

ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ АГАР МЮЛЛЕРА–ХИНТОН: СООТВЕТСТВИЕ СОВРЕМЕННЫМ ТРЕБОВАНИЯМ

Л.В. Домотенко, И.С. Косилова, А.П. Шепелин

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия

Резюме. Растущая устойчивость возбудителей инфекционных болезней к антимикробным препаратам (АМП) в настоящее время требует точных результатов тестирования чувствительности возбудителей инфекций к антимикробным препаратам, поскольку ошибки тестирования могут привести к неправильному выбору препаратов для лечения и способствуют распространению резистентности. Наиболее распространенным методом для определения чувствительности патогенов к АМП является диско-диффузионный метод. Критическим фактором, влияющим на результаты тестирования, является качество используемой питательной среды. Ситуация, сложившаяся в нашей стране с наличием двух документов — методических указаний и клинических рекомендаций, регламентирующих методологию определения чувствительности микроорганизмов к АМП, позволила обращаться на отечественном рынке нескольким питательным средам данного назначения — агару Мюллера–Хинтон, среде АГВ и др., не всегда надлежащего качества. С целью гармонизации методологии определения чувствительности к АМП с международными требованиями в ФБУН ГНЦПМБ разработана технология и организовано производство отечественного агара Мюллера–Хинтон, удовлетворяющего современным требованиям документов EUCAST, клинических рекомендаций и ISO/TS 16782:2016. Основной задачей данной работы явилась сравнительная оценка его качества и пяти аналогичных сред иностранных фирм-производителей при исследовании 11 тест-штаммов диско-диффузионным методом. В результате проведенных исследований отмечена нестандартность некоторых из анализированных питательных сред, представленных на рынке РФ: не все исследуемые питательные среды удовлетворяют требованиям нормативных документов EUCAST и клинических рекомендаций, поскольку значения диаметров подавления роста, рекомендуемые EUCAST для контроля качества, не укладываются в допустимые диапазоны. Ошибки обнаружены при определении чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к аминогликозидам, фторхинолонам, меропенему, а также при тестировании *S. aureus* ATCC 25923 и *E. faecalis* ATCC 29212 и тигециклина. Результаты испытаний проанализированы с позиций нового документа ISO/TS 16782:2016 «Clinical laboratory testing — Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller–Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing», пока еще не принятого в нашей стране. Для выяснения возможных причин отклонений результатов от нормативных значений определены концентрации двухвалентных металлов во всех исследуемых питательных средах методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой. В статье показаны новые закономерности, влияющие на достоверность получаемых результатов тестирования антибиотикочувствительности микроорганизмов. Показана необходимость проведения внутрилабораторного контроля качества питательных сред.

Ключевые слова: питательные среды, агар Мюллера–Хинтон, чувствительность, резистентность, антимикробные препараты, диско-диффузионный метод.

Адрес для переписки:

Домотенко Любовь Викторовна
142279, Россия, Московская область, Серпуховский район,
п. Оболенск, ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.
Тел./факс: 8 (916) 334-55-26.
E-mail: domotenko@obolensk.org

Contacts:

Lyubov V. Domotenko
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,
Obolensk, State Research Center of Applied Microbiology
and Biotechnology.
Phone/Fax: +7 (916) 334-55-26.
E-mail: domotenko@obolensk.org

Библиографическое описание:

Домотенко Л.В., Косилова И.С., Шепелин А.П. Отечественный агар Мюллера–Хинтон: соответствие современным требованиям // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 409–416. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-409-416

Citation:

Domotenko L.V., Kosilova I.S., Shepelin A.P. Russia-made Mueller–Hinton agar: compliance with contemporary requirements // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 409–416. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-409-416

RUSSIA-MADE MUELLER–HINTON AGAR: COMPLIANCE WITH CONTEMPORARY REQUIREMENTS**Domotenko L.V., Kosilova I.S., Shepelin A.P.***State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation*

Abstract. At present, a rise of antimicrobial resistance requires that susceptibility of infectious agents to antimicrobial agents could be accurately evaluated as related errors may lead to selecting improper therapeutics provoking spread of drug resistance. Pathogen sensitivity to antimicrobial agents is commonly determined by a disc diffusion method. A quality of nutrient medium used in assays plays a crucial role influencing final results. In Russia, it turned out that regulatory documents such as the nationwide guidelines and clinical recommendations outlining methodology for antimicrobial susceptibility testing underlay availability in domestic market few nutrient media, including Mueller–Hinton Agar, AGV medium etc. exhibiting sometimes unsatisfactory quality. To harmonize such methodology with international requirements, the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology has developed a technology and promoted manufacture of Russia-made Mueller–Hinton agar satisfying requirements of EUCAST documents, clinical guidelines, and ISO/TS 16782:2016. The main objective of this study was to compare quality of new agar product with five similar foreign media while examining 11 test strains by disc diffusion method. As a result, some of nutrient media available to the Russian market turned out to be off-standard: not all of them satisfy to the EUCAST requirements and clinical guidelines since diameter distribution for growth inhibition recommended by EUCAST for quality control does not fit into permissible range. Moreover, susceptibility of *P. aeruginosa* ATCC 27853 to aminoglycosides, fluoroquinolones, Meropenem, as well as *S. aureus* ATSS 25923 and *E. faecalis* ATCC 29212 to tigecycline was assessed with certain mistakes. The data obtained by us were analyzed in accordance to the new document ISO/TS 16782:2016 “Clinical laboratory testing — criterion for acceptable lots of dehydrated Mueller–Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing”, not approved yet in Russia. To determine potential reason for deviation of data from reference range, we measured concentration of bivalent metals in all nutrient media examined by atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma. We determined new patterns affecting reliability of results on microbial antibiotic susceptibility. A need to check intra-laboratory quality control of nutrient media was emphasized.

Key words: *nutrient media, Mueller–Hinton agar, susceptibility, resistance, antimicrobial agents, disk-diffusion method.*

Введение

Растущая устойчивость возбудителей инфекционных болезней к антимикробным препаратам в настоящее время — одна из наиболее серьезных проблем здравоохранения во всем мире. Одной из основных задач клинических лабораторий помимо идентификации микроорганизма, вызывающего инфекционное заболевание, является определение чувствительности возбудителя к антимикробным препаратам (АМП), результаты которого необходимы для назначения наиболее подходящей терапии и принятия мер по предотвращению распространения инфекции. Ошибки при выполнении тестирования чувствительности приводят к неправильному выбору антибиотиков для лечения и способствуют распространению резистентности к антибактериальным препаратам.

Для определения чувствительности патогенов к АМП в клинических микробиологических лабораториях используются различные методы, наиболее распространенным из них остается диско-диффузионный метод (ДДМ). Он подходит для тестирования большинства бактериальных патогенов, в том числе со сложными питательными потребностями. Метод является универсальным для широкого круга антимикробных препаратов и не требует обязательного использования специального обо-

рудования [3, 10]. Точность выполнения метода зависит от четкого соблюдения стандартных требований постановки теста (условий приготовления питательной среды, качества инокулята, качества и стандартности дисков с АМП, условий инокуляции и инкубации и др.). Критическим фактором, влияющим на результаты тестирования, является качество используемой питательной среды.

Ситуация, сложившаяся в нашей стране с наличием двух документов, регламентирующих методологию определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: устаревших, но не утративших юридическую силу методических указаний МУК 4.12.1890-04 и современных клинических рекомендаций, позволила обращаться на отечественном рынке несколькими питательными средами данного назначения — агару Мюллера–Хинтона, среде АГВ и др.

Ранее опубликованы результаты исследований качества различных питательных сред для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам в соответствии с МУК [4]. Отмечалось, что не все из исследованных питательных сред соответствовали требованиям нормативного документа по содержанию Ca^{2+} и Mg^{2+} , что приводило к заметным отклонениям значений диаметров зон подавления роста *Pseudomonas aeruginosa*

АТСС 27853 вокруг дисков в аминогликозидами и фторхинолонами. Установлено, что ни одна из отечественных питательных сред, включая агар Мюллера–Хинтон, не может быть использована для определения чувствительности микроорганизмов к сульфаниламидным препаратам из-за высокого содержания тимина и тимидина.

Анализ ситуации с питательными средами в нашей стране и необходимость гармонизации методологии определения чувствительности микроорганизмов к АМП с международными требованиями (рекомендации EUCAST — Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам и CLSI — Института клинических и лабораторных стандартов) подчеркивает актуальность организации производства отечественного стандартизованного агара Мюллера–Хинтон, для которого отсутствовали бы ограничения в использовании. Поэтому цель данной работы — сравнительная оценка качества нового отечественного агара Мюллера–Хинтон, разработанного в соответствии с современными требованиями, и импортных аналогов.

Материалы и методы

В работе исследовали агары Мюллера–Хинтон (МХА) семи фирм-производителей: BD BBL, кат. № 6103881, годен до 01.2020; HiMedia, кат. № M173, годен до 07.2019; BioRad, кат. № 64884, годен до 09.2021; Merck, кат. № 1.05437.0500, годен до 07.2017; BD Difco, кат. № 1073002, годен до 01.2018; ГНЦПМБ Оболенск, РУ № ФСР 2017/5962, годен до 07.2019.

Физико-химические и биологические свойства питательных сред оценивали в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методами контроля бактериологических питательных сред» по следующим показателям: рН, прочность студня агаровых сред по Валенту, чувствительность среды, характер и скорость роста тест-штаммов (контроль роста).

Концентрацию металлов измеряли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) на плазменном спектрометре iCAP-6500 Duo Thermo Scientific (Великобритания).

Определение чувствительности микроорганизмов к АМП диско-диффузионным методом и интерпретацию результатов проводили в соответствии с актуальными версиями клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» и документов Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST).

В работе использовали диски (BD BBL) с антимикробными препаратами, относящимися к разным группам и 11 тест-штаммов: *Escherichia coli* АТСС 25922 и АТСС 35218, *Staphylococcus aureus* АТСС 29213 и АТСС 25923, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 27853, *Enterococcus faecalis* АТСС 29212 и АТСС 51299, *Streptococcus pneumoniae* АТСС 49619, *Haemophilus influenzae* АТСС 49766 и АТСС 49247, *Klebsiella pneumoniae* АТСС 70060. Все тест-штаммы получены из Американской коллекции типовых культур (АТСС, LGC Standards).

Результаты

Разработка технологии производства питательной среды. Как известно, питательной основой агара Мюллера–Хинтон является солянокислотный гидролизат казеина (СГК), от качества которого в основном зависит качество питательной среды [11]. Включение в состав агара Мюллера–Хинтон коммерчески доступных СГК, включая технический СГК и технические казаминовые кислоты, не позволило получить питательную среду, удовлетворяющую требованиям клинических рекомендаций. Поэтому была разработана технология производства модифицированного солянокислотного гидролизата казеина специально для данной питательной среды. Разработанный СГК обладает высокой степенью расщепления (70–75%) и следующими характеристиками: рН 7,4–7,5, содержание аминного азота — 4,8–6,6%, хлоридов (в пересчете на натрия хлорид) — 23–34%.

Элементный состав СГК близок к элементному составу Casamino Acid, Technical, используемых в производстве агара Мюллера–Хинтон (табл. 1). Концентрации макроэлементов Na, K, S, Ca, Mg практически одинаковы в сравниваемых

Таблица 1. Концентрации элементов (мг/г) в кислотных гидролизатах казеина

Table 1. Metal ion concentration in casein acid hydrolysate (mg/g)

Гидролизаты Hydrolysate	Na	K	Ca	Mg	S	Mn	Fe	Co	Zn
СГК (Оболенск) Acid hydrolysate (Obolensk)	1536	1,38	0,21	0,08	4,56	0,002	0,019	0,0003	0,005
Casamino Acid, Technical (BD)	1443	1,74	0,19	0,07	4,24	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,02

мых гидролизатах. По содержанию микроэлементов гидролизаты также незначительно отличаются друг от друга.

В ходе исследований отработан процесс получения СГК с минимальным содержанием тимицина и/или тимидина, поскольку их избыток приводит к ложным результатам определения чувствительности *E. faecalis* к сульфаниламидам. Установлены требования к качеству компонентов питательной среды: крахмалу (влажность 7,0–8,0%), мясному экстракту (рН 6,6–7,0) и агару (влажность 3,0–4,0%, рН 7,4–7,6). Использование указанных компонентов с заданными характеристиками позволило получить МХА, удовлетворяющей требованиям современных нормативных документов. Питательная среда обеспечивает рост тест-штаммов с обычными питательными потребностями *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299, колонии которых вырастали из разведения 10^{-7} , содержащего примерно 10 КОЕ/мл.

На основании проведенных исследований разработаны технические условия (ТУ 9385-227-78095326-2015) и промышленный регламент (ПР 78095326-150-2015), а также инструкция

по применению. Питательная среда зарегистрирована в качестве медицинского изделия в Росздравнадзоре.

Сравнительные испытания агаров Мюллера–Хинтона различных фирм-производителей. Для оценки качества разработанной питательной среды проведены сравнительные испытания с агаром Мюллера–Хинтона пяти фирм-производителей диско-диффузионным методом. Сравнительные испытания проводили с использованием 11 контрольных штаммов, предусмотренных документами EUCAST и клиническими рекомендациями для проведения повседневного контроля качества процедуры определения чувствительности. Особое внимание уделяли тест-штаммам, являющимся индикаторами изменения состава питательной среды: *P. aeruginosa* ATCC 27853 — маркер изменения концентрации двухвалентных металлов: кальция (Ca), магния (Mg), цинка (Zn); *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 чувствительны к изменениям уровня марганца; *E. faecalis* ATCC 29212 — индикатор содержания тимицина/ тимидина [5].

В таблице 2 приведены данные в оценочных категориях, полученные при определении чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к ами-

Таблица 2. Оценка диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 относительно целевых значений и диапазонов, рекомендованных EUCAST

Table 2. Measuring diameter of growth inhibition zones for *P. aeruginosa* ATCC 27853 vs. target values and ranges recommended by EUCAST

Антимикробные препараты Antimicrobials	Допустимые значения диаметров, рекомендуемые EUCAST для контроля качества, мм EUCAST quality control (QC) range of diameter, mm	Фирмы — производители МХА MHA manufactured by					
	Целевые значения, мм Target values, mm	BD BBL	HiMedia	Bio-Rad	Merck	BD Difco	Оболонск Obolensk
Гентамицин 10 мкг Gentamycin 10 µg	17–23	C	LE	VL	H	C	C
	20						
Тобрамицин 10 мкг Tobramycin 10 µg	20–26	H	LE	L	H	C	C
	23						
Амикацин 30 мкг Amikacin 30 µg	18–26	H	L	L	C	H	C
	22						
Ципрофлоксацин 5 мкг Ciprofloxacin 5 µg	25–33	C	LE	C	VH	C	C
	29						
Имипенем 10 мкг Imipenem 10 µg	20–28	C	C	C	H	C	C
	24						
Меропенем 10 мкг Meropenem 10 µg	27–33	LE	C	L	H	L	L
	30						

Примечание: C — среднее значение находится в пределах ± 1 мм от целевого значения; H = High, среднее значение выше целевого на > 1 мм, но не более 2 мм; L = Low, среднее значение ниже целевого на > 1 мм, но не более 2 мм; VH = Very high, среднее значение выше целевого на > 2 мм, но оно находится в диапазоне допустимых значений; VL (Very low), среднее значение ниже целевого на > 2 мм, но оно находится в диапазоне допустимых значений; LE (Low error), среднее значение меньше нижнего допустимого значения диаметра.

Note: C — means within ± 1 mm of the target value; H = High, means above the target value > 1 mm, range within ± 2 mm of the target value; L = Low, means below the target value > 1 mm, range within ± 2 mm of the target value; VH = Very high, means above target value > 2 mm, fit within the QC range; VL = Very low, means below target value > 2 mm, fit within the QC range; LE = Low error, means out of the QC range towards low values.

ногликозидам, фторхинолонам и карбапенемам — антимикробным препаратам, активность которых зависит от содержания двухвалентных катионов в составе питательной среды.

В соответствии с требованиями клинических рекомендаций и рекомендаций EUCAST питательная среда идеально подходит для определения чувствительности, если значения диаметров подавления роста тест-штаммов вокруг дисков с АМП соответствуют целевым значениям, представляющим собой средние значения интервала допустимых значений. В нашем исследовании отклонения от целевых значений не более чем на ± 1 мм расценивали как незначительные и отмечали как С — корректные, соответствующие целевым значениям.

Отклонения результатов от целевых значений на > 1 , но не более 2 мм, как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения отмечали как Н (High) или L (Low) соответственно. Отклонения результатов 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 отклонении результатов в сторону уменьшения 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.

Как видно из таблицы, не все исследуемые питательные среды удовлетворяют требованиям нормативных документов. При определении чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к гентамицину, амикацину и тобрамицину, относящимся к классу аминогликозидных антибиотиков, ошибки в виде отклонений значений диаметров зон подавления роста, выходящие за рамки нижних допустимых пределов, отмечаются в питательной среде производства HiMedia.

При тестировании чувствительности тест-штамма к ципрофлоксацину также наблюдались LE-ошибки на МХА (HiMedia), 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 (BD BBL).

При тестировании тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 и тигециклина — препарата, активного в отношении полирезистентных патогенов, получены значения диаметров зон подавления роста *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 значительно ниже допустимого диапазона на единственной среде производства Merck.

Как известно, одной из возможных причин отклонений результатов определения чувствительности штаммов *P. aeruginosa* к аминогликозидам, фторхинолонам, карбапенемам, тетрациклинам от нормативных является ненадлежащий состав питательной среды, связанный с недопустимыми вариациями двухвалентных катионов [2]. Чрезмерное содержание ионов двухвалентных металлов уменьшает размеры зон, тогда как их низкое содержание может привести к неприемлемо большим зонам подавления роста.

Результаты определения элементного состава исследованных МХА представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы, концентрации кальция, магния, цинка и марганца в образцах МХА разных фирм-производителей отличались друг от друга. Наибольшая концентрация кальция обнаружена в МХА (Bio-Rad), а наименьшая — в МХА (Merck). У МХА Merck (МНА) был самый низкий уровень магния, а у МХА (НМ) — самая высокая концентрация кальция по сравнению с другими коммерческими МХА. По-видимому, высоким содержанием кальция и магния объясняются LE-ошибки и VL-отклонения при определении чувствительности к аминогликозидам и ципрофлоксацину на МХА (НМ) и МХА (Bio-Rad) соответственно.

Представленные в таблице 3 показывают, что концентрация Zn в шести образцах МХА находится ниже значения физиологической концентрации (0,8 мг/л), и только в МХА (BD BBL) превышает физиологическое значение

Таблица 3. Содержание металлов (мг/л) в агарах Мюллера–Хинтон различных производителей

Table 3. Metal ion concentration (mg/L) in Muller–Hinton agars provided by various manufacturers

Металлы Metals	BD BBL	НМ	Bio-Rad	Merck	BD Difco	Оболенск Obolensk
Ca	22,0	24,7	30,5	9,4	20,1	21,5
Mg	12,0	27,0	10,0	7,2	9,5	12,3
Zn	1,18	0,61	0,42	0,51	0,65	0,30
Mn	0,02	0,12	0,03	23,02	0,03	0,03
Fe	0,61	0,72	0,46	0,78	0,65	0,23

и составляет 1,18 мг/л. Возможно, высокая концентрация Zn в данной среде приводит к LE-ошибке при определении чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к меропенему.

В нашем исследовании концентрации ионов Mn во всех средах, кроме МХА (Merck), оказались невысокими 0,01–0,12 мг/л. В МХА (Merck) уровень марганца был более чем на 2 порядка выше и составил 23,02 мг/л. Существенным показателем качества агара Мюллера–Хинтона является концентрация тимина и/или тимидина. Наличие в питательной среде свободных тимина и тимидина снижает антимикробную активность *in vitro* антагонистов фолиевой кислоты — сульфаниламидных препаратов. Поэтому при определении чувствительности к сульфаниламидам и триметоприму используемые питательные среды должны содержать минимальные концентрации или не содержать вообще тимидина и тимина. Согласно требованиям нормативных документов, среда считается удовлетворительной по качеству, если значения диаметров зоны подавления роста *E. faecalis* ATCC 29212 вокруг диска с триметопримом/сульфаметоксазолом находятся в диапазоне 26–34 мм. В проведенном исследовании зоны подавления роста *E. faecalis* ATCC 29212 на всех средах соответствовали нормативным требованиям.

Обсуждение

Увеличение числа инфекций, вызванных устойчивыми к антимикробным препаратам микроорганизмами, требует знания точных результатов определения чувствительности возбудителя для выбора антибиотика в терапевтической схеме лечения. Самый доступный и широко распространенный метод определения чувствительности к антимикробным препаратам — диско-диффузионный метод — позволяет получать воспроизводимые результаты при условии использования качественной питательной среды. За 5 лет, прошедших с момента опубликования статьи, посвященной оценке качества обрабатываемых на российском рынке питательных сред для определения чувствительности к антибактериальным препаратам, произошли некоторые изменения. Эти изменения связаны с принятием новых клинических рекомендаций, разрешающих использование единственной питательной среды данного назначения — агара Мюллера–Хинтон, и с появлением на российском рынке МХА других фирм-производителей. Но, к сожалению, сохранилась ситуация с нестандартностью питательных сред. До сих пор на рынке представлена нестандартизованная среда АГВ, качество которой описано в других публикациях [3, 4].

Для обеспечения получения надежных результатов необходимо, чтобы концентрации катионов металлов в средах Мюллера–Хинтона соответствовали рекомендованным значениям, так как высокие или низкие значения могут привести к ложной устойчивости или ложной чувствительности соответственно. Следует отметить, только в МУК 4.12.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» содержатся конкретные требования к содержанию кальция и магния в средах для диско-диффузионного метода — 20–25 и 10–12,5 мг/л соответственно [1]. В клинических рекомендациях и стандартах EUCAST требования к физико-химическим показателям качества питательных сред, за исключением величины pH, вообще отсутствуют.

Если проследить эволюцию международных требований к содержанию Ca и Mg в составе МХА, то вначале это было 100 и 50 мг/л соответственно; затем 50 и 25 мг/л соответственно; далее — 20–25 и 10–12,5 мг/л соответственно. В конце 2016 г. международной организацией по стандартизации (ISO) разработан новый 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», который содержит описание физико-химических свойств и критерии оценки эффективности дегидратированных агара и бульона Мюллера–Хинтон, пригодных для тестирования чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам.

В новом документе ISO/TS 16782:2016 не обозначены конкретные требования по содержанию кальция и магния, лишь указано, что агар Мюллера–Хинтон должен иметь, такие концентрации ионов Ca и Mg, чтобы полученные значения диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* WDCM 00025 вокруг дисков с гентамицином находились в пределах допустимого диапазона.

Концентрации кальция и магния, измеренные в МХА в нашем исследовании, отличались между собой, а для четырех МХА не соответствовали требованиям МУК 4.12.1890-04. Возможно, высокие концентрации магния в МХА (НМ) и кальция в МХА (Bio-Rad) явились причиной LE-ошибок и VL-отклонений при тестировании чувствительности к аминогликозидам и фторхинолонам, а низкие значения концентраций указанных двухвалентных металлов в МХА (Merck) приводили к H-отклонениям.

Информацию о влиянии уровня цинка и марганца в среде МХА на результаты чувствительности к таким антимикробным препаратам, как глицилциклины, к которым от-

носится тигециклин, и карбапенемы, до появления ISO/TS 16782:2016 можно было найти только в отдельных публикациях [6–9, 12–13]. В документах EUCAST и клинических рекомендациях, указано, что тигециклин способен выявлять недопустимые вариации содержания не марганца, а магния в составе питательной среды. В документе ISO/TS 16782:2016 обозначены допустимые значения концентраций цинка и марганца в МХА: для цинка — ниже 3 мг/л и для марганца — ниже 8 мг/л.

Как показали наши исследования, концентрация Mn в МХА (Merck) оказалась значительно выше допустимого значения, что, вероятно, и привело к низким значениям диаметров зон подавления роста для *S. aureus* ATCC 25923 (17 ± 1 мм) и *E. faecalis* ATCC 29212 (17 ± 1 мм) вокруг дисков с тигециклином, которые не укладывались в требуемый диапазон значений: 19–25 мм и 20–26 мм, соответственно. Результаты тестирования еще одного тест-штамма *E. coli* ATCC 25922, рекомендованного ISO/TS 16782:2016 для определения пригодности МХА для работы с тигециклином, напротив, находились в требуемом диапазоне и составили 21 ± 1 мм при норме 20–27 мм. Полученные данные согласуются с результатами исследований испанских исследователей, которые показали, что из-за высокой концентрации марганца в среде фирмы Merck значения МПК для тигециклина, определенные с помощью E-test, значительно отличались от результатов, полученных на МХА (Difco) [12].

По содержанию цинка исследованные питательные среды соответствовали требованиям ISO/TS 16782:2016, однако на МХА (BD BBL) при концентрации цинка 1,18 мг/л обнаружены LE-ошибки при определении чувствительности *P. aeruginosa* ATCC 27853 к меропенему.

Результаты, полученные в данном исследовании, подтверждают важность стандартизации методологии оценки пригодности питательных сред при исследовании чувствительности *in vitro* в отношении не только Ca, Mg, но и Zn,

Mn, необходимость которой неоднократно обсуждалась в публикациях. В стандарте ISO/TS 16782:2016 на основании анализа публикаций приведены допустимые концентрации всех четырех металлов в бульоне Мюллера–Хинтон (МХБ), а в МХА только цинка и марганца. Для МХБ появились требования к производителям обязательно указывать точные концентрации катионов в каждой серии. Жаль, что русскоязычный аналог этого документа в виде ГОСТа пока не существует, и российским производителям приходится обращаться за информацией либо к разрозненным научным публикациям, либо к данному документу, не находящемуся даже в свободном доступе.

Несмотря на принятие нового стандарта ISO, с микробиологических лабораторий не снимается необходимость проведения входного контроля каждой новой серии питательной среды с обязательным использованием дисков с АМП, находящимися в работе.

Как показали результаты настоящего исследования только четыре из шести проанализированных МХА удовлетворяют требованиям нормативных документов в отношении тестирования чувствительности микроорганизмов к сульфаниламидным препаратам, аминогликозидам, фторхинолонам и даже к карбапенемам. В этом списке находится и недавно зарегистрированный МХА (Оболенск).

Конечно, переход лабораторий страны к использованию агара Мюллера–Хинтон — это требование времени, и выбирая МХА, важно использовать питательную среду надлежащего качества, отвечающую всем требованиям современных нормативных документов.

Благодарности

Выражаем искреннюю благодарность Колотову В.П. и сотрудникам ФГБУН Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН за помощь в определении содержания металлов в питательных средах.

Список литературы/References

1. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания (МУК 4.12.1890-04). М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с. [Antibacterial susceptibility testing: Guidelines (МУК 4.12.1890-04). Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Russian Ministry of Health, 2004, 91 p. (In Russ.)]
2. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Клинические рекомендации. 206 с. Версия 2018-03. [Antimicrobial susceptibility testing. Clinical recommendations. 206 p. Version 2018-03]. URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf> (22.05.2019)
3. Решедько Г.К., Стецюк О.У. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001. № 4. С. 348–354. [Reshedko G.K., Stetsyuk O.U. Features of antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion method. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, no. 4, pp. 348–354. (In Russ.)]
4. Шепелин А.П., Морозова Т.П., Косилова И.С., Глазкова Г.П., Домотенко Л.В. Оценка качества питательных сред для определения чувствительности к антибактериальным препаратам // Дезинфекция. Антисептика. 2013. № 1. С. 43–48.

- [Shepelin A.P., Morozova T.P., Kosilova I.S., Glazkova G.P., Domotenko L.V. The assessment of quality of nutrient media for determination of sensitivity to antimicrobial preparations. *Desinfekciya. Antiseptika = Disinfection. Antiseptic*, 2013, no. 1, pp. 43–48. (In Russ.)]
5. Andrews J., Walker R., King A. Evaluation of media available for testing the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by BSAC methodology. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, vol. 50, no. 4, pp. 479–486.
 6. Cooke P., Heritage J., Kerr K., Hawkey P.M. Kenneth E. Different effects of zinc ions on in vitro susceptibilities of *Stenotrophomonas maltophilia* to Imipenem and Meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, vol. 40, no. 12, pp. 2909–2910.
 7. 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, vol. 35, no. 4, pp. 1027–1029.
 8. Fernandez-Mazarrasa C., Mazarrasa O., Calvo J., del Arco A., Martínez-Martínez L.J. High concentrations of manganese in Mueller-Hinton agar increase MICs of tigecycline determined by Etest. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 3, pp. 827–829.
 9. Girardello P.J., Bispo M., Yamanaka T.M., Galesa A.C. Cation concentration variability of four distinct Mueller-Hinton agar brands influences polymyxin B susceptibility results. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 7, pp. 2414–2418.
 10. Matuschek E., Brown D.F.J., Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, vol. 20, no. 4, pp. 255–266.
 11. Mueller J.H., Hinton J. A protein-free medium for isolation of *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1941, vol. 48, no. 1, pp. 330–333.
 12. Thamlikitkul V., Tiengrim S. Effect of different Mueller–Hinton agars on tigecycline disc diffusion susceptibility for *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2008, vol. 62, no. 4, pp. 847–848.
 13. Veenemans J., Mouton J.W., Kluytmans J.A.J.W., Donnelly R., Verhulst C., van 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, vol. 50, no. 9, pp. 3077–3079.

Авторы:

Домотенко Л.В., к.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;

Косилова И.С., младший научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред, п. Оболенск, Россия;

Шепелин А.П., д.б.н., зам. директора по научно-производственной деятельности ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия.

Authors:

Domotenko L.V., PhD (Chemistry), Leading Researcher, Nutrient Media Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Kosilova I.S., Junior Researcher, Nutrient Media Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Shepelin A.P., PhD, MD (Biology), Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.06.2018
Отправлена на доработку 22.03.2019
Принята к печати 26.03.2019

Received 23.06.2018
Revision received 22.03.2019
Accepted 26.03.2019