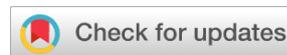


Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-576>



Использование отечественного бульона Мюллера–Хинтон для исследования антибиотикочувствительности клинических штаммов микроорганизмов

Косилова И.С.[✉], Домотенко Л.В., Храмов М.В.

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия

Аннотация

Введение. Одна из причин распространения микроорганизмов, устойчивых к антимикробным препаратам (АМП), связана с бесконтрольным употреблением и неадекватным эмпирическим назначением антибиотиков, не основанным на результатах определения чувствительности возбудителя к ним. Метод разведений в бульоне и один из вариантов его исполнения — референтный метод микроразведений, в отличие от диско-диффузионного метода, позволяет тестировать практически все комбинации патоген–антибиотик. Для выполнения метода в рамках программы импортозамещения разработана технология производства отечественного бульона Мюллера–Хинтон (МХБ-Оболенск).

Цель исследования — оценить качество разработанного отечественного бульона МХБ-Оболенск в сравнительных испытаниях с импортным аналогом МХБ-BD («BD BBL») при тестировании клинических штаммов микроорганизмов, включая комбинации микроорганизм–АМП, которые нельзя достоверно исследовать диско-диффузионным методом.

Материалы и методы. В работе исследовали чувствительность 47 клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий к АМП различных функциональных групп методом микроразведений в бульонах МХБ-Оболенск и МХБ-BD.

Результаты. Значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков для клинических штаммов, полученные на разработанной и контрольной средах, между собой практически не отличались или отличались на +/- 1 разведение. Отличие на 2 двукратных разведения отмечено при тестировании комбинаций *Enterococcus faecium*–ампициллин, *Klebsiella pneumoniae*–меропенем, *Pseudomonas aeruginosa*–левофлоксацин и *Staphylococcus aureus*–ципрофлоксацин. Для двух первых комбинаций значения МПК на МХБ-Оболенск были ниже, а для двух последних — выше, чем на МХБ-BD. Полученные различия не отразились на клинических категориях чувствительности.

Заключение. На разработанном отечественном бульоне МХБ-Оболенск получены антибиотикограммы для клинических штаммов микроорганизмов, которые не отличались от их антибиотикограмм на контрольной среде. МХБ-Оболенск соответствует требованиям национальных и международных стандартов и с помощью него можно достоверно тестировать в том числе актуальные комбинации пар микроорганизм–АМП, которые нельзя исследовать диско-диффузионным методом.

Ключевые слова: бульон Мюллера–Хинтон, импортозамещение, метод микроразведений в бульоне

Этическое утверждение. В исследовании использованы только музейные штаммы микроорганизмов, поэтому не требуется представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Косилова И.С., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Использование отечественного бульона Мюллера–Хинтон для исследования антибиотикочувствительности клинических штаммов микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(6):820–827.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-576>

EDN: <https://www.elibrary.ru/rwetuo>

Analysis of antibiotic sensitivity of clinical strains of microorganisms with the Russian Mueller–Hinton broth

Irina S. Kosilova[✉], Lyubov V. Domotenko, Mikhail V. Khramov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

Abstract

Introduction. One of the reasons for spreading antibiotic-resistant microorganisms is the uncontrolled use and inadequate empirical prescription of antibiotics which is not based on the results of the pathogen sensitivity testing. The broth dilution method and one of its implementation options, the reference microdilution method, in contrast to the disk diffusion method, allows testing virtually all pathogen-antibiotic combinations. To realize the method, a production technology of Russian Mueller–Hinton broth (MHB-Obolensk) has been developed under the import substitution program.

The aim. To evaluate the quality of the developed domestic Mueller–Hinton broth in comparative tests with its imported analog BD BBL (MHB-BD) in testing clinical strains of microorganisms, including microorganism–antibiotic combinations pairs which cannot be reliably investigated by the disc diffusion method.

Materials and methods. The study investigated the sensitivity of 47 clinical strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria to antibiotics of various functional groups using the broth microdilution method with MHB-Obolensk and MHB-BD.

Results. The MICs values of antibiotics for clinical strains obtained with the developed and control media did not practically differ from each other or differed by +/- one dilution. The difference by two two-fold dilutions was noted when testing *Enterococcus faecium*–ampicillin, *Klebsiella pneumoniae*–meropenem, *Pseudomonas aeruginosa*–levofloxacin and *Staphylococcus aureus*–ciprofloxacin combinations. For the first two combinations, the MIC values were lower in MHB-Obolensk, and for the last two, they were higher than in MHB-BD. The differences obtained did not affect the clinical categories of sensitivity.

Conclusion. The antibiograms of clinical strains in developed Russian Mueller–Hinton broth was obtained, which did not differ from those for the comparison medium. MHB-Obolensk complies with the requirements of national and international standards and can be used to reliably test, among other things, current combinations of microorganism–antibiotic pairs that cannot be studied using the disk diffusion method.

Keywords: *Mueller–Hinton broth, import substitution program, broth microdilution method.*

Ethics approval. Only museum strains of microorganisms were used in the study; therefore, no biomedical ethics committee opinion or other documents are required to be submitted.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest relating to the publication of this article.

For citation: Kosilova I.S., Domotenko L.V., Khramov M.V. Analysis of antibiotic sensitivity of clinical strains of microorganisms with the Russian Mueller–Hinton broth *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2024;101(6):820–827.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-576>

EDN: <https://www.elibrary.ru/rwetuo>

Введение

Масштабное распространение бактерий, устойчивых к различным группам антибиотиков, продолжает оставаться глобальной проблемой здравоохранения во всём мире [1]. Наибольшее количество случаев устойчивости — среди инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, включая *Acinetobacter baumannii*, представителей семейства *Enterobacteriales*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и др. [2]. По оценкам экспертов, только за 2019 г. в мире выявлено около 5 млн случаев смертей, вызванных бактериями, устойчивыми к антибиотикам [3], включая туберку-

лёз с множественной лекарственной устойчивостью или устойчивостью к рифампицину¹.

Пандемия COVID-19 усугубила существующее глобальное бремя антибиотикорезистентности, главным образом, из-за неправильного и чрезмерного использования антибиотиков [5].

Ситуация с растущей угрозой устойчивости к антибиотикам осложняется из-за существенного снижения числа разработок новых антимикробных

¹ Tuberculosis: Multidrug-resistant (MDR-TB) or rifampicin-resistant TB (RR-TB). 2024. URL: [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/tuberculosis-multidrug-resistant-tuberculosis-\(mdr-tb\)](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/tuberculosis-multidrug-resistant-tuberculosis-(mdr-tb))

препаратов (АМП), что обусловлено длительностью процедуры от разработки до внедрения, высокой стоимостью и низкой окупаемостью затрат. В настоящее время требуется около 10–15 лет для продвижения антибиотика-кандидата от доклинической до клинической стадии испытаний [6]. Учитывая критическую необходимость в новых антибиотиках, в 2017 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала список резистентных бактерий, представляющих наибольшую опасность жизни и здоровью людей², в 2024 г. вышел обновлённый список³. В обновлённом списке исключены 5 комбинаций патоген–антибиотик (*Helicobacter pylori*, устойчивая к кларитромицину; *Campylobacter* spp., устойчивый к фторхинолонам; *Streptococcus pneumoniae*, устойчивый к пенициллину; *Providencia* spp., устойчивая к цефалоспоринолону третьего поколения; *S. aureus*, устойчивый к ванкомицину), которые содержались в списке 2017 г., и добавлены 4 новые комбинации бактерия–антибиотик: *Streptococcus group A*, устойчивый к макролидам; *Streptococcus group B*, устойчивый к пенициллину; *S. pneumoniae*, устойчивый к макролидам; *Mycobacterium tuberculosis*, устойчивая к рифампицину. *P. aeruginosa*, устойчивая к карбапенемам, перешла из группы критического уровня приоритетности в группу высокого уровня приоритетности в связи с сообщениями о снижении её глобальной устойчивости к антибактериальным препаратам.

Ещё одна причина появления микроорганизмов, устойчивых к АМП, связана с бесконтрольным и необоснованным использованием антибиотиков, а также неадекватным эмпирическим назначением антибиотиков без учёта результатов определения чувствительности к ним. В настоящее время самым распространённым методом определения чувствительности микроорганизмов остается диско-диффузионный метод. Он прост в выполнении и не требует дорогостоящего оборудования. Однако некоторые комбинации микроорганизм–АМП нельзя достоверно тестировать данным методом, что может привести к неправильному назначению схем лечения и ещё больше усугубить ситуацию с распространением антибиотикорезистентности.

Таких ограничений лишён метод разведений в бульоне и особенно один из вариантов его исполнения — метод микроразведений, который признан референтным. Это количественный метод, применение которого позволяет определять значения

минимальных подавляющих концентраций (МПК) АМП, наиболее точно отражающие антимикробный эффект *in vitro* и необходимые для оптимизации режима дозирования АМП⁴.

Метод позволяет тестировать такие комбинации микроорганизм–антибиотик, которые нельзя достоверно исследовать диско-диффузионным методом и часть из которых входит в список ВОЗ: *Salmonella* spp., устойчивая к ципрофлоксацину; *Neisseria gonorrhoeae*, устойчивая к цефалоспоринолам и фторхинолонам; *S. pneumoniae* и стрептококки группы А, устойчивые к макролидам (азитромицину, кларитромицину и рокситромицину в случае устойчивости к эритромицину); небрюшнотифозные сальмонеллы, устойчивые к фторхинолонам (ципрофлоксацину), и др.

Для постановки метода рекомендуется использовать бульон Мюллера–Хинтон (МХБ), стандартизованный по содержанию ионов двухвалентных металлов, тимидина и значению рН из-за их влияния на активность некоторых антибиотиков. До недавнего времени промышленное производство МХБ в России отсутствовало, а сложившаяся ситуация с введением экономических санкций в отношении нашей страны привела к ограничению экспорта продукции для проведения микробиологических исследований. В связи с этим в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии разработана технология производства и налажен промышленный выпуск МХБ (РУ № РЗН 2023/21584 от 29.11.2023). Бульон апробирован на расширенном наборе тест-штаммов и АМП, а данное исследование посвящено изучению возможности его применения при тестировании клинических штаммов микроорганизмов.

Цель исследования — оценить качество разработанного отечественного МХБ в сравнительных испытаниях с импортным аналогом при тестировании грамотрицательных и грамположительных клинических штаммов микроорганизмов, включая актуальные комбинации пар микроорганизм–АМП, которые нельзя достоверно исследовать диско-диффузионным методом.

Материалы и методы

Питательные среды

В работе использовали МХБ производства ГНЦ ПМБ (МХБ-Оболensk; кат. № О-282-К-1),

² WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. URL: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

³ WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. 2024. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

⁴ ГОСТ Р ИСО 20776-1. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод микроразведений в бульоне для лабораторного исследования активности антимикробных агентов по отношению к быстрорастущим аэробным бактериям, вызывающим инфекционные заболевания. М.; 2022. 24 с.

а также МХБ производства «BD BBL» (МХБ-BD; кат. № 212322) в качестве контрольной среды. При тестировании прихотливых микроорганизмов в бульоны добавляли 5% лизированной лошадиной крови и 20 мг/л β -NAD («Sigma-Aldrich», кат. № N8535). Лизированную лошадиную кровь готовили из дефибрированной лошадиной крови («Эколаб»), для чего в дефибрированную лошадиную кровь добавляли стерильную деионизированную воду в соотношении 1 : 1, помещали в морозильную камеру на 8 ± 1 ч при -20°C . Затем размороженную при комнатной температуре кровь повторно подвергали замораживанию/оттаиванию, повторяя данный цикл 4 раза до полного лизиса кровяных клеток. После этого лизированную лошадиную кровь осветляли центрифугированием при 7000 об/с в течение 30 мин на центрифуге «Eppendorf Centrifuge 5702».

Исследуемые штаммы микроорганизмов

В работе тестировали штаммы микроорганизмов, находящиеся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ-Оболensk):

- 44 клинических штамма микроорганизмов, ранее выделенных от пациентов, находившихся на лечении в стационаре Областной инфекционной клинической больницы Ярославской области и депонированных в ГКПМ-Оболensk: 14 штаммов *K. pneumoniae*, 8 штаммов *P. aeruginosa*, 4 штамма *A. baumannii*, 7 штаммов *Staphylococcus* spp. (*S. aureus* — 6, *S. epidermidis* — 1), 7 штаммов *Enterococcus* spp. (*E. faecium* — 4, *E. faecalis* — 1, *E. casseliflavus* — 1, *E. gallinarum* — 1), 2 штамма *Escherichia coli*, 1 штамм *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, 1 штамм *Morganella morganii*;
- 3 штамма кампилобактерий, выделенных из помета птиц фермерского хозяйства в Московской области и депонированных в ГКПМ-Оболensk (*C. jejuni* — 2, *C. coli* — 1);
- 5 тест-штаммов, используемых для повседневного контроля качества постановки тестирования и исследуемых в работе бульонов: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212 и *C. jejuni* ATCC 33560.

Антимикробные препараты

В работе использовали субстанции АМП и лекарственных препаратов: амикацин (кат. № A1774), ампициллин (кат. № A9393), ванкомицин (кат. № 94747), гентамицин (кат. № G3632), имипенем (кат. № I0160), колистин (кат. № C4461), левофлоксацин (кат. № 28266), линезолид (кат. № PHR1885), меропенем (кат. № PHR1772), тетрациклин (кат. № T8032), тигециклин (кат. № PZ0021), триметоприм (кат. № T7883), цефтазидим (кат. № PHR1847),

ципрофлоксацин (кат. № 17850), эритромицин (кат. № E6376), сульфаметоксазол (кат. № S7507) — все производства «Sigma-Aldrich».

Метод микроразведений в бульоне

Постановку метода проводили с использованием 96-луночного планшета в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 20776-1⁴, а также актуальных версий EUCAST и Российских рекомендаций по определению чувствительности микроорганизмов к АМП⁵. По полученным значениям МПК определяли категории чувствительности штаммов: S (чувствительные при стандартном режиме дозирования), R (резистентные), I (чувствительные при увеличенной экспозиции АМП). Тестирование всех комбинаций микроорганизм–АМП проводили в 3 повторностях.

Физико-химические показатели качества питательных сред

Физико-химические показатели качества бульонов (содержание аминного азота, содержание хлоридов в пересчёте на NaCl и потерю в массе при высушивании) определяли в соответствии с МУК 4.2.2316-08⁶. Содержание ионов кальция (Ca^{2+}), магния (Mg^{2+}), марганца (Mn^{2+}) и цинка (Zn^{2+}) определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на плазменном спектрометре «iCAP-6500 Duo» («Thermo Scientific») в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 27085-2012⁷.

Содержание тимидина оценивали косвенным методом путём определения значения МПК триметоприма/сульфаметоксазола при исследовании контрольного штамма *E. faecalis* ATCC 29212. Получение МПК $\leq 0,5/9,5$ мг/л свидетельствовало о допустимой концентрации тимидина в бульоне менее 0,03 мг/л⁸.

⁵ European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). URL: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_14.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf; Российские рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2024-02). КМАХ. 2024;26(2). URL: <https://microbius.ru/library/rossiyskie-rekomendatsii-opredelenie-chuvstvitelnosti-mikroorganizmov-k-antimikrobnym-preparatam>

⁶ МУК 4.2.2316-08. 4.2. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. М.; 2008.

⁷ ГОСТ Р ИСО 27085-2012. Корма для животных. Определение содержания кальция, натрия, фосфора, магния, калия, железа, цинка, меди, марганца, кобальта, молибдена, мышьяка, свинца и кадмия методом ИСП – АЭС. М.; 2014.

⁸ ГОСТ Р 59786-2021/ISO/TS 16782:2016. Клинические лабораторные исследования. Критерии приемлемости партий дегидратированных агара и бульона Мюллера–Хинтон, применяемых для оценки чувствительности к антибиотикам. М.; 2021. 30 с.

Статистические методы

Результаты обрабатывали при помощи пакета программ «MS Excel». Достоверность различных средних величин оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. В сравнительном анализе использовали двусторонний критерий Фишера, уровень значимости $p < 0,05$.

Для тест-штаммов микроорганизмов полученные значения МПК антибиотиков сравнивали с целевыми значениями и допустимыми диапазонами. Полученные результаты в соответствии с ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010⁹ представляли в следующих оценочных категориях:

- С — среднее значение соответствует целевому значению;
- Н — High, среднее значение выше целевого на 1 двукратное разведение;
- L — Low, среднее значение ниже целевого на 1 двукратное разведение;
- VH — Very high, среднее значение выше целевого на 2 двукратных разведения, но находится в диапазоне допустимых значений;
- VL — Very low, среднее значение ниже целевого на 2 двукратных разведения, но находится в диапазоне допустимых значений;
- LE — Low error, среднее значение меньше нижнего допустимого;
- HE — High error, среднее значение больше верхнего допустимого.

Результаты

Перед началом исследования проводили контроль качества МХБ-Оболенск с использованием контрольных штаммов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *C. jejuni* ATCC 33560 и антибиотиков, результаты определения чувствительности к которым зависят от качества используемого МХБ [9–11]. При выборе антибиотиков исходили из следующих требований стандартов: для получения достоверных результатов тестирования чувствительности к тетрациклинам, пенициллинам, аминогликозидам, макролидам и фторхинолонам рекомендовано использовать МХБ с оптимальным значением рН 7,2–7,4. Для аминогликозидов, тетрациклинов и фторхинолонов среда должна быть строго сбалансирована по содержанию ионов кальция и магния, для тигециклина и карбапенемов — по концентрации ионов марганца и цинка соответственно, а для сульфаниламидных препаратов критической явля-

ется концентрация тимидина в бульоне.

В ходе контроля качества на МХБ-Оболенск получены значения МПК антибиотиков, которые были отнесены к категории С в 84,4% случаев. К категории Н отнесены полученные значения МПК антибиотиков в 8,0% случаев, а в остальных 7,6% случаев полученные значения МПК были квалифицированы как L. Значений, отнесённых к категориям VH, VL, LE и HE, в ходе исследования не получено. Значения МПК антибиотиков для тест-штаммов, определённые на контрольной среде МХБ-BD, также не выходили за рамки допустимых интервалов. Полученные результаты свидетельствовали о высоком качестве проанализированных питательных сред и о возможности их использования для исследования клинических штаммов.

При дальнейшем исследовании на разработанном и контрольном бульонах изучена чувствительность представителей *Enterobacteriales* (*K. pneumoniae*, *E. coli* и *M. morgani*) к имипенему, меропенему, цефтазидиму, левофлоксацину, ципрофлоксацину, ампициллину, колистину, гентамицину и триметоприму/сульфаметоксазолу, а *E. coli* — дополнительно к тигециклину, *P. aeruginosa* — к имипенему, меропенему, цефтазидиму, левофлоксацину, ципрофлоксацину и колистину, *A. baumannii* — к имипенему, меропенему, левофлоксацину, ципрофлоксацину, колистину гентамицину, *Campylobacter* spp. — к ципрофлоксацину, тетрациклину и эритромицину, *Staphylococcus* spp. — к левофлоксацину, ципрофлоксацину, линезолиду, ванкомицину, тетрациклину, гентамицину, эритромицину, тигециклину и триметоприму/сульфаметоксазолу, *Enterococcus* spp. — к имипенему, левофлоксацину, ципрофлоксацину, линезолиду, ванкомицину, ампициллину и тигециклину, *C. pseudodiphtheriticum* — к ципрофлоксацину, линезолиду, ванкомицину и тетрациклину.

Значения МПК антибиотиков, полученные на МХБ-Оболенск и контрольном МХБ-BD, между собой практически совпадали. При тестировании 8 комбинаций АМП-микроорганизм отмечены различия МПК на 1 двукратное разведение. Для 4 комбинаций на МХБ-Оболенск они превышали значения на контрольном бульоне и составили для меропенема 0,12 мг/л против 0,06 мг/л в отношении *K. pneumoniae* 16, для имипенема — 0,06 мг/л против 0,03 мг/л в отношении *K. pneumoniae* 203, для цефтазидима — 0,25 мг/л против 0,125 мг/л в отношении *E. coli* 1169/70, для левофлоксацина — 0,06 мг/л против 0,03 мг/л в отношении *A. baumannii* 494 к левофлоксацину. Для 4 комбинаций они, напротив, были ниже и составили для левофлоксацина 0,03 мг/л против 0,06 мг/л на контрольном бульоне в отношении *E. faecalis* 2211406, для тетрациклина — 16,0 мг/л против 32 мг/л в отношении *C. jejuni* F-2, для колистина — 0,25 мг/л против 0,5 мг/л в отношении *K. pneumoniae* 1643, для ванкоми-

⁹ ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010. 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.

цина — 0,03 мг/л против 0,06 мг/л в отношении *S. aureus* 2202263.

Отличия между двумя МХБ в результатах МПК на 2 двукратных разведения отмечены при тестировании 4 комбинаций: *K. pneumoniae* 1142—меропенем, *P. aeruginosa* 265—левофлоксацин, *S. aureus* 2202309—ципрофлоксацин и *E. faecium* 613—ампициллин. При этом на МХБ-Оболенск значения МПК левофлоксацина и цiproфлоксацина, равные оба и 0,12 мг/л, были выше, чем на контрольном бульоне (0,03 и 0,03 мг/л), а МПК меропенема и ампициллина, равное 0,06 и 0,03 мг/л соответственно, были ниже, чем на МХБ-ВД (0,016 и 0,008 мг/л).

Вместе с тем полученные различия в МПК не повлияли на оценку клинических категорий чувствительности исследованных клинических штаммов. Результаты тестирования чувствительности к АМП (в клинических категориях чувствительности) для 44 клинических штаммов микроорганизмов и 3 штаммов кампилобактерий, выделенных от сельскохозяйственных птиц, представлены в **таблице**.

Все исследуемые в работе штаммы *K. pneumoniae* в основном чувствительны при стандартном режиме дозирования к протестированным антибиотикам. Один штамм был устойчивым к цефтазидиму и цiproфлоксацину, 2 — к ампициллину, 3 — к гентамицину. Оба штамма *E. coli* оказались чувствительными при стандартном режиме дозирования к имипенему, меропенему, цефтазидиму, левофлоксацину, ампициллину, тигециклину и триметоприму/сульфаметоксазолу. Один из них проявил устойчивость к цiproфлоксацину, колистину и гентамицину, а второй к этим АМП был чувствителен. Штамм *M. morgani* интерпретирован как чувствительный при стандартном режиме дозирования к имипенему, меропенему, цефтазидиму, левофлоксацину, цiproфлоксацину, ампициллину, колистину и триметоприму/сульфаметоксазолу, но устойчивый к гентамицину.

Анализ антибиотикограммы штаммов *P. aeruginosa* показал, что они чувствительны к меропенему, а при увеличенной экспозиции АМП также чувствительны к имипенему, цефтазидиму, левофлоксацину и цiproфлоксацину. Один из 8 протестированных штаммов псевдомонад проявил устойчивость к колистину, а 7 остальных — чувствительность к нему.

Штаммы *A. baumannii* чувствительны к имипенему, меропенему, левофлоксацину и колистину, а к цiproфлоксацину — при увеличенной экспозиции АМП. К гентамицину только 1 штамм был чувствителен, а остальные проявили устойчивость, как и все 4 протестированных штамма к триметоприму/сульфаметоксазолу.

Один штамм кампилобактерий проявил устойчивость к цiproфлоксацину, тетрациклину и эритромицину, два других — чувствительность к те-

трациклину и эритромицину и чувствительность, но при увеличенной экспозиции, к цiproфлоксацину.

Все исследованные грамположительные штаммы *Staphylococcus* spp. и *Enterococcus* spp. чувствительны к линезолиду. В отношении левофлоксацина и цiproфлоксацина все штаммы *Staphylococcus* spp. интерпретированы как чувствительные при увеличенной экспозиции АМП, а в отношении ванкомицина и тигециклина — как чувствительные при стандартном режиме дозирования. Один из 7 протестированных штаммов стафилококков проявил устойчивость к тетрациклину и эритромицину, а остальные — чувствительность при стандартном режиме дозирования. Относительно гентамицина и триметоприма/сульфаметоксазола только 4 штамма *Staphylococcus* spp. были чувствительны к данным АМП, а остальные 3 — устойчивы.

Все штаммы *Enterococcus* spp. к левофлоксацину, цiproфлоксацину и ампициллину чувствительны при стандартном режиме дозирования, а к имипенему — при увеличенной экспозиции. При этом 3 штамма *E. faecium* проявили устойчивость к ванкомицину и тигециклину, а 4 — чувствительность.

Штамм *S. pseudodiphtheriticum*, протестированный в комбинации с линезолидом, ванкомицином и тетрациклином, интерпретирован как чувствительный, а в комбинации с цiproфлоксацином — как устойчивый. С помощью контрольной питательной среды МХБ-ВД получены аналогичные антибиотикограммы для всех протестированных штаммов микроорганизмов.

Обсуждение

В данной работе на МХБ-Оболенск протестирована чувствительность грамотрицательных и грамположительных бактерий (включая прихотливые), выделенных от больных людей и сельскохозяйственных животных, к антибиотикам различных групп. В перечень АМП были включены антибиотики, чувствительность к которым не может быть определена диско-диффузионным методом (цiproфлоксацин только для сальмонелл, а ванкомицин и колистин — для всех микроорганизмов); антибиотики, выполняющие роль маркеров качества МХБ (тетрациклин, гентамицин, эритромицин, тигециклин, триметоприм/сульфаметоксазол, левофлоксацин, имипенем, меропенем, ампициллин) и другие (линезолид, цефтазидим) [9–11].

В ГНЦ ПМБ удалось сконструировать МХБ, удовлетворяющий требованиям национальных и международных стандартов, на основе специально разработанного солянокислотного гидролизата казеина модифицированного. Значение рН разработанного бульона находится в диапазоне 7,2–7,3, содержание ионов кальция — в диапазоне 20,0–25,0 мг/л, магния — 10,0–12,0 мг/л, уровень марганца в нем менее 8,0 мг/л, цинка — менее 3,0 мг/л,

Результаты тестирования клинических штаммов методом микроразведений в МХБ-Оболенск и МХБ-BD

Results of clinical strain testing by broth microdilution method using MHB-Obolensk and MHB-BD

АМП Antibiotics	Питательная среда Nutrient media	<i>K. pneumoniae</i> — 14		<i>E. coli</i> — 2		<i>M. morganii</i> — 1		<i>P. aeruginosa</i> — 8		<i>A. baumannii</i> — 4		<i>Campylobacter</i> spp. — 3		<i>Staphylococcus</i> spp. — 7		<i>Enterococcus</i> spp. — 7		<i>C. pseudodiphtheriticum</i> — 1	
		<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC	<i>n</i>	КЧ SC
Имипенем Imipenem	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	14	S	2	S	1	S	8	I	4	S	–	–	–	–	7	I	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	14	S	2	S	1	S	8	I	4	S	–	–	–	–	7	I	–	–
Меропенем Meropenem	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	14	S	2	S	1	S	8	S	4	S	–	–	–	–	–	–	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	14	S	2	S	1	S	8	S	4	S	–	–	–	–	–	–	–	–
Цефтазидим Ceftazidime	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	1	R	2	S	1	S	8	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	13	S	2	S	1	S	8	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Левифлоксацин Levofloxacin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	14	S	2	S	1	S	8	I	4	S	–	–	7	I	7	S	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	14	S	2	S	1	S	8	I	4	S	–	–	7	I	7	S	–	–
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	1	R	1	R	1	S	8	I	4	I	1	R	7	I	7	S	1	R
	МХБ-BD МНВ-BD	13	S	1	S	1	S	8	I	4	I	2	I	7	I	7	S	1	R
Линезолид Linezolid	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	7	S	1	S
	МХБ-BD МНВ-BD	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	7	S	1	S
Ванкомицин Vancomycin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	3	R	4	S
	МХБ-BD МНВ-BD	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	3	R	4	S
Ампициллин Ampicillin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	2	R	2	S	1	S	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	12	S	2	S	1	S	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	–	–
Колистин Colistin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	14	S	1	R	1	S	1	R	7	S	–	–	–	–	–	–	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	14	S	1	R	1	S	1	R	7	S	–	–	–	–	–	–	–	–
Тетрациклин Tetracycline	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	R	1	R	–	–	1	S
	МХБ-BD МНВ-BD	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	S	6	S	–	–	–	–
Гентамицин Gentamicin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	3	R	1	R	1	R	–	–	3	R	–	–	3	R	–	–	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	11	S	1	S	1	R	–	–	1	S	–	–	4	S	–	–	–	–
Эритромицин Erythromycin	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	R	1	R	–	–	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	S	6	S	–	–	–	–
Тигециклин Tigecycline	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	–	–	2	S	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	3	R	4	S
	МХБ-BD МНВ-BD	–	–	2	S	–	–	–	–	–	–	–	–	7	S	3	R	4	S
Триметоприм/ сульфаметоксазол Trimethoprim- sulfamethoxazole	МХБ-Оболенск MHB-Obolensk	14	S	2	S	1	S	–	–	4	R	–	–	3	R	–	–	–	–
	МХБ-BD МНВ-BD	14	S	2	S	1	S	–	–	4	R	–	–	4	S	–	–	–	–

Примечание. *n* — количество штаммов; КЧ — категория чувствительности. Проверк — тестирование к данному АМП не проводили; S — чувствительные при стандартном режиме дозирования; R — резистентные; I — чувствительные при увеличенной экспозиции АМП.
Note. *n* — number of strains; SC — sensitivity category. A dash — testing for this antibiotic has not been performed; S — sensitive to standard dosing regimen; R — resistant; I — sensitive to increased exposure to antibiotic.

тимидина — менее 0,03 мг/л. Другие физико-химические показатели качества, требования к которым не нормируются стандартом (см. сноску 8), не отличаются от таковых для импортного аналога: содержание аминного азота варьирует от 4,7 до 5,0%, хлоридов — от 27,5 до 28,7%, а потеря в массе при высушивании составляет 3,8–4,0%.

Использование МХБ с такими характеристиками позволило получить результаты категорий чувствительности 47 клинических штаммов микроорганизмов к 14 антибиотикам, не отличающиеся от таковых на контрольной среде надёжного производителя — МХБ-BD.

Выпускаемый бульон может быть использован для рутинного выполнения метода серийных разведений в макро- и микровариантах исполнения, для коммерческих тестов (в формате планшетов и МПК-стрипов с высушенными субстанциями антибиотиков), а также для автоматических анализаторов.

Заключение

На разработанном отечественном МХБ-Оболensk получены антибиотикограммы для клинических штаммов, которые не отличались от антибиотикограмм на среде сравнения. Бульон соответствует требованиям национальных и международных стандартов, и с помощью него можно тестировать в том числе актуальные комбинации пар микроорганизм–АМП, которые нельзя достоверно исследовать диско-диффузионным методом.

Информация об авторах

Косилова Ирина Сергеевна[✉] — к. б. н., н. с. лаб. разработки питательных сред ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия, kosilova.irina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4020-0894>

Домотенко Любовь Викторовна — к. х. н., в. н. с. лаб. разработки питательных сред ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4785-6418>

Храмов Михаил Владимирович — к. м. н., зам. директора по качеству и развитию ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4553-3826>

Участие авторов: Косилова И.С. — проведение экспериментов, анализ и обобщение полученных данных, работа с источниками литературы, статистическая обработка материала, написание текста статьи; Домотенко Л.В. — концепция и дизайн исследования, сбор материала, статистическая обработка материала, работа с источниками литературы, написание текста статьи; Храмов М.В. — концепция и дизайн исследования, редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 16.08.2024;
принята к публикации 25.10.2024;
опубликована 30.12.2024

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Qadri H., Shah A.H., Mir M. Novel strategies to combat the emerging drug resistance in human pathogenic microbes. *Curr. Drug Targets*. 2021;22(12):1424–36. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389450121666201228123212>
2. Тимошевский А.А. *Инфекционная безопасность в медицинской организации. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП)*. М.;2023. Timoshevskii A.A. *Infection Safety in a Medical Organization. Infections Associated with Healthcare (IAH)*. Moscow;2023.
3. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629–55. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0)
4. Mirzaei R., Goodarzi P., Asadi M., et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB Life*. 2020;72(10):2097–111. DOI: <https://doi.org/10.1002/iub.2356>
5. Bohlmann L., De Oliveira D.M.P., El-Deeb I.M., et al. Chemical synergy between ionophore PBT2 and zinc re-verses antibiotic resistance. *mBio*. 2018;9(6):e02391-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.02391-18>
6. Veenemans J., Mouton J.W., Kluytmans J.A.J.W., et al. Effect of manganese in test media on *in vitro* susceptibility of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* to tigecycline. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(9):3077–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01485-12>
7. Barry A.L., Roller L.B., Miller G.H. Revision of standards for adjusting the cation content of Mueller–Hinton broth for testing susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *J. Clin. Microbiol.* 1992;30(3):585–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.30.3.585-589.1992>
8. Von A.U., Wirz D., Daniels A.U. Isothermal micro calorimetry – a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *E. coli* and *S. aureus*. *BMC Microbiol.* 2009;9:106. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-106>

Information about the authors

Irina S. Kosilova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Nutrient medium development laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, kosilova.irina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4020-0894>

Lyubov V. Domotenko — Cand. Sci. (Chem.), leading researcher, Nutrient medium development laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4785-6418>

Mikhail V. Khramov — Cand. Sci. (Med.), Deputy director for quality and development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4553-3826>

Author contribution: Kosilova I.S. — conducting experiments, analyzing and summarizing the data obtained, working with literature sources, statistical processing of the material, writing the text of the article; Domotenko L.V. — concept and design of the study, collecting material, statistical processing of the material, working with literature sources, writing the text of the article; Khramov M.V. — concept and design of the study, editing. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 16.08.2024;
accepted for publication 25.10.2024;
published 30.12.2024