

Приготовление питательных сред для диско-диффузионного метода EUCAST и определения МПК методом микроразведений в бульоне

Изменения по отношению к предыдущей версии (v. 4.0)

А. Среды для диско-диффузионного метода

Раздел	Изменения
Введение	Добавлены <i>Aerococcus sanguinicola</i> и <i>urinae</i> и <i>Kingella kingae</i> .
3.4	Добавлена информация по размерам чашек Петри.
3.6	Добавлена информацию по подсушиванию чашек.
4.1	Изменены рекомендации по хранению чашек с агаром, приготовленных в лаборатории.

В. Среда для определения МПК методом микроразведений в бульоне

Раздел	Изменения
Введение	Добавлены <i>Aerococcus sanguinicola</i> и <i>urinae</i> и <i>Kingella kingae</i> .
2.1	Добавлено пояснение о необходимости использования дефибринированной лошадиной крови.

А. Среды для диско-диффузионного метода

Агар Мюллера-Хинтон (МХА) и агар Мюллера-Хинтон с добавлением дефибринированной лошадиной крови и β-НАД (МХ-П)

МХА, агар Мюллера-Хинтон (без добавок), используется для определения чувствительности непривередливых микроорганизмов.

МХА-П, агар Мюллера-Хинтон с добавлением 5% механически дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД, используется для определения чувствительности *Streptococcus* spp. (включая *S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* и *coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* и *urinae* и *Kingella kingae*.

Можно использовать чашки с агаром коммерческого производства или приготовленные в лаборатории в соответствии со следующей процедурой:

1. Материалы	
1.1	Агар МХ сухой, полученный из коммерческих источников.
1.2	Механически дефибринированная лошадиная кровь.
1.3	β-никотинамидадениндинуклеотид (β-НАД), чистота ≥98%.

2. Приготовление основного раствора β-НАД	
2.1	Растворить необходимое количество β-НАД в стерильной деионизированной воде для получения раствора с концентрацией 20 мг/мл.
2.2	Простерилизовать раствор через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.
2.3	Основной раствор можно хранить в аликвотах при температуре -20°C и размораживать по мере необходимости. Нельзя повторно замораживать неиспользованный раствор.

3. Приготовление чашек с агаром	
3.1	Приготовить и автоклавировать агар МХ согласно инструкции производителя.
3.2	Охладить до 42-45°C.
3.3	Для приготовления агар МХ-П к 1 л среды асептически добавить 50 мл механически дефибрированной лошадиной крови и 1 мл основного раствора β-НАД. Тщательно перемешать и сразу разлить по чашкам.
3.4	Разлить среду в стерильные чашки Петри до получения слоя агара глубиной 4 ± 0,5 мм (приблизительно 25 мл в круглую чашку диаметром 90 мм, 31 мл в круглую чашку диаметром 100 мм, 71 мл – в круглую чашку диаметром 150 мм, 40 мл – в квадратную чашку размером 100x100 мм). Точный объем среды для каждого типа чашек рассчитывается на основании измерения истинной глубины слоя агара, получающейся в используемых чашках Петри. Размеры чашек могут отличаться у разных производителей.
3.5	Не следует перемещать чашки до застывания агара.
3.6	Перед использованием необходимо убедиться, что поверхность агара сухая. На поверхности агара или на внутренней стороне крышки не должно быть видимых капель влаги. При необходимости чашки следует подсушить при 20-25°C в течение 16-20 ч или при 35°C с открытыми крышками в течение 15 мин. Чашки нельзя пересушивать.
4. Хранение чашек с агаром	
4.1	Чашки с агаром, приготовленные в лаборатории, должны храниться при 4-8°C.
4.2	Процедура подсушивания, условия и длительность хранения чашек с агаром, приготовленным в лаборатории, должны быть определены программой внутрилабораторного контроля качества.
4.3	Чашки с агаром коммерческого производства должны храниться в соответствии с инструкциями производителя и использоваться до истечения срока годности, указанного на упаковке.
4.4	Чашки с агаром (коммерческого производства или приготовленные в лаборатории), которые хранятся в плотно закрытых контейнерах или пластиковых пакетах, иногда требуется подсушить перед использованием, так как при высокой влажности поверхности среды возможно формирование нечеткого края зоны подавления роста.
5. Контроль качества	
5.1	С помощью поверхностно-активного электрода следует убедиться в том, что рН среды находится в пределах 7,2-7,4.
5.2	Проверить глубину агара. Требуемая толщина слоя агара 4 ± 0,5 мм.

5.3	Необходимо проверить, что среда обеспечивает надлежащий рост контрольного(ых) микроорганизма(ов) тех видов, для определения чувствительности которых она предназначена.
5.4	Необходимо выполнять контроль качества с использованием контрольных штаммов в соответствии с рекомендациями EUCAST и проверить соответствию диаметров зон подавления роста допустимым диапазонам для всех исследуемых комбинаций микроорганизм-антибиотик (EUCAST QC tables).

В. Питательная среда для определения МПК методом микроразведений в бульоне

Катион-сбалансированный бульон Мюллера-Хинтон (МХБ), и МХБ с добавлением лизированной лошадиной крови и β-НАД (МХ-П бульон)

МХБ, катион-сбалансированный бульон Мюллера-Хинтон (без добавок), используется для определения чувствительности непривередливых микроорганизмов в соответствии со стандартом ISO 20776-1, 2006.

МХБ, катион-сбалансированный бульон МХ с добавлением 5% лизированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД, используется для определения чувствительности *Streptococcus* spp. (включая *S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* и *coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* и *urinae*, *Kingella kingae* и некоторых других привередливых микроорганизмов.

МХБ без добавок может быть приобретен из коммерческих источников или готовиться в лаборатории в соответствии с инструкциями производителя.

Бульон МХ-П готовится в соответствии со следующей процедурой:

1. Материалы	
1.1	Катион-сбалансированный МХБ коммерческого производства.
1.2	50% лизированная лошадиная кровь.
1.3	β-никотинамидадениндинуклеотид (β-НАД), чистота ≥98%.

2. Приготовление основного раствора 50% лизированной лошадиной крови	
2.1	Асептически растворить механически дефибрированную лошадиную кровь в равном количестве стерильной деионизированной воды.
2.2	Заморозить кровь при -20°C в течение 16-20 ч, затем дать ей оттаять. Повторить процедуру до полного лизиса клеток (обычно достаточно 3 циклов, однако в стандарте ISO указано, что для этого может потребоваться до 7 циклов).
2.3	Осветлить 50% лизированную лошадиную кровь путем центрифугирования,

	осадок сбросить. Прозрачность раствора необходима для надлежащего учета результатов. Причиной недостаточной прозрачности раствора может быть неадекватный лизис или центрифугирование. Для увеличения прозрачности раствора можно повторить процедуру центрифугирования.
2.4	Основной раствор можно хранить в аликвотах при температуре -20°C и размораживать по мере необходимости. Нельзя повторно замораживать неиспользованный раствор.

3. Приготовление основного раствора β-НАД

3.1	Растворить β-НАД в стерильной деионизированной воде до концентрации 20 мг/мл.
3.2	Простерилизовать раствор через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.
3.3	Основной раствор можно хранить в аликвотах при температуре -20°C и размораживать по мере необходимости. Нельзя повторно замораживать неиспользованный раствор.

4. Приготовление бульона МХ-П

4.1	Приготовить и проавтоклавить катион-сбалансированный МХБ в соответствии с инструкцией производителя, при этом для приготовления каждого литра среды использовать на 100 мл деионизированной воды меньше, чем указано в инструкции – оставшийся объем займет лизированная лошадиная кровь.
4.2	Охладить среду до 42-45°C.
4.3	На каждый литр среды асептически добавить 100 мл 50% лизированной лошадиной крови и 1 мл основного раствора β-НАД. Тщательно перемешать.
4.4	Разлить бульон МХ-П в стерильные контейнеры с завинчивающимися крышками.

5. Хранение бульона МХ-П

5.1	Хранить бульон МХ-П при 4-8°C.
5.2	Условия и длительность хранения чашек с агаром должны быть определены программой внутрилабораторного контроля качества. Предполагаемый срок хранения – 3 мес.

6. Контроль качества

6.1	Убедиться, что pH находится в пределах 7,2-7,4.
6.2	Необходимо проверить, что среда обеспечивает надлежащий рост контрольного(ых) микроорганизма(ов), для определения чувствительности которых она предназначена.
6.3	Необходимо проверить, что МПК соответствуют допустимым диапазонам для всех исследуемых комбинаций микроорганизм-антибиотик (EUCAST QC tables).