VITEK 2, Disk Diffusion, Etest, Broth Microdilution, and Agar Dilution Susceptibility Testing Methods for Colistin in Clinical Isolates, Including Heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* Strains / J.R. Lo-Ten-Foe, G.A.M. de Smet, M.W.B. Diederer, J.A.J.W. Kluytmans, P.H.J. van Keulen // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2007. – V. 51, N. 10. – P. 3726-3730.
97. Louis, B.R. Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens / B.R. Louis // *Infection Control & Hospital Epidemiology*. – 2010. – P. 7–10.
98. Manyi-Loh, C. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications / C. Manyi-Loh, S. Mamphweli, E. Meyer, A. Okoh // *Molecules*. – 2018. – V. 23, N. 4. – P. 795-843.
99. Matuschek, E. The quality of antimicrobial discs from nine manufacturers – EUCAST evaluations in 2014 and 2017 / E. Matuschek, G. Kahlmeter // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2019. – V. 25. – P. 346-352.
100. Montazeri, E.A. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from burn patients by multiplex PCR / E.A. Montazeri, A.D. Khosravi, A. Jolodar, M. Ghaderpanah, S. Azarpira // *Burns*. – 2015. – V. 41, N. 3. – P. 590-594.
101. Mueller, J.H. Acid Hydrolysates of Casein to replace Peptone in the Preparation of Bacteriological Media / J.H. Mueller, E.R. Johnson // *Journal of Immunology*. – 1941. – V. 40, N. 1. – P. 33-38.
102. Munita, J.M. Mechanisms of Antibiotic Resistance / J.M. Munita, C.A. Arias // *Microbiology Spectrum*. – 2016. – V. 4, N. 2. – P. 1-24.
103. Murray, P.R. Evaluation of Mueller-Hinton Agar for Disk Diffusion Susceptibility Tests / P.R. Murray, J.R. Tenover // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1983. – V. 18, N. 5. – P. 1269-1271.

104. Paterson, D. L. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update / D.L. Paterson, R.A. Bonomo // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2005. – V. 18. – P. 657-686.
105. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved standard 8<sup>th</sup> Edition. NCCLS document M2-A8. NCCLS. – Wayne, PA, USA. – 2003.
106. Pierce, V.M. Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among *Enterobacteriaceae* / V.M. Pierce, P.J. Simner, D.R. Lonsway, D.E. Roe-Carpenter, J.K. Johnson, W.B. Brasso, A.M. Bobenchik, Z.C. Lockett, A. Charnot-Katsikas, M.J. Ferraro, R.B. Thomson, S.G. Jenkins, B.M. Limbago, S. Dasi // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2017. – V. 55, N. 8. – P. 2321-2333.
107. Rodrigo-Troyano, A. The respiratory threat posed by multidrug resistant Gram-negative bacteria / A. Rodrigo-Troyano, O. Sibila // *Respirology*. – 2017. – V. 22. – P. 1288-1299.
108. Saffari, N. A comparison of antibiotic disks from different sources on Quicolor and Mueller-Hinton agar media in evaluation of antibacterial susceptibility testing / N. Saffari, S. Salmanzadeh-Ahrabi, A. Abdi-Ali, M. Rezaei-Hemami // *Iran Journal of Microbiology*. – 2016. – V. 8, N. 5. – P. 307-311.
109. Sanchez, M. L. E test, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiologic application / M.L. Sanchez, R. N. Jones // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 1992. – V. 8. – P. 1–7.
110. Singhal, N. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis / N. Singhal, M. Kumar, P.K. Kanaujia, J.S. Viridi // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – V. 6. – P. 1-16.
111. Sokhey, S.S. Hydrolysate of casein for the preparation of plague and cholera vaccines / S.S. Sokhey, M.K. Habbu, K.H. Bharucha // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1950. – V. 3. – P. 25-31.

112. Song, W. Carbapenem Inactivation Method: Accurate Detection and Easy Interpretation of Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. / W. Song, H.-S. Kim, J.-S. Kim, H.S. Kim, D.H. Shin, S. Shin, M.-J. Park // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. – 2016. – V. 19, N. 4. – P. 83-90.

113. Stone, N. D. Comparison of disk diffusion, VITEK 2, and broth microdilution antimicrobial susceptibility test results for unusual species of *Enterobacteriaceae* / N.D. Stone, C.M. O'Hara, P.P. Williams, J.E. McGowan, F.C. Tenover // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2007. – V. 45, N. 2. – P. 340-346.

114. Strauss, M. Evaluation of Bio-Rad® discs for antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion and the ADAGIO™ system for the automatic reading and interpretation of results / M. Strauss, K. Zoabi, D. Sagas, B. Reznik-Gitlitz, R. Colodner // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious*. – 2020. – V. 39, N. 2. – P. 375-384.

115. Swenson, J.M. Susceptibility Tests for Sulfamethoxazole-Trimethoprim by a Broth Microdilution Procedure / J.M. Swenson, C. Thornsberry // *Current Microbiology*. – 1978. – V. 1. – P. 89–193.

116. Tacconelli, E. ESCMID-EUCIC clinical guidelines on decolonization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria carriers / E. Tacconelli, F. Mazzaferri, A.M. De Smet, D. Bragantini, P. Eggimann, B.D. Huttner, E.J. Kuijper, J.-C. Lucet, N.T. Mutters, M. Sanguinetti, M.J. Schwaber, M. Souli, J. Torre-Cisneros, J.R. Price, J. Rodríguez-Bano // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2019. – V. 25, N. 7. – P. 807-817.

117. Tacconelli, E. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Chair: E. Tacconelli and N. Magrini. – USA, 2019. — URL: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html> (дата обр. 21.09.2020)

118. Tacconelli, E. Surveillance for control of antimicrobial resistance / E. Tacconelli, F. Sifakis, S. Harbarth, R. Schrijver, M. Van Mourik, A. Voss, M. Sharland, N.B. Rajendran, J. Rodríguez-Baño // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2018. – V. 18, N. 3. – P. 99-106.

119. Thamlikitkul, V. Effect of different Mueller–Hinton agars on tigecycline disc diffusion susceptibility for *Acinetobacter* spp. / V. Thamlikitkul, S. Tiengrim // *Jour. of Clinical Microbiology*. – 2008. – V. 62, N. 4. – P. 847–848.

120. Van Der Zwaluw, K. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods / K. Van Der Zwaluw, A. De Haan, G.N. Pluister, H.J. Bootsma, A.J. De Neeling, L.M. Schouls // *PloS One*. – 2015. – V. 10, N. 3. – P. 1-13.

121. Veenemans, J. Effect of manganese in test media on in vitro susceptibility of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* to tigecycline / J. Veenemans, J.W. Mouton, J.A.J.W. Kluytmans, R. Donnelly, C. Verhulst, P.H.J. van Keulen // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – V.50, N. 9. – P. 3077 – 3079.

122. Von, A.U. Isothermal micro calorimetry – a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* / A.U. Von, D. Wirz, A.U. Daniels // *BMC Microbiology*. – 2009. – V. 9. – P.106.

123. Waters the science of what is possible AccQ•Tag, and AccQ•Fluor [Электронный ресурс] / Care and use manual – U.S.A., 2014. – 3 p. – URL: <https://www.manualsdir.com/manuals/575438/waters-accq-tag-ultra-derivatization-kit.html> (дата обр. 04.06.2020)

124. World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series / World Health Organization // Geneva. – 1982. – P. 144-178.

125. World Health Organization. 28<sup>th</sup> report. WHO expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series / World Health Organization // Geneva. – 1977. – V. 610. – P. 1-133.

126. Zimbo, M.J. Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media. Second edition / M.J. Zimbo [et. al.]. – USA: Sparks, 2009. – 700p.

127. Zuravleff, J.J. Effect of Calcium, Magnesium, and Zinc on Ticarcillin and Tobramycin Alone and in Combination Against *Pseudomonas aeruginosa* / J.J. Zuravleff, V.L. Yu, R.B. Yee, M.K. Zaphyr, W. Diven, F.B. Taylor // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1982. – V. 22, N. 5. – P. 893-843.

128. Zwaluw, K. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods / K. Zwaluw, A. Haan, G.N. Pluister, H.J. Bootsma, A.J. Neeling, L.M. Schouls // PLOS One. – 2015. – V. 10, N. 3. – P. 1-13.

## ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### В изданиях, рекомендованных ВАК:

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.

### Патент на изобретение:

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); опуб.19.04.2021.–Бюл.№ 11. – 17с.

### В других изданиях:

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.

### В сборниках трудов конференций:

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 производствапечатный / **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 – *Photorhabdus* 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 антибиотикочувствительности 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 антибиотикочувствительности 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 РИСУНКОВ**

|     |                                                                                                                                                      |     |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.1 | Схема постановки диско-диффузионного метода                                                                                                          | 22  |
| 3.1 | Технологическая схема производства солянокислотного гидролизата казеина                                                                              | 80  |
| 3.2 | Профиль молекулярно-массового распределения пептидных фракций в солянокислотном гидролизате казеина                                                  | 85  |
| 3.3 | Содержание общих (а) и свободных (б) аминокислот в солянокислотном гидролизате казеина (СГК) и казаминовых кислотах технических (ККТ), %             | 85  |
| 5.1 | Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам на разработанной питательной среде разными методами                          | 113 |
| 5.2 | Регистрационное удостоверение на питательную среду для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон) | 114 |

## СПИСОК ТАБЛИЦ

|     |                                                                                                                                                                                                                      |    |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 | Тест-штаммы, рекомендуемые стандартами CLSI и EUCAST для внутрилабораторного контроля качества                                                                                                                       | 33 |
| 1.2 | Состав питательных сред для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам                                                                                                                  | 39 |
| 1.3 | Содержание ионов $\text{Ca}^{2+}$ и $\text{Mg}^{2+}$ в мясном экстракте и крахмале растворимом                                                                                                                       | 44 |
| 3.1 | Физико-химические показатели качества гидролизатов казеина                                                                                                                                                           | 65 |
| 3.2 | Элементный состав экспериментальных вариантов питательной среды и контрольной питательной среды                                                                                                                      | 68 |
| 3.3 | Элементный состав крахмалов растворимых, мясных экстрактов и агаров бактериологических, входящих в состав экспериментальных вариантов питательной среды                                                              | 69 |
| 3.4 | Элементный состав кислотных гидролизатов казеина, входящих в состав экспериментальных вариантов питательной среды                                                                                                    | 69 |
| 3.5 | Влияние режима деионизации солянокислотного гидролизата казеина на содержание хлор-ионов                                                                                                                             | 72 |
| 3.6 | Влияние значений pH при обработке солянокислотного гидролизата казеина активированным углем на величину диаметров зон подавления роста <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 вокруг диска с триметопримом/сульфаметоксазолом | 73 |
| 3.7 | Значения диаметров зон подавления роста <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 вокруг диска с гентамицином, полученных на экспериментальных вариантах                                                                       | 75 |
| 3.8 | Значения диаметров зон подавления роста <i>E. coli</i> ATCC 25922 вокруг диска с тигециклином, полученных на экспериментальных вариантах                                                                             | 76 |

|      |                                                                                                                                                                                          |     |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.9  | Значения диаметров зон подавления роста <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 вокруг диска с имипенемом, полученных на экспериментальных вариантах                                             | 77  |
| 3.10 | Физико-химические показатели качества солянокислотного гидролизата казеина на каждой стадии его получения                                                                                | 82  |
| 3.11 | Изменение элементного состава солянокислотного гидролизата казеина на каждой стадии производства                                                                                         | 82  |
| 3.12 | Элементный состав солянокислотного гидролизата казеина и казаминовых кислот технических (расчетная концентрация)                                                                         | 84  |
| 4.1  | Состав разработанной питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам                                                                       | 88  |
| 4.2  | Физико-химические показатели качества опытно-промышленных серий питательной среды                                                                                                        | 89  |
| 4.3  | Значения диаметров зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов вокруг дисков с антимикробными препаратами на опытно-промышленных сериях питательной среды                          | 91  |
| 5.1  | Оценка диаметров зон подавления роста тест-штаммов <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 и <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 относительно допустимых и целевых значений | 99  |
| 5.2  | Элементный состав питательных сред восьми фирм-производителей                                                                                                                            | 101 |
| 5.3  | Характеристика штаммов микроорганизмов, возбудителей ИСМП, использованных для тестирования МХА-Оболенск                                                                                  | 103 |
| 5.4  | Результаты определения чувствительности штаммов микроорганизмов, возбудителей ИСМП, к антимикробным препаратам на МХА-Оболенск и МХА-BBL диско-диффузионным методом                      | 104 |

|     |                                                                                                                                                  |     |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.5 | Результаты определения чувствительности клинических штаммов микроорганизмов к антимикробным препаратам на МХА-Оболенск и МХА-BBL                 | 105 |
| 5.6 | Результаты определения чувствительности клинических штаммов микроорганизмов к антимикробным препаратам на МХА-Оболенск и МХА-BBL                 | 108 |
| 5.7 | Оценка значений минимальных подавляющих концентраций антимикробных препаратов, полученных на МХА-Оболенск и МХА-BBL методом градиентной диффузии | 110 |
| 5.8 | Оценка значений минимальных подавляющих концентраций антимикробных препаратов, полученных на МХА-Оболенск и МХА-BBL методом градиентной диффузии | 112 |

## Приложение А

Регистрационное удостоверение на разработанную питательную среду  
(МХА-Оболенск)



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАРОВООХРАНЕНИЯ**  
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ  
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**  
от 10 июля 2017 года № РЗН 2017/5962

На медицинское изделие  
Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов  
к антибактериальным препаратам, сухая (агар Мюллера-Хинтон II)  
по ТУ 9385-227-78095326-2015

Настоящее регистрационное удостоверение выдано  
Федеральное бюджетное учреждение науки "Государственный научный  
центр прикладной микробиологии и биотехнологии" Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека  
(ФБУН ГНЦ ПМБ), Россия, 142279, Московская область, Серпуховский район,  
пос. Оболенск

Производитель  
Федеральное бюджетное учреждение науки "Государственный научный  
центр прикладной микробиологии и биотехнологии" Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека  
(ФБУН ГНЦ ПМБ), Россия, 142279, Московская область, Серпуховский район,  
пос. Оболенск

Место производства медицинского изделия  
ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия, 142279, Московская область, Серпуховский район,  
пос. Оболенск

Номер регистрационного досье № РД-11838/35367 от 20.06.2016

Вид медицинского изделия 211270

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 26

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической  
деятельности 20.59.52.140

приказом Росздравнадзора от 10 июля 2017 года № 6232  
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения

М.А. Мурашко

0024980

Рисунок А. – Регистрационное удостоверение № РЗН 2017/5962