**Приготування поживних середовищ для досліджень диско-дифузійним методом EUCAST та визначення МІК методом мікророзведення у бульйоні**

**Зміни порівняно із попередньою версією (в. 8.0)**

**А. Середовища для диско-дифузійного методу**

|  |  |
| --- | --- |
| **Розділ** | **Зміни** |
| Вступ | Додано інформацію щодо приготування чашок з агаром Мюллера Хінтона з дефібринованою баранячою кров’ю (MХ-Б) як альтернативи MХ-В, коли MХ-В недоступний. |
| Вступ | Абревіатуру для середовища, що використовується для диско- дифузійного методу для анаеробних бактерій, змінено з FAA на FAA-HB на сторінці 2. |

**А. Середовища для диско-дифузійного методу\***

**Агар Мюллера-Хінтона (МХА) та МХА з додаванням дефібринованої кінської крові та β-НАД (МХ-В)**

**Агар МХА,** агар Мюллера-Хінтона без добавок**,** використовується для досліджень невибагливих мікроорганізмів.

**Агар МХА-B**, МХА із додаванням 5% механічно дефібринованої кінської крові та 20 мг/л β-НАД, використовується для визначення чутливості *Streptococcus spp. (*у тому числі *S. pneumoniae), Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni* і *coli, Pasteurella multocida, Corynebacterium spp., Aerococcus sanguinicola* і *urinae* та *Kingella kingae.*

**Агар MХА-Б**, MХА з додаванням 5% дефібринованої овечої крові, можна використовувати для більшості видів як альтернативу MХА-В, коли MХА-В недоступний. Більше інформації доступно на сайті http://www.eucast.org. Агарові чашки MХА-Б слід готувати відповідно до інструкцій з приготування агарових чашок MХА-В, за винятком того, що єдиною добавкою є 5% дефібринованої овечої крові.

Чашки із середовищем можна придбати в готовій формі із комерційних джерел або приготувати на місці наступним чином. Сухе поживне середовище Мюллера-Хінтона повинне відповідати вимогам Технічної специфікації ISO, ISO/TS 16782, 2016 та критеріям контролю якості, опублікованим EUCAST

\*Для диско-дифузійного методу для анаеробних бактерій EUCAST рекомендує середовище Агар для Вибагливих Анаеробів з 5% дефібринованої кінської крові (Fastidious Anaerobe Agar, FAA-НВ). Для приготування FAA-НВ див. керівництво з диско-дифузійного методу для вибраних анаеробних бактерій на http://www.eucast.org.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |

Чашки із середовищами МХА та МХА-В готують наступним чином:

|  |  |
| --- | --- |
| 1. **Реагенти** | |
| 1.1 | Порошок агару МХА комерційного виробництва |
| 1.2. | Механічно дефібринована кінська кров. |
| 1.3. | β-нікотинамід аденін дінуклеотид (β-НАД), ступінь чистоти ≥ 98%. |

|  |  |
| --- | --- |
| 1. **Приготування базового розчину β-НАД** | |
| 2.1. | Розчинити β-НАД у стерильній деіонізованій воді до концентрації 20 мг/мл. |
| 2.2. | Стерилізувати розчин крізь мембранний фільтр з діаметром пор 0,2 мкм. |
| 2.3. | Базовий розчин можна зберігати при температурі -20°С у аліквотах та розморожувати за потреби. Не заморожувати повторно розчин, який не був використаний. |

|  |  |
| --- | --- |
| 1. **Приготування чашок із середовищем** | |
| 3.1. | Приготувати та стерилізувати в автоклаві агар МХА згідно з інструкцією виробника. |
| 3.2. | Охолодити середовище до 42-45°С. |
| 3.3. | Для приготування MX-В в стерильних умовах додати 50 мл механічно дефібринованої кінської крові та 1 мл базового розчину β-НАД на 1 літр середовища. Ретельно розмішати та негайно розлити у чашки. |
| 3.4. | Розлити середовище у стерильні чашки Петрі, товщиною 4 ± 0,5 мм (приблизно 25 мл на круглу чашку діаметром 90 мм, 31 мл на круглу чашку діаметром 100 мм, 71 мл на круглу чашку діаметром 150 мм, 40 мл на квадратну чашку із стороною 100 мм). Переконайтесь, що об’єм розраховано коректно, на основі правильного розміру чашок Петрі, які використовуються. Розміри чашок можуть відрізняти в залежності від виробника |
| 3.5. | Дати середовищу застигнути перед тим, як переміщати чашки. |
| 3.6. | Поверхня середовища має бути сухою перед використанням. Не повинно бути видимих крапель води на поверхні агару або на внутрішній поверхні кришки. Якщо необхідно підсушить чашки із середовищем при 20-25 0С протягом ночі, або при 35 0С з напіввідкритою кришкою протягом 15 хв. Не пересушуйте чашки із середовищем. |

|  |  |
| --- | --- |
| **4. Зберігання чашок із середовищем** | |
| 4.1. | Середовища виготовлені в лабораторії зберігайте при 4-8 °С. |
| 4.2. | Підсушування середовищ, умови та термін зберігання середовищ, виготовлених у лабораторії, визначаються у межах програми забезпечення якості в лабораторії. |
| 4.3. | Середовища комерційного виготовлення необхідно зберігати згідно рекомендацій виробника та використовувати з урахуванням терміну зберігання, вказаного на етикетці. |
| 4.4. | Чашки із середовищем (як комерційного виготовлення, так і ті, що готують в лабораторії), необхідно зберігати в пластикових пакетах або у герметичних контейнерах, може знадобитися підсушування перед використанням. Це необхідно для того, щоб прибрати надлишок вологи, що може призвести до проблем з нечіткими межами зони та/або туманом у межах зон. |

|  |  |
| --- | --- |
| **5. Контроль якості** | |
| 5.1. | Використовувати поверхневий рН електрод, щоб перевірити, чи рівень рН знаходиться у межах 7,2-7,4. |
| 5.2. | Перевірити, що товщина агару знаходиться у межах 4 ± 0,5 мм |
| 5.3. | Перевірити, чи середовище забезпечує гарний ріст контрольного(-их) штаму(-ів) мікроорганізмів, призначених для тестування. |
| 5.4. | Виконати диско-дифузійний метод для контрольних штамів відповідно до рекомендацій EUCAST та перевірити, чи зони інгібіції знаходяться у межах дозволених відхилень для всіх комбінацій бактерій та антимікробних агентів, що використовуються (EUCAST QC tables). |

**Б. Середовище для визначення МІК методом мікророзведення у бульйоні**

**Бульйон Мюллера-Хінтона із стандартизованим вмістом катіонів (БМХ) та БМХ із додаванням лізованої кінської крові та β-НАД (бульйон MX-В)**

**Бульйон МХ,** бульйон Мюллера-Хінтона без добавок із стандартизованим вмістом катіонів, використовується для досліджень невибагливих мікроорганізмів згідно стандарту ISO 20776-1, 2019.

**Бульйон МХ-В**, бульйон МХ із стандартизованим вмістом катіонів із додаванням 5% лізованої кінської крові та 20 мг/л β-НАД, використовується для досліджень *Streptococcus spp. (*у тому числі *S. pneumoniae), Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni* та *coli, Pasteurella multocida, Corynebacterium spp., Aerococcus sanguinicola* та *urinae* і *Kingella kingae* та деяких інших вибагливих мікроорганізмів.

Бульйон МХ-В без добавок може бути придбаний із комерційних джерел або виготовлений у лабораторії відповідно до інструкції виробника. Бульйон Мюллера-Хінтона повинен відповідати вимогам Технічної специфікації ISO, ISO/TS 16782, 2016 та критеріям контролю якості, опубліковані EUCAST.

**Бульйон МХ-В готують наступним чином:**

|  |  |
| --- | --- |
| 1. **Реагенти** | |
| 1.1. | БМХ із стандартизованим вмістом катіонів, комерційного походження |
| 1.2. | 50% лізована кінська кров. |
| 1.3. | β-нікотинамід аденін динуклеотид (β-НАД), ступінь чистоти ≥ 98%. |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. **Приготування базового розчину 50% лізованої кінської крові** | | |
| 2.1. | В стерильних умовах розведіть кінську кров рівною кількістю стерильної деіонізованої води. | |
| 2.2. | Заморозьте кров при -20°С протягом ночі та розморозити. Повторити цикли, доки клітини повністю не розчиняться (трьох циклів зазвичай достатньо, але за стандартом ISO 20776-1 може знадобитись до семи циклів). | |
| 2.3. | Зробіть 50% лізовану кінську кров прозорою методом центрифугування. Прозорий розчин дуже важливий для обліку результатів. Неможливість зробити розчин прозорим може виникнути завдяки неналежному розчиненню або центрифугуванню. Повторне центрифугування може покращити прозорість розчину. | |
| 2.4. | Базовий розчин можна зберігати при температурі -20°С у аліквотах та розморожувати, якщо необхідно. Не заморожувати повторно розчин, який не був використаний. | |
| 1. **Приготування базового розчину β-НАД** | | |
| 3.1. | | Розчиніть β-НАД у стерильній деіонізованій воді до концентрації 20 мг/мл. |
| 3.2. | | Стерилізуйте розчин крізь мембранний фільтр із розміром пор 0,2 мкм. |
| 3.3. | | Базовий розчин можна зберігати при температурі -20°С у аліквотах та розморожувати за необхідності. Не заморожувати повторно розчин, який не був використаний. |

|  |  |
| --- | --- |
| 1. **Приготування бульйону МХ-В** | |
| 4.1. | Приготуйте та стерилізуйте в автоклаві бульйон МХ згідно інструкції виробника, використовуючи на 100 мл деіонізованої води менше, щоб можна було додати лізовану кінську кров. |
| 4.2. | Охолодіть середовище до 42-45°С. |
| 4.3. | В стерильних умовах додайте 100 мл 50% лізованої кінської крові та 1 мл базового розчину β-НАД на літр середовища та ретельно перемішайте. |
| 4.4. | Розлийте бульйон МХ-В в стерильні флакони із кришками що закручуються. |

|  |  |
| --- | --- |
| 1. **Зберігання бульйону МХ-B** | |
| 5.1. | Зберігайте бульйон МХ-В при температурі в 4-8°С. |
| 5.2. | Умови зберігання та термін зберігання визначаються у межах програми забезпечення якості в лабораторії. Термін зберігання – 3 місяці. |

|  |  |
| --- | --- |
| 1. **Контроль якості** | |
| 6.1. | Перевірте, чи рівень рН знаходиться у межах 7.2-7.4. |
| 6.2. | Перевірте, чи середовище забезпечує гарний ріст контрольного (-их) штаму (-ів) мікроорганізмів, призначених для тестування. |
| 6.3. | Перевірте, чи МІК знаходяться у межах дозволених відхилень для всіх комбінацій бактерій та антимікробних агентів, що використовуються (EUCAST QC tables). |