

Агар Мюллера-Хінтона

TM 339

для культивування *Neisseria* і для визначення чутливості мікроорганізмів до антимікробних препаратів.

Склад

Інгредієнти	Грам/літр
М'ясний настій	300.00
Кислотний гідролізат казеїну	17.50
Агар	17.00
Крохмаль	1.50

* гомогенний, легко сипучий, гігроскопічний порошок. Зберігайте герметично закриту упаковку, що містить сухе середовище при температурі нижче 25°C. Після розкриття або перепакування зберігайте флакон в приміщеннях з низьким рівнем вологості при тій же температурі. Бережіть від потрапляння вологи та світла.

[* 300 г настою з яловичини еквівалентні 2.0 г екстракту яловичини]

Приготування:

Розмішати 38 г сухого середовища в 1 л дистильованої води. Обережно нагріти з помішуванням, щоб повністю розчинити середовище. Автоклавувати при температурі 121°C та тиску 1.1 ат. на протязі 15 хвилин. Охолодити до 45-50°C і розлити по стерильних чашках Петрі, щоб отримати рівномірний шар середовища 4.0±0.5 мм.

Для вибагливих організмів агар Мюллера-Хінтона доповнюють 5% (об / об) механічно дефібрированої кінської крові та 20 мг / л β-NAD. Середовище готують відповідно до інструкції і збагачують після охолодження до 42-45°C. Ретельно перемішати і розлити по стерильних чашках Петрі, щоб отримати рівномірний шар середовища 4.0±0.5 мм.

Зовнішній вигляд: Основне середовище: від світло- до середньо-бурштинового кольору, прозорий або злегка опалесцюючий гель.

Після додавання крові: яскраво-червоного кольору непрозорий гель

pH при 25°C: 7.3± 0.2

Принцип дії:

Агар Мюллера-Хінтона був спочатку розроблений для вирощування патогенних *Neisseria*. Тим не менш, для виділення цих організмів в даний час широко використовуються селективні середовища. На початку 1960-х років лабораторії клінічної мікробіології використовувати широкий спектр процедур для визначення чутливості бактерій до антибіотиків і хімотерапевтичних препаратів. Bauer, Kirby і ін. розробили стандартизовану процедуру, в якій агар Мюллера-Хінтона був обраний як випробувальне середовище. Подальше міжнародне спільне дослідження підтвердило цінність агару Мюллера-Хінтона для цієї мети через відносно хорошу відтворюваність середовища, простоту формули і багатство експериментальних даних. CLSI написав стандарт виконання для процедури Bauer-Kirby, і до цього документу слід звертатися за додатковою інформацією. Процедура рекомендується для швидкого тестування росту аеробних або факультативно анаеробних бактеріальних патогенів, таких як стафілококи, члени *Enterobacteriaceae*, аеробних грамнегативних паличок; наприклад, *Pseudomonas spp.* і *Acinetobacter spp.*, ентерококи і *Vibrio cholerae*. Процедура модифікується для тестування вибагливих видів; тобто *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* і *S. pneumoniae* та інші стрептококів.

Агар Мюллера-Хінтона містить низькі рівні тиміну і тимідину і контрольовані рівні кальцію та магнію. Рівні тиміну і тимідину визначаються за допомогою процедури диско-дифузійним методом дисками з триметоприм-сульфаметоксазолом (COT) і *Enterococcus faecalis* ATCC™ 33186 або 29212. Рівні кальцію і магнію контролюються тестуванням сировини і доповненням джерел кальцію і / або магнію, необхідних для утворення зон правильного діаметру з аміноглікозидами і *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Аналіз на чутливість до антибіотиків

Проавтоклавувати і охолодити середовище до 45-50°C. Розлити по стерильних чашках Петрі. Шар агару повинен бути товщиною 4 ± 0.5 мм. Дозволити поверхні середовища охолонути і застигнути. Висушити чашки в термостаті з частково відкритими кришками, щоб уникнути утворення крапель води на

поверхні агару (явище, яке може погіршити дифузійні властивості середовища). Приготування, інокулювання та нанесення антибіотичних дисків необхідно проводити, відповідно до процедури, описаної CLSI. Інкубуйте при $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 16-20 годин, а потім вимірюйте зону затримки росту.

Культуральні властивості:

проявляються після інкубування (10^3 КУО/мл) при $t 35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 16-20 години.

Штами мікроорганізмів	ATCC	Інокулят (КУО)	Ріст
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	10^3	Пишний
<i>Escherichia coli</i>	25922	10^3	Пишний
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	10^3	Пишний
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	10^3	Пишний
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	10^3	Пишний

Тест на чутливість до антибіотиків.

Культурні характеристики спостерігаються після інокуляції культурою, щільність якої дорівнює 0.5 за стандартом McFarland ($1-2 \times 10^8$ КУО / мл) за допомогою технології газону, та інкубації при $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 16-20 годин. Після інкубації діаметр зони затримки росту вимірюється в мм.

Штами мікроорганізмів	ATCC	Діаметр зон затримки росту			
		Тобрамацин (10 мкг)	Гентаміцин (10 мкг)	Ампіцилін (10 мкг)	Сульфаметоксазол (1.25 мкг)+ Триметоприм (23.75 мкг)
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	19-29	19-27	27-35	24-32
<i>Escherichia coli</i>	25922	18-26	19-26	16-22	23-29
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	20-26	17-23	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	-	-	-	≥ 20
<i>Streptococcus pneumoniae</i> *	6305	-	-	30-36	20-28

* Інкубація при $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 16-20 годин, в повітрі з 4-6% CO_2 на агарі MH-F.

Фактори, що впливають на результати тесту на чутливість

Об'єм інокулята, швидкість росту, склад середовища, час інкубування, оточуюче середовище інкубування, склад дисків, швидкість дифузії лікарського засобу, вимірювання кінцевих точок, рН середовища.

Запобіжні заходи

- Глибина агару повинна становити 4.0 ± 0.5 мм.
- Суспензія інокулюму повинна бути використана оптимально протягом 15 хвилин, але не пізніше 60 хвилин після приготування для забезпечення правильної кількості життєздатних клітин.
- Під час інокуляції забороняється використання заливання чашок.
- Диск з антибіотиками повинні бути нанесені на поверхню агару протягом 15 хвилин після посіву; інкубацію необхідно почати протягом ще 15 хвилин.
- Не перевищувати інкубаційний період більш ніж на 16-20 годин, оскільки більш тривала інкубація часто призводить до нечітких країв зон пригнічення або появи колоній в межах зон пригнічення, які можуть дати помилкові результати.
- На одній чашці, діаметром 90-мм можна розміщувати максимум шість дисків і 12 дисків на чашці діаметром 150 мм.

Посилання на літературу:

- Mueller, J.H. and Hinton, J. 1941. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 48: 3330-3333.
- Gordon, M.H. and Hine, T.G.M. 1916. Br. Med. J. 18: 678-684.
- Bauer, A.L., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. 1966. Am. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.
- World Health Organization. 1961. Standardization of methods for conducting microbic sensitivity tests. Technical Report Series No. 210, Geneva.
- Food and Drug Administration. 1998. Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Wood, G.L. and Washington, J.A. 1995. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods, p. 1327-1341. In Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Tenover R.H. (Eds.). Manual of clinical microbiology, 6th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, 9th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Third Informational Supplement, M100-S23 (MS). Wayne, PA.
- Matuschek, E., Brown, D.F.J. and Kahlmeter, G. 2014. Clin. Microbiol. Infect. 20: O255–O266.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2014. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing, version 4.0.