



Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредители:

Синопальников А.И.; Пискунов Г.Г.; Козлов Р.С.; Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)

Главный редактор:
Синопальников А.И.

Адрес редакции:

214019, Смоленская обл., г. Смоленск, ул. Кирова, д. 46А

Эл. почта: info@cmac-journal.ru

Адрес для корреспонденции:

214019, г. Смоленск, а/я 5.

Тел./факс: +7(4812)45-06-02

Издатель МАКМАХ:

214019, г. Смоленск,

ул. Кирова 46А. www.iacsmac.ru

Адрес типографии:

214020, Россия, г. Смоленск,

ул. Смольянинова, д. 1

Электронная версия журнала:

https://cmac-journal.ru

Подписка на сайте издателя:

https://service.iacsmac.ru

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

Запись в реестре зарегистрированных СМИ: ПИ № ФС 77 – 86269 от 27.11.2023

Не распространяется через предпринятия связи Тираж 3000 экз.

Свободная цена

Дата выхода – 19.05.2025

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 №436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

Иллюстрация для обложки предоставлена: Ольга Николаевна Пинегина (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России)

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2024.

Содержание

Болезни и возбудители

Миронов К.О., Гапонова И.И., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Шеленков А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Платонов А.Е., Козлов Р.С., Акимкин В.Г.

396 Определение серотипов *Streptococcus pneumoniae*, вызывающих инвазивные и неинвазивные формы инфекций, с использованием высокопроизводительного секвенирования

Бубман Л.И., Тополянская С.В., Рачина С.А., Гладких М.А., Усова Т.В., Карпов В.В., Молочников А.Ю., Нечаев А.И., Хан С.О., Эмомадов А.М., Захаров Н.С., Харченко Е.И., Лыткина К.А., Марченко И.П., Буриев И.М., Мелконян Г.Г.

401 Микробный пейзаж при исследовании ран у пациентов с боевыми травмами конечностей

Васильева И.А., Панова А.Е., Грачева А.Н., Байракова А.Л., Казюлина А.А., Елисеев П.И., Самойлова А.Г.

411 Видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий, выделенных у пациентов ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России в «доковидный» период и во время пандемии COVID-19

Максимова Е.А., Кузьменков А.Ю., Лямин А.В., Козлов А.В., Кондратьева Е.И., Кондратенко О.В.

417 Возможности использования онлайн-регистратора AMRcf у пациентов с муковисцидозом

Арсеньева А.А., Лямин А.В., Мигачёва Н.Б., Орлов Е.В., Алексеев Д.В.

426 Микрoэкологические аспекты взаимосвязи кожной микробиоты и псориаза

Антимикробные препараты

Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Козлов Р.С.

439 Разработка критериев интерпретации и оценки качества результатов определения чувствительности представителей порядка Enterobacterales и *Pseudomonas aeruginosa* к цефепиму-сульбактаму

Гамаюнов Д.Ю., Калягин А.Н., Орлова Г.М., Балабина Н.М., Синькова Г.М., Синьков А.В.

452 Применение фторхинолонов в лечении внебольничной пневмонии и их кардиотоксические эффекты

Антибиотикорезистентность

Васильева И.А., Панова А.Е., Тинькова В.В., Грачева А.Н., Казюлина А.А., Елисеев П.И., Байракова А.Л., Самойлова А.Г.

462 Антибиотикорезистентность *Mycobacterium avium* в период пандемии COVID-19

Опыт работы

Косилова И.С., Домотенко Л.В., Храмов М.В.

470 Организация производства отечественного бульона Мюллера-Хинтон

Комягина Т.М., Тряпочкина А.С., Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Горинова Ю.В., Симонова О.И.

480 Популяционная структура и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от детей с хронической бронхолегочной патологией

Козлов Р.С., Тапальский Д.В., Карпова Е.В., Петровская Т.А., Куркова А.А.

487 Микробиологическая активность бовгиалуронидазы азоксимера в отношении микробных биопленок

Новикова И.Е., Садеева З.З., Самойлова Е.А., Карасева О.В., Янюшкина О.Г., Лазарева А.В.

496 Характеристика парных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, полученных от детей

Белова И.В., Широкова И.Ю., Точилина А.Г., Ковалишена О.В., Белянина Н.А., Тулупов А.А., Молодцова С.Б., Селиверстов А.Н., Кропотов В.С., Соловьева И.В.

505 Исследование антимикробного действия супернатанта *Lactiplantibacillus plantarum* 8P-A3 на госпитальные штаммы *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*

Видманова М.В., Жестков А.В., Лямин А.В., Исмагуллин Д.Д., Шеститко Е.Ю., Решетникова В.П.

514 Микробиологическое исследование при коклюше и влияние состава питательной среды на белковое профилирование *Bordetella* spp.

Немченко У.М., Ситникова К.О., Григорова Е.В., Сухорева М.В., Белькова Н.Л., Чемезова Н.Н., Савилов Е.Д.

522 Формирование биопленок клиническими изолятами условно-патогенных микроорганизмов под влиянием дезинфицирующих средств

Описание клинических случаев

Хостелиди С.Н.

529 Опыт применения изавуконазола для лечения мукормикоза: описание клинического случая и анализ данных регистра

Организация производства отечественного бульона Мюллера-Хинтон

Косилова И.С., Домотенко Л.В., Храмов М.В.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Россия

Контактный адрес:

Ирина Сергеевна Косилова
Эл. почта: kosilova.irina@gmail.com

Ключевые слова: отечественный бульон Мюллера-Хинтон, метод микроразведений в бульоне, минимальная подавляющая концентрация, МПК.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Разработать технологию производства отечественного бульона Мюллера-Хинтон и в сравнительных испытаниях с импортным аналогом оценить его качество по физико-химическим и микробиологическим показателям с использованием референс-штаммов микроорганизмов с обычными и сложными питательными потребностями.

Материалы и методы. В работе исследовали кислотные гидролизаты казеина и бульоны Мюллера-Хинтон (МХБ) производства ФБУН ГНЦ ПМБ (МХБ-Оболensk) и BD BBL (МХБ-BD), на которых тестировали 7 тест-штаммов (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 49766, *C. jejuni* ATCC 33560) к 21 антибиотику (Sigma) методом микроразведений в бульоне по методологии EUCAST. Для культивирования трех последних штаммов в бульоны добавляли 5% лизированной лошадиной крови (Эколаб) и 20 мг/л β-NAD (Sigma). Всего проведено по 192 теста на каждом бульоне. Физико-химические и микробиологические показатели качества определяли по ГОСТ Р 70393-2022, а содержание ионов двухвалентных металлов – методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой.

Результаты. Создана технология производства отечественного МХБ классического состава на основе солянокислотного гидролизата казеина со стандартизованным содержанием ионов кальция, магния и пониженным содержанием ионов марганца, цинка и тимидина. Физико-химические (рН, аминный азот, хлориды) и микробиологические (чувствительность, скорость роста микроорганизмов, стабильность их основных биологических свойств и чувствительность к антимикробным препаратам) показатели качества не отличаются от таковых для МХБ-BD. Значения МПК на МХБ-Оболensk и МХБ-BD совпадали с целевыми в 162 тестах (84,4%) и 168 тестах (87,5%) соответственно; отличались от целевого на +/- одно разведение в 30 (15,6%) и 21 тесте (11%) соответственно. При анализе комбинации меропенем-*P. aeruginosa* на МХБ-BD в трех тестах значения МПК превышали допустимый интервал на одно двукратное разведение.

Содержание ионов кальция, магния, марганца и цинка в бульонах удовлетворяет требованиям международных стандартов. Однако концентрация последнего в МХБ-BD оказалась в три раза выше и составила 1,1 мг/л, что, возможно, является причиной ошибки при определении МПК меропенема. Полученные результаты требуют дальнейших исследований по оптимизации допустимых концентраций ионов цинка с использованием клинических штаммов микроорганизмов.

Выводы. Разработан отечественный МХБ классического состава, удовлетворяющий требованиям международных стандартов. Бульон не уступает по качеству импортному аналогу в сравнительных исследованиях с использованием референс-штаммов с обычными и сложными питательными потребностями.

Original Article

Organization of production of Russia-made Mueller-Hinton broth

Kosilova I.S., Domotenko L.V., Khramov M.V.

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

Contacts:

Irina S. Kosilova
E-mail: kosilova.irina@gmail.com

Key words: Russia-made Mueller-Hinton broth, broth microdilution method, minimum inhibitory concentration, MIC.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To develop a technology for producing Russia-made Mueller-Hinton broth and to compare its quality in terms of physicochemical and microbiological parameters with a foreign analog in trials using reference microbial strains sharing common and complex nutritional requirements.

Materials and methods. The work investigated casein acid hydrolysates and Mueller-Hinton broths (MHBs) produced by the Federal Budgetary Institution of Science SRCAMB (MHB-Obolensk) and by BD BBL (MHB-BD) through testing 7 test strains of *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 49766, and *C. jejuni* ATCC 33560 against 21 antibiotics (Sigma) by the broth microdilution method procedure according to EUCAST methodology. The latter three strains were cultured in broth supplemented with 5% lysed horse blood (Ecolab) and 20 mg/l of β-NAD (Sigma). Totally 192 tests for each broth were carried out. Physicochemical and microbiological quality parameters were determined according to GOST R 70393-2022. The content of divalent metal ions was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry.

Косилова И.С. и соавт.

Results. A technology allowing the production of Russia-made MHB of the conventional composition based on hydrochloric acid casein hydrolysate with a standardized content of calcium, magnesium ions and a reduced content of manganese, zinc and thymidine ions has been developed. Physicochemical (pH, amine nitrogen, chlorides) and microbiological (sensitivity, microbial growth rate, stability of their basic biological properties, and antimicrobial susceptibility) quality parameters did not differ from those for MHB-BD. MIC values for MHB-Obolensk and MHB-BD were consistent with targets in 162 tests (84.4%) and 168 tests (87.5%), respectively, and differed from the target by +/-one dilution in 30 (15.6%) and 21 (11%) tests, respectively. In analyzing the combination of meropenem – *P. aeruginosa* in MHB-BD, MICs exceeded the admissible interval by one double dilution in three tests.

The content of calcium, magnesium, manganese and zinc ions in the broths complies with international standards. However, the concentration of the latter in MHB-BD turned out to be three times higher and amounted to 1.1 mg/l being a possible cause of the error in determining the MIC of meropenem.

The results obtained require further study involving microbial clinical strains in order to optimize admissible concentrations of zinc ions.

Conclusions. Conventional a Russia-made MHB that meets the requirements of international standards has been developed. The broth is not inferior to its foreign analog in quality as shown in comparative studies using reference strains with common and complex nutritional needs.

Введение

Масштабное распространение микроорганизмов устойчивых к антимикробным препаратам (АМП) стало глобальной проблемой здравоохранения во всем мире [1–5]. Основными причинами развития антибиотикоустойчивости микроорганизмов являются чрезмерное неконтролируемое использование антибиотиков в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве [6]. Инфекции, вызванные микроорганизмами с лекарственной устойчивостью, приводят к ежегодной смерти около 5 млн людей в год, а к 2050 г. ожидается увеличение этих показателей до 10 млн смертей в год [7, 8].

Своевременное определение чувствительности/устойчивости возбудителя к антибиотикам является одним из важнейших мероприятий, направленным на сокращение и предотвращение распространения антибиотикоустойчивых микроорганизмов [9].

Референтным методом определения чувствительности микроорганизмов к АМП является метод микроразведений в бульоне – количественный метод, применение которого позволяет определять значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) антимикробных препаратов [10]. В отличие от диско-диффузионного метода он практически не имеет ограничений и позволяет определять чувствительность представителей *Enterobacteriales* и *Acinetobacter* spp. к колистину, *Pseudomonas* spp. к колистину и пиперациллину, *Staphylococcus* spp. к ванкомицину и доксициклину, *Enterococcus* spp. к ампициллину-сульбактаму и амоксициллину.

Для постановки метода микроразведений в бульоне рекомендуется использовать бульон Мюллера-Хинтон (МХБ), от свойств которого зависят результаты исследования. Учитывая важность качества МХБ и основываясь на результатах опубликованных исследований [11–16], международная организация по стандартизации (ISO) разработала технический стандарт ISO/TS 16782:2016 «Критерии приемлемости партий дегидратированных агара и бульона Мюллера-Хинтон, применяемых для

оценки чувствительности к антибиотикам» (российский аналог – ГОСТ Р 59786–2021/ISO/TS 16782:2016), в котором наряду с требованиями к микробиологическим показателям качества МХБ приведены требования к физико-химическим показателям: pH, содержанию ионов некоторых двухвалентных металлов, тимидина [17]. Критерии качества, описанные в данном документе, предназначены в основном для производителей, в отличие от стандарта Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (EUCAST), в котором указаны только диапазоны допустимых значений МПК антибиотиков для референтных штаммов микроорганизмов, что необходимо в постоянной работе микробиологам – пользователям питательных сред [18, 19].

Для получения достоверных результатов тестирования чувствительности к тетрациклинам, пенициллинам, аминогликозидам, макролидам и хинолонам стандартами рекомендовано использовать МХБ с оптимальным значением pH в диапазоне 7,2–7,4. Для аминогликозидов, тетрациклинов и фторхинолонов среда должна быть строго сбалансирована по содержанию ионов кальция (20,0–25,0 мг/л) и магния (10,0–12,5 мг/л), для тигециклина и карбапенемов – по концентрации ионов марганца (менее 8,0 мг/л) и цинка (3,0 мг/л) соответственно, а для сульфаниламидных препаратов критическим является концентрация тимидина в МХБ – менее 0,03 мг/л.

Анализ публикаций, посвященных сравнительному изучению коммерческих серий МХБ иностранных фирм-производителей, показал вариабельность их свойств, особенно в отношении ионов двухвалентных металлов в них, избыток которых может требовать дополнительной обработки питательных сред для получения достоверных результатов [20–23].

До настоящего 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 чем разработка технологии производства и промышленный выпуск отечественного МХБ, который необходим не только для ручного варианта выполнения метода микроразведений, но для коммерческих тестов (в формате планшетов и МПК-стрипов с высушенными субстанциями антибиотиков) и для автоматических анализаторов, является актуальной задачей.

Цель исследования – разработать технологию производства отечественного бульона Мюллера-Хинтон и в сравнительных испытаниях с импортным аналогом оценить его качество по физико-химическим и микробиологическим показателям с использованием референс-штаммов микроорганизмов с обычными и сложными питательными потребностями.

Материалы и методы

1. Гидролизаты казеина

В работе использовали 5 различных кислотных гидролизатов казеина трех фирм-производителей: кислотный гидролизат казеина технический HiMedia кат. № RM 013, кислотный гидролизат казеина технический Merck кат. № 1.02245, казаминовые кислоты технические Becton Dickinson кат. № 223120; кислотный гидролизат казеина с пониженным содержанием хлорида натрия HiMedia кат. № RM 189, кислотный гидролизат казеина для коклюшной вакцины HiMedia кат. № RM 495.

Помимо перечисленных гидролизатов в работе исследовали 3 серии солянокислотного гидролизата казеина модифицированный (СГК) производства ГНЦ ПМБ Оболенск [24].

2. Питательные среды

Исследовали 3 производственные серии МХБ, разработанного на технологической линии в ГНЦ ПМБ Оболенск (далее – МХБ-Оболенск), а также МХБ производства BD BBL (далее – МХБ-BD) кат. № 212322 в качестве контрольной среды. При тестировании микроорганизмов со сложными питательными потребностями в бульоны добавляли 5% лизированной лошадиной крови и 20 мг/л β -NAD (Sigma-Aldrich, США, кат. № N8535).

Лизированную лошадиную кровь готовили из дефибринированной лошадиной крови (Эколаб). Для чего в дефибринированную лошадиную кровь добавляли стерильную деионизированную воду в соотношении 1:1, помещали в морозильную камеру на (8 ± 1) ч. при температуре $(-20)^\circ\text{C}$. 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.

Для подготовки к проведению тестирования тест-штаммов микроорганизмов с обычными питательными потребностями использовали питательную среду

№ 1 ГРМ (ГНЦ ПМБ, Оболенск), для *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 и *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 – шоколадный агар (ГНЦ ПМБ, Оболенск), а для *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 – среду ЖЭКА, приготовленную из основы железо-эритрит-красного агара для выделения кампилобактерий (ГНЦ ПМБ, Оболенск) с внесением дефибринированной бараньей крови (Эколаб) из расчета 70 мл/л среды и 5 мл/л аэротолерантной добавки, содержащей метабисульфит натрия, пируват натрия, сульфат железа (III). Приготовление питательных сред проводили в соответствии с инструкциями производителя.

3. Тест-штаммы микроорганизмов

В работе тестировали 4 тест-штамма с обычными питательными потребностями *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и 3 тест-штамма со сложными питательными потребностями *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 49766, *C. jejuni* ATCC 33560, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ-Оболенск) в лиофилизированном виде. Перед проведением тестирования тест-штаммы ресуспендировали путем добавления в ампулы по 0,5 мл 0,9% стерильного раствора хлорида натрия. Затем полученную бактериальную суспензию высевали по 0,2 мл на чашки Петри с соответствующей питательной средой (см. раздел «Материалы и методы» п. 2). Все тест-штаммы инкубировали при температуре (35 ± 1) С в течение 18–20 ч., а *C. jejuni* ATCC 33560 – при температуре $(37 \pm 0,5)$ °С в течение 48–72 ч. Тест-штаммы *S. pneumoniae* ATCC 49619 и *H. influenzae* ATCC 49766 инкубировали в атмосфере 5–10% CO_2 , а *C. jejuni* ATCC 33560 – в анаэробе АЭ-01 (ООО «НИКИ МЛТ», ТУ 9443) с GasPak (BD, кат. № 260680), который обеспечивал микроаэробную атмосферу (10% CO_2 , 5% O_2 и 85% N_2).

3. Антимикробные препараты

В работе использовали субстанции антимикробных и лекарственных препаратов: азтреонам кат. № PHR1785, амикацин кат. № A1774, амоксициллин кат. № A8523, ампициллин кат. № A9393, ванкомицин кат. № 94747, гентамицин кат. № G3632-1G, имипенем кат. № I0160, колистин кат. № C4461, левофлоксацин кат. № 28266, линезолид кат. № PHR1885, меропенем кат. № PHR1772, моксифлоксацин кат. № SML1581, пиперациллин кат. № PHR1805, тазобактам кат. № PHR1686, тетрациклин кат. № T8032, тигециклин кат. № PZ0021, триметоприм кат. № T7883, цефтазидим кат. № PHR1847, ципрофлоксацин кат. № 17850, эритромицин кат. № E6376, сульбактам кат. № Y0000528 и сульфаметоксазол кат. № S7507 – все производства Sigma-Aldrich.

4. Метод микроразведений в бульоне

Для выполнения метода использовали 96-луночный планшет. Пример определения значений МПК гента-

мицина, имипенема и левофлоксацина при тестировании *P. aeruginosa* ATCC 27853 с использованием планшета и разработанного МХБ-Оболенск представлен на Рисунке 1.

Тестирование и учет результатов проводили в соответствии с требованиями международных стандартов [10, 18, 19, 25]. Результаты тестирования оценивали по таблицам критических значений МПК и диаметров зон подавления роста EUCAST (версия 13.0), кроме тест-штамма *S. jejuni* ATCC 33560, для которого результаты тестирования оценивали по стандарту CLSI M100 (версия 33) [18]. Значение МПК каждого антибиотика определяли в трех повторах.

Результаты для *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619 и *H. influenzae* ATCC 49766 учитывали после инкубирования при температуре $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18 ч., а *S. jejuni* ATCC 33560 – при температуре $(41 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч.

5. Физико-химические показатели качества питательных сред

Физико-химические показатели качества образцов питательных сред: содержание аминного азота, содержание хлоридов в пересчете на натрия хлорид и потерю в массе при высушивании, – определяли в соответствии с МУК 4.2.2316-08 [26]. Содержание ионов кальция (Ca^{2+}), магния (Mg^{2+}), марганца (Mn^{2+}) и цинка (Zn^{2+}) определяли в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 27085-2012 методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на плазменном спектрометре iCAP-6500 Duo Thermo Scientific [27].

Содержание тимидина в МХБ оценивали косвенным методом по соответствию полученных значений МПК триметоприма-сульфаметоксазола при тестировании *E. faecalis* ATCC 29212 допустимому значению – $\leq 0,5$ мг/л.

6. Определение показателя чувствительности питательных сред, скорости роста и стабильности основных биологических свойств тест-штаммов

Показатель чувствительности МХБ определяли по максимальному разведению тест-штаммов, которое обеспечивало визуально обнаруживаемый рост. Для этого готовили микробные суспензии, соответствующие 10 единицам по отраслевому стандартному образцу (ОСО) мутности 42-28-85, с использованием стерильного 0,9% раствора натрия хлорида. Из полученных суспензий десятикратными разведениями (4,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида и 0,5 мл микробной взвеси) доводили до рабочего разведения 10^{-9} . Затем по 0,1 мл каждого разведения высевали в 10,0 мл каждого бульона. Все посева инкубировали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18–24 ч., кроме *S. jejuni* ATCC 33560, который инкубировали при той же температуре, но в течение 48 ч.

Показатель стабильности основных биологических свойств тест-штаммов определяли по характеру их ро-

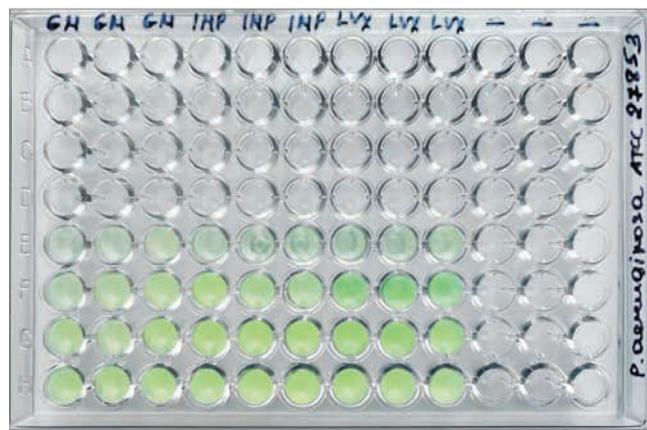


Рисунок 1. Определение значений МПК гентамицина (GM), имипенема (IMP) и левофлоксацина (LVX) при тестировании *P. aeruginosa* ATCC 27853 методом микроразведений в МХБ-Оболенск

ста – наличию равномерного диффузного помутнения питательных сред.

Результаты

В процессе разработки технологии и организации производства отечественного МХБ в качестве основы исследованы различные коммерческие гидролизаты казеина (см. раздел «Материалы и методы» п. 1), но их применение не позволило получить питательную среду, удовлетворяющую требованиям международных стандартов по элементному составу, значениям pH и МПК антимикробных препаратов для референтных штаммов микроорганизмов.

Ранее для производства агара Мюллера-Хинтон (МХА) был специально разработан СГК с пониженным содержанием тимидина, ионов Mn^{2+} и Zn^{2+} , а также со сбалансированным содержанием ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} [24]. Только при использовании данного СГК удалось сконструировать бульон, состав которого соответствует классической прописи: СГК – 17,5 г/л, мясной экстракт – 2,0 г/л и крахмал – 1,5 г/л, а концентрации Ca^{2+} и Mg^{2+} находятся в диапазонах (20–25) мг/л и (10–12,5) мг/л соответственно [17]. По указанной прописи наработаны три серии МХБ для оценки качества в сравнительных испытаниях с импортным аналогом с использованием референс-штаммов микроорганизмов с обычными и сложными питательными потребностями.

Как известно, качество питательных сред определяется комплексом физико-химических и микробиологических показателей, основные среди которых – pH, содержание аминного азота и хлоридов, а для сухих сред – потеря в массе при высушивании [26, 28]. В ходе исследований определены приемлемые интервалы показателей для МХБ, которые позволяют получать допустимые значения МПК для тест-штаммов: во всех исследуемых производственных сериях МХБ-Оболенск значения pH находится в диапазоне от 7,2 до 7,3, что удов-

летворяет требованиям международных стандартов [17–19]. Содержание аминного азота варьируется от 4,7% до 5,0%, хлоридов – от 27,5% до 28,7%, а потеря в массе при высушивании составляет от 3,8% до 4,0%. Полученные значения физико-химических показателей практически совпадают с аналогичными показателями контрольной питательной среды.

К микробиологическим показателям качества всех питательных сред относятся показатель чувствительности питательных сред, скорость роста и стабильность основных биологических свойств микроорганизмов, а для питательных сред, используемых для определения антибиотикочувствительности, дополнительно определяется показатель чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам путем сравнения полученных и табличных значений МПК для тест-штаммов микроорганизмов по таблицам для рутинного и расширенного контроля качества [29].

Определение показателя чувствительности питательных сред, скорости роста и стабильности основных биологических свойств тест-штаммов микроорганизмов

Как показали результаты исследований, питательная среда обладает хорошей чувствительностью. Тест-штаммы *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *E. faecalis* ATCC 29212 выростали в виде диффузного равномерного помутнения среды из разведения 10^{-7} через 18–24 ч. инкубирования. При внесении в МХБ-Оболенск соответствующих добавок (см. раздел Материалы и методы п. 1 «Питательные среды») наблюдался аналогичный рост *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 49766 и *C. jejuni* ATCC 33560 из разведений 10^{-5} , 10^{-7} и 10^{-7} соответственно. Тест-штамм кампилобактерий выростал позже других исследованных микроорганизмов: для его роста требовалось 48 ч. Аналогичные показатели качества получены для МХБ-ВД.

Таблица 1. Комбинации АМП – тест-штамм, протестированные методом микроразведений в бульоне

АМП	Тест-штаммы микроорганизмов							Количество протестированных комбинаций АМП – тест-штамм
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	
Азтреонам	+	-*	+	-	-	-	-	2
Амикацин	+	+	+	-	-	-	-	3
Амоксициллин	+	-	-	-	-	-	-	1
Ампициллин	+	-	-	+	-	-	-	2
Ампициллин-сульбактам	+	-	-	-	-	-	-	1
Ванкомицин	-	+	-	+	+	-	-	3
Гентамицин	+	+	+	+	-	-	-	4
Имипенем	+	-	+	+	-	-	-	3
Колистин	+	-	+	-	-	-	-	2
Левифлоксацин	+	+	+	+	+	+	-	6
Линезолид	-	+	-	+	+	-	-	3
Меропенем	+	-	+	-	+	+	-	4
Моксифлоксацин	+	+	-	-	+	+	-	4
Пиперациллин	+	-	+	-	-	-	-	2
Пиперациллин-тазобактам	+	-	+	-	-	-	-	2
Тетрациклин	-	+	-	-	+	+	+	4
Тигециклин	+	+	-	+	-	-	-	3
Триметоприм-сульфаметоксазол	+	+	-	+	-	-	-	3
Цефтазидим	+	-	+	-	-	-	-	2
Ципрофлоксацин	+	+	+	+	-	+	+	6
Эритромицин	-	+	-	-	+	+	+	4
Общее количество протестированных комбинаций АМП-тест-штамм								64
Общее количество поставленных тестов								192

* Тестирование с данным АМП не проводили.

Определение показателя чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

В ходе исследования определены значения МПК антимикробных препаратов 21 наименования для 7 тест-штаммов микроорганизмов в соответствии с Таблицей 1. Каждая комбинация АМП – тест-штамм протестирована в трех повторах на исследуемой и контрольной питательной среде. Всего на каждой питательной среде выполнено по 192 теста.

Полученные значения МПК оценивали по следующим критериям: по соответствию целевым значениям, по отклонению от целевого значения на +/- одно разведение и отклонению от допустимого интервала значений. Количество тестов, соответствующих выбранным критериям, на двух питательных средах приведены в Таблице 2.

Как видно из Таблице 2, значения МПК антибиотиков, полученные на МХБ-Оболensk, соответствуют целевому значению в 162 из 192 проведенных тестов (84,4%). В 30 тестах (15,6%) значения МПК отклоняются от целевых на +/- одно разведение. В основном,

эти отличия касаются определения МПК амоксициллина, ампициллина, ампициллина-сульбактама и пиперациллина-тазобактама для *E. coli* ATCC 25922, МПК ципрофлоксацина для *S. aureus* ATCC 29213 и *E. faecalis* ATCC 29212, МПК азтреонама, пиперациллина и пиперациллина-тазобактама для *P. aeruginosa* ATCC 27853 и МПК ампициллина для *E. faecalis* ATCC 29212.

Величины МПК антибиотиков, полученные на контрольной питательной среде (МХБ-BD), соответствуют целевому значению в 168 тестах (87,5%), а в 21 тесте (11%) – отклоняются от целевых на +/- одно разведение при тестировании комбинаций амоксициллин – *E. coli* ATCC 25922, ампициллин – *E. coli* ATCC 25922 и моксифлоксацин – *S. pneumoniae* ATCC 49619. Еще три случая отклонения от целевых значений отмечены при определении чувствительности к обоим представителям карбапенемов (имипенему и меропенему): при тестировании комбинаций *P. aeruginosa* ATCC 27853 – имипенем и *E. faecalis* ATCC 29212 – имипенем, а также *E. coli* ATCC 25922 – меропенем и *S. pneumoniae* ATCC 49619 – меропенем. Кроме того, при анализе *P. aeru-*

Таблица 2. Результаты оценки значений МПК антибиотиков, полученных на МХБ-Оболensk и МХБ-BD

АМП	Количество тестов, для которых полученные значения МПК антибиотиков					
	Совпадали с целевыми значениями		Отклонялись от целевых на +/- одно разведение		Выходили за рамки допустимых значений	
	МХБ-Оболensk	МХБ-BD	МХБ-Оболensk	МХБ-BD	МХБ-Оболensk	МХБ-BD
Азтреонам	3	6	3	0	0	0
Амикацин	9	9	0	0	0	0
Амоксициллин	0	0	3	3	0	0
Ампициллин	0	3	6	3	0	0
Ампициллин-сульбактам	0	3	3	0	0	0
Ванкомицин	9	9	0	0	0	0
Гентамицин	12	12	0	0	0	0
Имипенем	9	3	0	6	0	0
Колистин	6	6	0	0	0	0
Левифлоксацин	15	15	0	0	0	0
Линезолид	9	9	0	0	0	0
Меропенем	12	3	0	6	0	3
Моксифлоксацин	12	9	0	3	0	0
Пиперациллин	3	6	3	0	0	0
Пиперациллин-тазобактам	0	6	6	0	0	0
Тетрациклин	12	12	0	0	0	0
Тигециклин	9	9	0	0	0	0
Триметоприм-сульфаметоксазол	9	9	0	0	0	0
Цефтазидим	6	6	0	0	0	0
Ципрофлоксацин	12	18	6	0	0	0
Эритромицин	12	12	0	0	0	0
Всего тестов	162	168	30	21	0	3

Таблица 3. Концентрации ионов кальция (Ca^{2+}), магния (Mg^{2+}), марганца (Mn^{2+}) и цинка (Zn^{2+}) в бульонах Мюллера-Хинтон разных производителей

Питательные среды	Содержание ионов			
	Ca^{2+} , мг/л	Mg^{2+} , мг/л	Mn^{2+} , мг/л	Zn^{2+} , мг/л
МХБ–Оболенск серия 1	22,5	10,3	0,25	0,29
МХБ–Оболенск серия 2	22,0	11,0	0,20	0,30
МХБ–Оболенск серия 3	22,9	10,8	0,27	0,27
Контрольная среда МХБ–BD	22,0	10,8	0,35	1,1
Требования ГОСТ Р 59786-2021/ISO/TS 16782:2016 [17]	20,0–25,0	10,0–12,5	< 8,0	< 3,0

ginos ATCC 27853 значения МПК меропенема не входили в допустимый интервал и превышали верхнее пограничное значение на одно двукратное разведение: при допустимом диапазоне 0,25–1,0 мг/л получено значение 2,0 мг/л. При этом на МХБ–Оболенск для этого штамма МПК меропенема составило 0,5 мг/л.

Для поиска причин полученных несовпадений в бульонах МХБ–BD и трех сериях МХБ–Оболенск определены концентрации ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} , которые могут влиять на результаты определения чувствительности микроорганизмов (см. Таблица 3).

Как видно из Таблицы 3, содержание ионов Ca^{2+} в исследуемых образцах МХБ–Оболенск варьируется в диапазоне от 22,0 до 22,9 мг/л, ионов Mg^{2+} – от 10,3 до 11,0 мг/л, Mn^{2+} – от 0,2 до 0,27 мг/л, а Zn^{2+} – от 0,27 до 0,3 мг/л. Все проанализированные образцы бульона МХБ удовлетворяют требованиям ГОСТ Р 59786-2021/ISO/TS 16782:2016: полученные значения МПК входят в регламентируемый диапазон 20,0 мг/л – 25,0 мг/л для ионов кальция, 10,0 мг/л – 12,5 мг/л для ионов магния, а концентрации ионов марганца и цинка не превышают 8,0 мг/л и 3,0 мг/л соответственно [17]. Обращает внимание более низкая концентрация ионов Mn^{2+} и Zn^{2+} в обоих бульонах относительно требований ГОСТ Р 59786-2021/ISO/TS 16782:2016. Но если по содержанию ионов Mn^{2+} исследуемые образцы практически не отличаются между собой, то в МХБ–BD концентрация Zn^{2+} в три раза выше (1,1 мг/л), чем во всех трех сериях МХБ–Оболенск (от 0,27 до 0,30 мг/л).

Обсуждение

Результаты проведенных исследований разработанного отечественного бульона Мюллера-Хинтон показали соответствие требованиям стандартов EUCAST и ГОСТ Р 59786-2021/ISO/TS 16782:2016 по содержанию ионов двухвалентных металлов и тимидина, а также

соответствию значений минимальных подавляющих концентраций АМП различных классов при тестировании референтных штаммов. Сравнительные испытания разработанного бульона и МХБ–BD показали хорошую сходимость результатов МПК практически для всех исследованных АМП. Расхождения в результатах тестирования *P. aeruginosa* ATCC 27853 и меропенема могут быть связаны с различиями в содержании ионов Zn^{2+} , которые влияют на результаты определения чувствительности к карбапенемам.

Влияние состава МХБ на результаты тестирования чувствительности к антибиотикам известно уже давно, в результате чего изменились требования к содержанию ионов некоторых двухвалентных металлов. Например, до процесса стандартизации МХБ содержал только незначительные количества ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , что приводило к несоответствию результатов *in vitro* и *in vivo* чувствительности *P. aeruginosa* к аминогликозидам. В процессе стандартизации было показано, что МХБ требует добавления данных ионов до достижения физиологических уровней, но при проведении дальнейших исследованиях концентрации были пересмотрены, поскольку оказались неоптимальными. В настоящее время для получения достоверных результатов тестирования в МХБ содержание ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} составляет (20,0–25,0) мг/л и (10,0–12,5) мг/л соответственно [14, 15, 30].

Последующие исследования показали, что на активность не только аминогликозидов, но и других антибиотиков (колистина, полимиксина В, даптомицина, тигециклина, цефидерокола, имипенема и меропенема) оказывают влияние присутствие ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} Zn^{2+} в питательной среде [31–35].

Но если концентрации ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} строго стандартизованы требованиями международных стандартов [17–19], и должны находиться в соответствующих диапазонах значений, то в отношении концентрации ионов Zn^{2+} в бульоне и агаре Мюллера-Хинтон положениями ГОСТ Р 59786-2021/ISO/TS 16782:2016 рекомендовано значение, не превышающее 3 мг/л. Вместе с тем, стандартами CLSI и EUCAST при определении чувствительности микроорганизмов к цефидероколу в очищенный от ионов двухвалентных металлов МХБ рекомендуется добавлять соли кальция и магния до конечных стандартизованных концентраций (20–25 мг/л и 10,0–12,5 мг/л соответственно), а цинка – до конечной концентрации (0,5–1,0) мг/л [18, 36, 37].

Ранее [38, 39] было показано, что при повышении концентрации ионов Zn^{2+} от исходного значения, равного 0,3 мг/л, до 1,4 мг/л с шагом 0,2 мг/л путем добавления сульфата цинка уменьшались значения диаметров зон подавления роста тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг дисков с меропенемом и имипенемом, а при концентрации ионов $\text{Zn}^{2+} \geq 1,0$ мг/л, диаметры зон подавления роста тест-штамма вокруг диска с меропенемом снижались и выходили за рамки допустимого диапазона значений.

Вероятно, концентрация ионов $\text{Zn}^{2+} \geq 1,0$ мг/л, в МХБ–BD при тестировании *P. aeruginosa* ATCC 27853

способствовала получению МПК меропенема, превышающей допустимые значения. Полученные результаты требуют дальнейших исследований по оптимизации допустимых концентраций ионов цинка в МХБ с использованием клинических штаммов микроорганизмов.

Необходимость более тщательного изучения влияния ионов Zn^{2+} на результаты тестирования чувствительности к карбапенемам и оптимизации питательных сред по их содержанию также отражена в недавних публикациях Bilinskaaya A. и соавт. [21] и Asemra T. и соавт. [22, 23]. Отмечена значительная вариабельность содержания данных ионов в девяти коммерческих сериях МХБ трех производителей (BD, Oxoid, и Sigma-Aldrich), которая приводила к 8-кратным различиям в МПК меропенема и разным категориям клинической чувствительности среди изолятов энтеробактерий, продуцирующих металло- β -лактамазу (MBL) [21]. При исследовании МХБ, предназначенных для автоматических систем, наблюдалась 10-кратная разница в концентрациях ионов Zn^{2+} (MicroScan – 0,46 мг/л, BD Phoenix – 1,16 мг/л, Vitek – 1,22 мг/л, Sensititre – 4,49 мг/л) [23]. Добавление ЭДТА в концентрациях ≥ 30 мкг/мл было достаточным для создания среды с ограниченным содержанием Zn^{2+} , в результате чего значения МПК стали лучше отражать активность меропенема *in vivo*. Авторы подчеркивают, что обедненный цинком МХБ обеспечивает более достоверные результаты МПК меропенема для MBL-продуцирующих Enterobacterales, и поэтому рекомендуют продолжить работы в данном направлении [21, 22].

Таким образом, проведенное исследование подчеркивает важность производства бульона Мюллера-Хинтон с обедненным содержанием ионов Zn^{2+} с целью снижения рисков получения ложных результатов определения чувствительности к карбапенемам.

Заключение

Сконструирован отечественный бульон Мюллера-Хинтон классического состава на основе специально разработанного солянокислотного гидролизата казеина. Отечественный бульон удовлетворяет требованиям современных международных стандартов по физико-химическим и микробиологическим показателям. Имеет сбалансированное содержание ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , обладает пониженным содержанием ионов Mn^{2+} и Zn^{2+} .

В сравнительных исследованиях с использованием референс-штаммов микроорганизмов с обычными и сложными питательными потребностями показано, что он не уступает по качеству импортному аналогу – МХБ производства BD. Полученные отклонения при определении МПК карбапенемов на МХБ-BD требуют дальнейшего изучения оптимального содержания ионов Zn^{2+} в бульонах Мюллера-Хинтон для тестирования чувствительности микроорганизмов. Особенно это актуально для микроорганизмов, продуцирующих металло- β -лактамазы.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Литература

- Murray C.J.L., Ikuta K.S., Sharara F. Swetschinski L., Aguilar G.R., Gray A., et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629-655. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0
- Bengtsson-Palme J., Kristiansson E., Larsson D.G.J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2018;42(1):68-80. DOI: 10.1093/femsre/fux053
- Escolà-Vergé L., Los-Arcos I., Almirante B. New antibiotics for the treatment of infections by multidrug-resistant microorganisms. *Med Clin (Barc)*. 2020;154(9):351-357. DOI: 10.1016/j.medcli.2019.11.002
- 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):1424-1436. DOI: 10.2174/1389450121666201228123212
- Moo C.-L., Yang S.-K., Yusoff K., Ajat M., Thomas W., Abushelaibi A., et al. Mechanisms of antimicrobial resistance (AMR) and alternative approaches to overcome AMR. *Curr Drug Targets*. 2020;17(4):430-447. DOI: 10.2174/1570163816666190304122219
- Samreen, Iqbal S.A., Malak H.A., Abulreesh H.H. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021;27:101-111. DOI: 10.1016/j.jgar.2021.08.001
- Aslam B., Khurshid M., Imran A.M., Muzammil S., Rasool M., Yasmeen N., et al. Antibiotic resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:1-20. DOI: 10.3389/fcimb.2021.771510
- Shukla A., Jani N., Polra M., Kamath A., Patel D. CRISPR: the multidrug resistance endgame? *Mol Biotechnol*. 2021;63(8):676-685. DOI: 10.1007/s12033-021-00340-9
- Torres A., Cilloniz C., Niederman M.S., Menéndez R., Chalmers J.D., Wunderink R.G., et al. Pneumonia. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):1-25. DOI: 10.1038/s41572-021-00259-0
- GOST R ISO 20776-1-2022. Susceptibility testing of infectious agents and assessment of the functional characteristics of products for studying sensitivity to antimicrobial agents. Part 1. Broth microdilution reference method for laboratory testing of the activity of antimicrobial agents against fast-growing aerobic bacteria

- that cause infectious diseases. М.: Russian Institute of Standardization; 2022. Russian. (ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022. 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.: Российский институт стандартизации; 2022.)
11. Veenemans J., Mouton J.W., Kluytmans J.A.J.W., Donnelly R., Verhulst C., Keulen P.H.J. Effect of manganese in test media on *in vitro* susceptibility of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* to tigecycline. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):3077-3079. DOI: 10.1128/JCM.01485-12
 12. Daly J.S., Dodge R.A., Glew R.H., Soja D.T., DeLuca B.A., Hebert S. Effect of zinc concentration in Mueller-Hinton agar on susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1027-1029. DOI: 10.1099/00222615-47-7-653
 13. Fass R.J., Barnishan J. Effect of divalent cation concentrations on the antibiotic susceptibilities of non-fermenters other than *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979;16(4):434-438. DOI: 10.1128/AAC.16.4.434
 14. Barry A.L., Miller G.H., Thornsberrry C. Influence of cation supplements on activity of netilmicin against *Pseudomonas aeruginosa in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(10):1514-1518. DOI: 10.1128/AAC.31.10.1514
 15. 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):585-589. DOI: 10.1128/JCM.30.3.585-589.1992
 16. Von A.U., Wird D., Daniels A.U. Isothermal micro calorimetry – a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 2009;26(9):106-120. DOI: 10.1186/1471-2180-9-106
 17. GOST R 59786-2021/ISO/TS 16782:2016. Clinical laboratory tests. Acceptance criteria for dehydrated agar and Mueller-Hinton broth lots used for antibiotic susceptibility testing. М.: Russian Institute of Standards; 2021. Russian. (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.: Российский институт стандартов; 2021.)
 18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirty-third Informational Supplement. CLSI document M100, 33rd Edition. USA; 2022. 402 p.
 19. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Available at: www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf. Accessed October 2023.
 20. Rennie R.P. Zinc concentration affects metallo-beta-lactamase susceptibility testing of Enterobacterales. *J Clin Microbiol.* 2021;59(9):1-2. DOI: 10.1128/JCM.00039-21
 21. Bilinskaya A., Buckheit D.J., Gnoinski M., Asempa T.E., Nicolau D.P. Variability in zinc concentration among Mueller-Hinton broth brands: impact on antimicrobial susceptibility testing of metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2020;58(12):1-24. DOI: 10.1128/JCM.02019-20
 22. Asempa T.E., Abdelraouf K., Nicolau D.P. Metallo- β -lactamase resistance in *Enterobacteriaceae* is an artefact of currently utilized antimicrobial susceptibility testing methods. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(4):997-1005. DOI: 10.1093/jac/dkz532
 23. Asempa T.E., Gill C.M., Chibabhai V., Nicolau D.P. Comparison of zinc concentrations in the broth of commercial automated susceptibility testing devices (Vitek 2, MicroScan, BD Phoenix, and Sensititre). *Microbiol Spectr.* 2022;10(2):1-4. DOI: 10.1128/spectrum.00052-22
 24. Domotenko L.V., Kosilova I.S., Mironova E.N., Shepelin A.P. Method for producing dry hydrochloric acid hydrolysate of casein. Patent RU No. 2746624 Russian Federation. Published 19.04.2021. Bulletin No. 11. 17 p. Russian. (Домотенко Л.В., Косилова И.С., Миронова Е.Н., Шепелин А.П. Способ получения сухого солянокислотного гидролизата казеина. Патент RU № 2746624 Российская Федерация. Оpubл. 19.04.2021 г. Бюл. № 11. 17 с.)
 25. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods For Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. CLSI M45 3rd Edition. USA; 2015. 120 p.
 26. MUK 4.2.2316-08. 4.2. Methods for monitoring bacteriological nutrient media: Guidelines. М.: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзор; 2008. Russian. (МУК 4.2.2316-08. 4.2. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.)
 27. GOST R ISO 27085-2012. Pet food. Determination of the content of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum, arsenic, lead and cadmium using the ICP-AES method. М.: Standartinform; 2014. Russian. (ГОСТ Р ИСО 27085-2012. Корма для животных. Определения содержания кальция, натрия, фосфора, магния, калия, железа, цинка, меди, марганца, кобальта, молибдена, мышьяка, свинца и кадмия методом ИСП-АЭС. М.: Стандартинформ; 2014.)
 28. GOST R ISO 70393-2022. Medical products for *in vitro* diagnostics. Preparation, production, storage and testing of nutrient media. М.: Russian Institute of Standardization; 2022. Russian. (ГОСТ Р 70393-2022. Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Приготовление, производство, хранение и испытания питательных сред. М.: Российский институт стандартизации; 2022.)
 29. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing

- (EUCAST). Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST (Version 14.0, valid from 2024-01-01). Available at: www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_14.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf. Accessed January 2023.
30. Reller L.B., Schoenknecht F.D., Kenny M.A., Sherris J.C. Antibiotic susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*: selection of a control strain and criteria for magnesium and calcium content in media. *J Infect Dis.* 1974;130(5):454-463. DOI: 10.1093/infdis/130.5.454
 31. Ezadi F., Ardebili A., Mirnejad R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: challenges, issues, and recommendations. *J Clin Microbiol.* 2018;57(4):1-49. DOI: 10.1128/jcm.01390-18
 32. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008;3(2):163-175. DOI: 10.1038/nprot.2007.521
 33. Fernández-Mazarrasa C., Mazarrasa O., Calvo J., Del Arco A., Martínez-Martínez L. High concentrations of manganese in Mueller-Hinton agar increase MICs of tigecycline determined by E-test. *J Clin Microbiol.* 2009;47(3):827-829. DOI: 10.1128/jcm.02464-08
 34. Huband M.D., Ito A., Tsuji M., Sader H.S., Fedler K.A., Flamm R.K. Cefiderocol MIC quality control ranges in iron-depleted cation-adjusted Mueller-Hinton broth using a CLSI M23-A4 multi-laboratory study design. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;88(2):198-200. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.03.011
 35. Fuchs P.C., Barry A.L., Brown S.D. Daptomycin susceptibility tests: interpretive criteria, quality control, and effect of calcium on *in vitro* tests. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;38(1):51-58. DOI: 10.1016/s0732-8893(00)00164-4
 36. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Guidance document on broth microdilution testing of cefiderocol (01.01.2024). Available at: www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Guidance_documents/Cefiderocol_MIC_testing_EUCAST_guidance_document_January_2024.pdf. Accessed January 2023.
 37. Hackel M.A., Tsuji M., Yamano Y., Echols R., Karlowsky J.A., Sahm D.F. Reproducibility of broth microdilution MICs for the novel siderophore, cephalosporin, cefiderocol, determined using iron-depleted cation-adjusted Mueller-Hinton broth. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;94(4):321-325. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.03.003
 38. Kosilova I.S., Domotenko L.V., Shepelin A.P. The influence of zinc concentrations in Mueller-Hinton agar on the results of determining the sensitivity of microorganisms to AMPs using the disk diffusion method. *Klinicheskaa mikrobiologia i antimikrobnaa himioterapia.* 2020;22(2):17. Russian. (Косилова И.С., Домотенко Л.В., Шепелин А.П. Влияние концентраций цинка в агаре Мюллера-Хинтон на результаты определения чувствительности микроорганизмов к АМП диско-диффузионным методом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2020;22(2):17.)
 39. Atmaca S. Effect of zinc concentration in Mueller-Hinton agar on susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to meropenem. *J Med Microbiol.* 1998;47(7):653. DOI: 10.1099/00222615-47-7-653