

Приготування середовища для диско-дифузійного випробування та визначення величин МДІ методом мікророзчинення бульйону

А. Середовище для диско-дифузійного випробування

Агар Мюлера-Хінтона (АМХ) та АМХ з додаванням дефіброваної кінської крові та β-НАД (МХ-Ф)

Агар МХ використовується для диско-дифузійного випробування мікроорганізмів з нескладними поживними потребами.

Агар МХ-Ф, МХ із додаванням 5% механічно дефіброваної кінської крові та 20 мг/л β-НАД, використовується для випробування *Streptococcus spp.* (у тому числі *S. pneumoniae*), *Haemophilus spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium spp.* та декількох інших мікроорганізмів зі складними поживними потребами.

Пластини з агаровим середовищем можна придбати в готовій формі або приготувати на місці наступним чином:

Реагенти	
1.	Порошок АМХ, що є у продажу
2.	Механічно дефібрована кінська кров.
3.	β-нікотинамід аденін дінуклеотид (β-НАД), ступінь чистоти ≥ 98%.

Приготування базового розчину β-НАД	
1.	Розчинити β-НАД у стерильній деіонізованій воді до концентрації 20 мг/мл.
2.	Стерилізувати розчин крізь 0,2 мкл мембранний фільтр.
3.	Базовий розчин можна зберігати при температурі -20°C у кратних пробах та розмороженому стані. Не заморожувати повторно розчин, що не використовується.

Приготування пластин з агаровим середовищем	
1.	Приготувати та стерилізувати в автоклаві АМХ згідно інструкціям виробника.
2.	Охолодити середовище до 42-45°C.
3.	Для приготування МХ-Ф в стерильних умовах додати 50 мл механічно дефіброваної кінської крові та 1 мл базового розчину β-НАД на літр середовища. Належним чином змішати та негайно дозувати.
4.	Дозувати середовище у стерильні чашки Петрі, щоб забезпечити рівну глибину в 4 мм ± 0,5 мм (приблизно 25 мл на 90 мм круглій пластині, 31 мл на 100 мм круглій пластині, 71 мл на 150 мм круглій пластині, 40 мл на 100 мм квадратній пластині).
5.	Дозволити агару осісти перед тим, як переміщати пластини.
6.	Поверхня агару має бути сухою перед використанням. Потреба у висушуванні пластин та тривалість періоду, необхідного для висушування поверхні агару, залежить від умов зберігання та висушування. Не пересушувати пластини.

Зберігання пластин з агаровим середовищем	
1.	Зберігати пластини у пластмасових коробках, які провітрюються, при температурі у 8-10°C. Якщо пластини зберігають більше семи днів, може знадобитися альтернативне зберігання, наприклад, зберігання пластин при температурі 4-8°C у герметичних пластмасових пакетах.
2.	Висушування пластин, умови зберігання та термін зберігання для пластин, приготовлених на місці, визначаються у межах програми забезпечення якості в лабораторії.
3.	Пластини, приготовлені в промислових масштабах, необхідно зберігати згідно рекомендаціям виробника та використовувати з урахуванням терміну зберігання, вказаного на етикетці.
4.	Пластини з агаровим середовищем МХ-Ф (як ті, що купують, так і ті, що готують на місці), які зберігаються в пластмасових пакетах або у герметичних контейнерах, може знадобитися висушити перед використанням. Це необхідно для того, щоб запобігти надлишку вологи, що може призвести до проблем з нечіткими межами зони та/або туманом у межах зон.

Контроль якості	
1.	Використовувати поверхневий рН електрод, щоб перевірити, чи рівень рН знаходиться у межах 7.2-7.4.
2.	Перевірити, що глибина агару знаходиться у межах 4 мм ± 0,5 мм
3.	Перевірити, чи середовище підтримує гарне зростання контрольного (-их) штаму (-ів) мікроорганізмів, призначених для випробування.
4.	Перевірити, чи зони інгібування знаходяться у межах дозволених відхилень для всіх комбінацій бактерій та антимікробних речовин, що використовуються.

Б. Середовище для визначення МДІ методом мікророзчинення бульйону

Бульйон Мюлера-Хінтона із вмістом катіонів (БМХ) та БМХ із додаванням лізованої кінської крові та β-НАД (бульйон МХ-Ф)

Бульйон МХ, без додавання бульйону Мюлера-Хінтона із вмістом катіонів, використовується для випробування мікроорганізмів з нескладними поживними потребами методом мікророзчинення бульйону згідно стандарту ISO 20776-1, 2006.

Бульйон МХ-Ф, бульйон МХ із додаванням 5% лізованої кінської крові та 20 мг/л β-НАД, використовується для випробування *Streptococcus spp.* (у тому числі *S. pneumoniae*), *Haemophilus spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium spp.* та декількох інших мікроорганізмів зі складними поживними потребами.

Бульйон МХ-Ф готують наступним чином:

Реагенти	
1.	БМХ із вмістом катіонів, що є у продажу
2.	50% лізована кінська кров.
3.	β-нікотинамід аденін дінуклеотид (β-НАД), ступінь чистоти ≥ 98%.

Приготування базового розчину 50% лізованої кінської крові	
1.	В стерильних умовах розбавити кінську кров у рівній кількості стерильної деіонізованої води.
2.	Заморозити кров при -20°C протягом ночі та розтопити. Повторювати цикл, доки клітини повністю не розчиняться (трьох циклів зазвичай достатньо, але стандарт ISO 20776-1 передбачає до семи циклів).
3.	Зробити 50% лізовану кінську кров прозорою методом центрифугування. Прозорий розчин дуже важливий для отримання результатів. Неможливість зробити розчин прозорим може виникнути завдяки неналежному розчиненню або центрифугуванню. Повторне центрифугування може покращити прозорість розчину.
4.	Базовий розчин можна зберігати при температурі -20°C у кратних пробах та розмороженому стані, якщо необхідно. Не заморожувати повторно розчин, що не використовується.

Приготування базового розчину β-НАД	
1.	Розчинити β -НАД у стерильній деіонізованій воді до концентрації 20 мг/мл.
2.	Стерилізувати розчин крізь 0,2 мкл мембранний фільтр.
3.	Базовий розчин можна зберігати при температурі -20°C у кратних пробах та розмороженому стані. Не заморожувати повторно розчин, що не використовується.

Приготування бульйону МХ-Ф	
1.	Приготувати та стерилізувати в автоклаві БМХ згідно інструкціям виробника, використовуючи на 100 мл деіонізованої води менше на 1 літр, щоб дозволити додавання лізованої кінської крові.
2.	Охолодити середовище до $42-45^{\circ}\text{C}$.
3.	В стерильних умовах додати 100 мл 50% лізованої кінської крові та 1 мл базового розчину β -НАД на літр середовища та належним чином змішати.
4.	Дозувати бульйон МХ-Ф в стерильні контейнери з нарізними кришками.

Зберігання бульйону МХ-Ф	
1.	Зберігати бульйон МХ-Ф при температурі в $4-8^{\circ}\text{C}$.
2.	Умови зберігання та термін зберігання визначаються у межах програми забезпечення якості в лабораторії. Термін зберігання – 3 місяці.

Контроль якості	
1.	Перевірити, чи рівень рН знаходиться у межах 7.2-7.4.
2.	Перевірити, чи середовище підтримує гарне зростання контрольного (-их) штаму (-ів) мікроорганізмів, призначених для випробування.
3.	Перевірити, чи МДІ знаходяться у межах дозволених відхилень для всіх комбінацій бактерій та антимікробних речовин, що використовуються.