

Mueller Hinton 2 agar (MH2-D)**Мюллер-Хинтон агар 2**

Определение чувствительности к антибиотикам и сульфамидам

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Агар Мюллер-Хинтон 2 предназначен для определения чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом (1, 2).

ПРИНЦИП

Состав агара Мюллер-Хинтон обеспечивает хороший рост неприхотливых бактерий (энтеробактерий, аэробных и микроаэрофильных грамотрицательных палочек, стафилококков и энтерококков), встречающихся в клинической практике, оказывая минимальное влияние на результаты определения чувствительности (1, 2).

При добавлении 5% бараньей крови агар можно использовать для определения чувствительности видов, требующих наличия крови для роста (пневмококки и другие стрептококки).

Концентрация двухвалентных ионов в агаре оптимальна для определения чувствительности к аминогликозидам и тетрациклинам представителей рода *Pseudomonas*.

Добавление тимина - тимидина (ингибиторы сульфамидов) в небольших концентрациях предотвращает рост вокруг дисков, благодаря чему возможно точное определение диаметра зон ингибирования роста (3, 4, 5).

СОСТАВ НАБОРА

	Сухая среда
REF 51075	500 г флакон

СОСТАВ**Расчетная формула после растворения**

Состав среды можно модифицировать в соответствии с объектами и целями исследования:

Казеин (бычий)	17,5 г
Мясной экстракт (бычий или свиной).....	2 г
Картофельный крахмал.....	1,5 г
Агар.....	17 г
Дистиллированная вода	1 л

Ионы Ca ⁺⁺	50 мг
Ионы Mg ⁺⁺	25 мг

pH 7.3

НЕОБХОДИМЫЕ РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В НАБОР**Реактивы:**

- Диски с антибиотиками.

Материалы:

- Автоклав.
- Стерильные чашки Петри.
- Автоклавируемые флаконы.
- Термостат.
- Водяная баня.дополнительные реактивы
- Дефибринированная баранья кровь (Ref. 55822 или 55823)

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- **Только для диагностики *in vitro*.**
- **Для профессионального использования.**
- Данный набор содержит вещества животного происхождения. Сертификат происхождения и/или санитарного состояния животных, от которых были получены данные материалы, не гарантирует отсутствия трансмиссивных патогенных микроорганизмов. Рекомендуется обращаться с этими веществами как потенциально опасными в соответствии с принятыми нормами (не вдыхать, не глотать).
- При работе с образцами и микробными культурами необходимо соблюдать стерильность в соответствии с "CLSI[®] M29-A, Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – действующая версия". За дополнительной информацией обращайтесь к "*Biosafety in Microbiological and Biochemical Laboratories* - CDC/NIH – Последнее издание", а также нормативам, принятым в Вашей стране.
- Среду для культивирования нельзя использовать в качестве сырья при производстве.
- Не используйте реактивы по истечении срока годности.
- Не используйте среду при наличии комков и других включений.
- При вскрытии флакона убедитесь в целостности пробки.
- Тщательно закрывайте флаконы после использования.
- Не открывайте флаконы во влажной атмосфере (пар, испарения).
- Среда предназначена для использования в соответствии со стандартами CLSI/NCCLS и CA-SFM. При использовании других стандартов лаборатории следует самостоятельно утвердить метод и корректность результатов.
- При интерпретации результатов следует принимать во внимание результаты идентификации (природную устойчивость), эпидемиологический контекст и, при необходимости, результаты других исследований.

ХРАНЕНИЕ

- **Хранить при 2-30°C до истечения срока годности.**
- Беречь от влаги.
- Держать тщательно закрытыми.
- Не открывать флакон более 10 раз.

ОБРАЗЦЫ

Данная среда не предназначена для работы непосредственно с клиническими образцами или культуральной массой.

На среду следует вносить стандартизованную суспензию чистой культуры после выделения на твердой среде.

ПРИМЕНЕНИЕ**Подготовка:**

1. Растворите 38 г порошка в 1 литре дистиллированной или деминерализованной воды.
2. Тщательно перемешайте.
3. Доведите до кипения (однородного состояния).
4. Разлейте по флаконам.
5. Автоклавируйте в течение 15 минут при 116 °С.
6. Оставьте при комнатной температуре минимум на 15 секунд, затем перенесите в термостатируемую водяную баню, установленную на 45-50°С. Оставьте при этой температуре вплоть до использования.
7. При необходимости добавьте 5% бараньей крови.
8. Разлейте в чашки (25 мл на чашку 90 мм, чтобы получить равномерный слой агара толщиной 4 мм).
9. Оставьте до застывания.

Посев и культивирование:

В соответствии со стандартным методом, используемым в Вашей лаборатории (1, 2).

Примечание: при использовании стандарта CA-SFM фирма bioMérieux рекомендует производить посев тампоном.

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- По окончании инкубации измерьте диаметр зон ингибирования роста вокруг дисков с антибиотиками и оцените результат (S: чувствительный, I: умеренно устойчивый и R: устойчивый).
- Интерпретацию полученных данных следует осуществлять в соответствии со стандартным методом, используемым в Вашей лаборатории.

Примечание:

Результаты корректны при условии сплошного равномерного роста.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**Среда без добавления крови:**Протокол:

Для контроля качества среды рекомендуется:

- *Escherichia coli* ATCC® 25922™.

Результаты, в соответствии с CLSI/NCCLS M2-A8 (1):

Антибиотик	Зона ингибирования роста, мм
Ампициллин 10 µг	16 - 22
Цефалотин 30 µг	15 - 21
Гентамицин 10 µг	19 - 26
Нитрофурантоин 300 µг	20 - 25
Триметоприм / сульфаметоксазол 1.25 / 23.75 µг	23 - 29

Среда с добавлением крови:Протокол:

Для контроля качества среды рекомендуется:

- *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619™.

Результаты, в соответствии с CLSI/NCCLS M2-A8 (1):

Антибиотик	Зона ингибирования роста, мм
Оксациллин 1 µг	8 - 12
Эритромицин 15 µг	25 - 30

Примечание:

Ответственность за проведение контроля качества в соответствии с местными нормами и положениями несут сотрудники лаборатории (частота, количество штаммов, условия культивирования, антибиотики...).

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Агар Мюллер-Хинтон 2 имеет невысокую питательную ценность для обеспечения стандартных результатов (стандартизации зон ингибирования роста). Некоторые прихотливые микроорганизмы не растут на данном агаре.
- Посев тампоном, как рекомендовано стандартом CA-SFM, не дает возможности определить устойчивость *Staphylococcus aureus* к гликопептидам (VRSA). В данном случае фирма bioMérieux рекомендует придерживаться стандарта CLSI/NCCLS (1).
- Некоторые штаммы метициллин-устойчивого золотистого стафилококка (MRSA) могут быть ложно чувствительными к цефокситину на этой среде, в частности, при использовании дискового метода. Это касается:
 - Штаммов, несущих ген *tesC* (LGA251 вариант), новый аналог гена *tesA* (в настоящее время этот вариант редко выделяется из образцов человека).
 - Штаммов с низким уровнем резистентности, несущих ген *tesA*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в соответствии со стандартом CLSI/NCCLS M2-A7 (6).

Среда без добавления крови:Питательные свойства:

В исследовании использовали 25 бактериальных штаммов (энтеробактерии, представители родов *Pseudomonas*, *Staphylococcus* и *Enterococcus*). Культивирование осуществляли при 37°С.

Для всех штаммов наблюдался хороший рост через 16-18 часов культивирования.

Зоны ингибирования роста:

- Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли для референсных штаммов, рекомендованных стандартом CLSI/NCCLS M2-A7(6):
 - *Escherichia coli* ATCC® 25922™
 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™
 - *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™
 - *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™
- Было протестировано 16 антибиотиков. Для всех были получены корректные результаты.

Среда с добавлением крови:Питательные свойства:

В исследовании использовали 25 штаммов (*Streptococcus pneumoniae* и другие стрептококки). Культивирование осуществляли при 37°C.

Для всех штаммов наблюдался хороший рост через 20-24 часа культивирования.

Зоны ингибирования роста:

- Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли для референсного штамма, рекомендованного стандартом CLSI/NCCLS M2-A7(6):
Streptococcus pneumoniae ATCC® 49619™.
- Было протестировано 10 антибиотиков. Для всех были получены корректные результаты.

УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Не использованные реагенты считаются не опасными и должны утилизироваться соответствующим образом.


Утилизируйте использованные реактивы, а также контаминированные материалы в соответствии с требованиями, предъявляемыми для утилизации инфекционных материалов.

Ответственность за утилизацию несут сотрудники лаборатории.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard* – NCCLS M2-A8 - Eighth edition, vol. 23, n° 1, Jan. 2003, ISBN 1-56238-485-6.
2. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) – Communiqué 2004 (01/2004).
3. D'AMATO R.F., THORNSBERRY C. – Calcium and magnesium in Mueller-Hinton agar and their influence on disk diffusion susceptibility results – *Curr. Microbiol.*, 1979, vol. 2, p. 135-138.
4. HALTINER R.C., MIGNEAULT P.C., ROBERTSON R.G. – Incidence of thymidine-dependent enterococci detected on Mueller-Hinton agar with low thymidine content – *Antimicrob. Agents Chemother.*, Sept. 1980, vol. 18, n°3, p. 365-368.
5. MURRAY P.R., ZEITINGER J.R. – Evaluation of Mueller-Hinton agar for disk diffusion susceptibility tests – *J. Clin. Microbiol.*, Nov. 1983, vol. 18, n°5, p. 1269-1271.
6. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard* – NCCLS M2-A7 - Seventh edition, vol. 20, n° 1, ISBN 1-56238-393-0.

ТАБЛИЦА СИМВОЛОВ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Символ	Обозначение
	Номер по каталогу
	Для диагностики in vitro
	Произведено
	Температурные ограничения
	Использовать до
	Номер партии
	Перед использованием прочтите инструкцию
	Беречь от влаги

ИСТОРИЯ ПЕРЕСМОТРОВ

Изменение категорий типа

Н/П Не применимо (первое издание)

Корректурa Исправление ошибок в документации

Технические изменения Добавление, пересмотр и/или удаление касающейся продукта информации

Административные изменения Введение изменений нетехнического характера, заслуживающих внимания пользователя

Примечание: *Незначительные типографские, грамматические изменения и изменения в форматировании в историю пересмотров не включены.*

Дата выпуска	Номер раздела	Тип изменений	Обзор изменений
2014/09	11934G	Административные изменения	Создание истории пересмотров Обновление блока адресов
		Технические изменения	Пересмотр раздела "ТАБЛИЦА СИМВОЛОВ И ОБОЗНАЧЕНИЙ"

BIOMERIEUX и логотип BIOMERIEUX являются используемыми, зарегистрированными и/или находящимися в процессе регистрации товарными знаками, принадлежащими компании bioMérieux, одной из дочерних или входящих в ее группу компаний.

Товарный знак и товарное имя ATCC, а также любые номера по каталогу ATCC — товарные знаки компании American Type Culture Collection.

CLSI является товарным знаком, принадлежащим Clinical Laboratory and Standards Institute, Inc.

Другие названия и товарные знаки принадлежат их законным владельцам.