



BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood •
BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (150 mm) •
BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep blood, Square

UTILIZARE SPECIFICĂ

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood, disponibil în plăci de diferite forme, este utilizat pentru testarea sensibilității prin difuziunea discului a izolatelor clinice de *Streptococcus pneumoniae* și a altor streptococi conform standardelor Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).¹

PRINCIPIILE ȘI EXPLICAȚIILE PROCEDURII

Metodă microbiologică.

Procedura Bauer-Kirby se bazează pe difuziunea în gel de agar a substanțelor antimicrobiene impregnate pe discuri de hârtie.² În procedura de testare, o suspensie standardizată a organismului este tamponată pe întreaga suprafață a mediului. Discurile de hârtie sunt impregnate cu cantități specifice de antibiotic sau alți agenți antimicrobieni și apoi sunt plasate pe suprafața mediului, placa se incubează, iar zonele de inhibiție din jurul fiecărui disc sunt măsurate. CLSI a publicat un standard de performanță pentru procedura Bauer-Kirby și acest document ar trebui consultat pentru informații suplimentare.¹ Alte standarde naționale au fost realizate pentru testarea sensibilității la antimicrobiene conform procedurii Bauer-Kirby. În acele standarde, densitatea inoculului, metoda de inoculare, dimensiunile zonelor rezultante și modul de interpretare pot fi diferite de standardul CLSI. Cât timp nu există standarde europene pentru testarea sensibilității, trebuie consultate standardele locale naționale, în cazul în care ghidurile CLSI nu sunt disponibile.

Mediul agar Mueller Hinton nesuplimentat, deși adecvat pentru testarea sensibilității patogenilor cu creștere rapidă, nu este adecvat pentru multe organisme pretențioase, precum *Streptococcus pneumoniae*. Documentul M2 CLSI recomandă mediul cu agar Mueller Hinton suplimentat cu 5% sânge de oaie defibrinat și detaliază atât procedurile pentru controlul de calitate cât și criteriile de interpretare pentru *S. pneumoniae* și alți streptococi.¹

REACTIVI

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood

Formulă* pentru un litru de apă purificată

Extract de vită	2,0 g
Hidrolizat acid de cazeină	17,5
Amidon	1,5
Agar	17,0 g
Sânge de oaie, defibrinat	5%
pH 7,3+/-0,2	

*Ajustată și/sau suplimentată după cum este necesar pentru a îndeplini criteriile de performanță.

PRECAUȚII

În scopul diagnosticului in vitro

IVD . Numai pentru uz profesional. ☒

Nu utilizați plăcile dacă prezintă semne de contaminare microbiană, decolorare, deshidratare, fisuri sau alte semne de deteriorare. Contractia excesivă a mediului datorită deshidratării poate duce la rezultate de sensibilitate false.

Consultați documentul **INSTRUCȚIUNI GENERALE DE UTILIZARE** pentru detalii referitoare la procedurile de manipulare aseptică, riscurile biologice și înlăturarea produselor utilizate.

DEPOZITAREA ȘI DURATA DE DEPOZITARE

La recepție, depozitați plăcile la întuneric la 2 până la 8°C, în ambalajul original până în momentul utilizării. Evitați congelarea sau supraîncălzirea. Plăcile pot fi inoculate până la expirarea termenului de valabilitate (consultați eticheta ambalajului) și pot fi incubate pentru perioadele recomandate de incubare.

Plăcile dintr-un teanc de 10 plăci desfăcut pot fi utilizate timp de o săptămână dacă sunt depozitate într-o zonă curată între 2 și 8°C.

CONTROLUL CALITĂȚII EFECTUAT DE UTILIZATOR

Pentru controlul calității efectuat de utilizator trebuie consultate standardele CLSI ¹ adecvate sau, dacă este cazul, standardele naționale. În principal, trebuie respectate procedurile descrise mai jos în **Procedura de testare**, inclusiv pentru tulpina martor, *S. pneumoniae* ATCC 49619, iar discurile cu agenți antimicrobieni, utilizate în mod normal de laborator, trebuie testate cel puțin de două ori pe săptămână pentru o performanță corespunzătoare.

Diametrele corecte ale zonelor se regăsesc în tabelul 3A din documentul CLSI M100 inclus împreună cu documentul CLSI M2. ¹

Aspectul mediului neinoculat: roșu (culoarea sângelui), opac.

PROCEDURĂ

Materiale furnizate

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (furnizat în plăci de diferite forme; consultați **Ambalaj/ Disponibilitate**). Controlate microbiologic.

Materiale nefurnizate

1. Bulion pentru inocul în cantități de 5 ml, precum Mueller Hinton II Broth (**BBL** Nr. cat. 4397701, flacon de 16 x 102 mm) sau soluție salină 0,9%, pentru prepararea inoculului standard.
2. Un standard de comparație de sulfat de bariu (0,5 ml de 0,048 M BaCl₂ [1,175% w/v BaCl₂·2H₂O] la 99,5 ml de 0,18 M [0,36 N] H₂SO₄ [1% v/v]).
3. Un dispozitiv fotometric pentru ajustarea turbidității suspensiei de inocul la un standard echivalent cu 0,5 McFarland.
4. Ca alternativă a materialelor de mai sus (1-3), poate fi utilizat sistemul **BD Prompt Inoculation System** (dispozitiv de preparare volumetrică a inoculului). ^{1,3}
5. Cultură martor - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
6. Discuri de hârtie impregnate cu agenți antimicrobieni în cantități specifice, precum discurile pentru testarea sensibilității **BD Sensi-Disc**.
7. Dispozitiv pentru distribuirea discurilor, precum dispenser auto-aplicator cu 6, 8 sau 12 poziții **BD Sensi-Disc**.
8. Dispozitiv pentru determinarea sau interpretarea diametrelor zonelor, precum compas sau riglă.
9. Un incubator care produce o atmosferă cu conținut de 5% CO₂ sau alt dispozitiv care produce o atmosferă similară îmbogățită în CO₂.
10. Medii de cultură auxiliare, reactivi și echipament de laborator conform cerințelor.

Tipuri de probe

Acest produs este utilizat numai pentru testarea sensibilității culturilor pure izolate din probele clinice (consultați și **CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ ȘI LIMITĂRILE PROCEDURII**).

Procedură de testare

Metoda suspensiei directe din colonii trebuie utilizată atunci când este testat *S. pneumoniae*. ¹ Respectați tehnicile de asepsie.

1. Asigurați-vă că este disponibilă o cultură pură, proaspătă (=de peste noapte) de pe mediu agar cu sânge neselectiv.
2. Suspendați cultura în bulion, de ex. bulion Mueller Hinton II sau soluție salină sterilă 0,9%. Ajustați turbiditatea pentru a fi echivalentă cu sulfat de bariu standard (0,5 McFarland standard). Turbiditatea standardului și a inoculului de testat trebuie comparate prin

așezarea ambelor flacoane în fața unui fundal alb cu linii negre fine sau poate fi utilizat un dispozitiv fotometric.

3. S-a constatat că metodele alternative de preparare a inoculului prin dispozitive care permit standardizarea directă a inoculului fără ajustarea turbidității, precum **BD Prompt Inoculation System**, sunt acceptabile în scopul testării de rutină.^{1,3}
4. În 15 min de la ajustarea turbidității inoculului, înmuiți un tampon steril în inoculul diluat corespunzător și învârtiți cu fermitate de mai multe ori pe interiorul porțiunii superioare a peretelui flaconului pentru a înlătura lichidul în exces.
5. Inoculați pe mediul **BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood** prin însămânțarea de trei ori a întregii suprafețe de agar a plăcii, răsucind placa cu 60° între însămânțări pentru a obține o inoculare uniformă.
6. Reașezați capacul plăcii și lăsați placa la temperatura camerei timp de cel puțin 3 min, dar nu mai mult de 15 min, pentru a permite absorbția umezelii de la suprafață înainte de a aplica discurile impregnate cu medicament. Nu utilizați mai mult de nouă discuri pe o placă de 150 mm sau patru discuri pe plăcile de 90 și, respectiv, 100 mm. Pentru testarea la penicilină a *S. pneumoniae*, utilizați un disc cu 1 µg de oxacilină.⁴
7. Incubați timp de 20 până la 24 h la 35°C într-o atmosferă cu 5% CO₂.

Rezultate

După inoculare, trebuie observată o creștere confluentă. În cazul în care cresc numai colonii izolate, inoculul a fost prea slab și trebuie repetat testul.

Determinați diametrul zonelor de inhibiție completă (apreciate cu ochiul liber), incluzând diametrul discului, până la primul milimetru întreg, utilizând un compas reglabil sau o riglă, de la partea superioară a plăcii fără capac.⁵ Ca limită trebuie considerată aria pe care nu este vizibilă o creștere evidentă, observată cu ochiul liber. Neglijați o creștere estompată de colonii foarte mici ce poate fi observată cu dificultate aproape de marginea zonei de inhibiție evidentă. Pe mediul **BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood**, trebuie determinată zona de inhibiție a creșterii și nu zona de inhibiție a hemolizei.

Calcularea și interpretarea rezultatelor

Diametrele zonelor trebuie comparate cu cele din tabelul 2G pentru *S. pneumoniae* și 2H pentru alți streptococi din documentul CLSI M100 (M2), care furnizează criterii de interpretare.¹ Rezultatele obținute pot fi apoi raportate ca rezistent, intermediar sau sensibil. Respectați criteriile speciale de interpretare pentru izolate de *S. pneumoniae* cu diametrele zonelor de oxacilină ≤ 19 mm menționate în acest standard (consultați și **CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ ȘI LIMITĂRILE PROCEDURII**).

Notă: Periodic, sunt publicate suplimente informaționale ale documentului CLSI M2 sau versiuni revizuite, conținând tabele revizuite ale discurilor antimicrobiene și standardelor de interpretare. Pentru recomandări curente trebuie consultate cele mai recente tabele. Standardul complet și suplimentele informaționale pot fi obținute de la National Committee for Clinical Laboratory Standards, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 S.U.A. Telefon: ++1-610-688-1100.

CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ ȘI LIMITĂRILE PROCEDURII

Testul de sensibilitate prin difuziunea discurilor este destinat numai pentru utilizare cu culturi pure. Înainte de a pregăti un test de sensibilitate este recomandată realizarea unei colorații Gram și identificarea prezumtivă a izolatului.¹

Acest mediu este utilizat pentru testarea sensibilității *S. pneumoniae* și a altor streptococi împotriva agenților antimicrobieni selectați.^{1,2,5} Notați faptul că nu există criterii fiabile pentru testarea prin difuziune cu discuri a *S. pneumoniae* pentru amoxicilină, ampicilină, cefepim, cefotaxim, ceftriaxonă, cefuroxim, imipenem și meropenem. Activitatea in vitro a acestor agenți antimicrobieni este cel mai bine determinată utilizând o metodă a MIC.¹

Pentru determinarea sensibilității la penicilină a *S. pneumoniae*, trebuie utilizat un disc cu oxacilină. Izolatele de *S. pneumoniae* cu diametrele zonelor de oxacilină ≥ 20 mm sunt sensibile (MIC ≤ 0,06 mg/ml) la penicilină. Deoarece zonele ≤ 19 mm cu discul de screening cu oxacilină apar la tulpinile penicilino-rezistente, intermediare și anumite tulpini sensibile, trebuie

determinată o MIC la penicilină, meropenem și cefotaxim sau ceftriaxonă pe toate izolatele de *S. pneumoniae* cu zone de oxacilină ≤ 19 mm.¹

Nu se recomandă testul cu oxacilină pentru determinarea sensibilității la penicilină a streptococilor, alții în afară de *S. pneumoniae*. În cazul streptococilor beta-hemolitici, utilizați un disc cu penicilină sau ampicilină. Pentru streptococii de grup *viridans*, testarea prin difuziune cu disc cu penicilină și oxacilină nu este fiabilă; sensibilitatea acestora trebuie determinată prin testarea MIC.¹

Testarea prin difuziune cu discuri cu agenți antimicrobieni utilizând *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, a fost realizată intern cu cefaclor, cefprozil, cloramfenicol, eritromicină, ofloxacină, tetraciclină, trimetoprim/sulfametoxazol și vancomicină. Respectând procedurile de testare descrise în M2-A5, douăzeci de teste cu tulpini pentru controlul de calitate și opt discuri cu agenți antimicrobieni au fost realizate într-o perioadă de 10 zile de test. Pentru toți cei opt agenți antimicrobieni, 100% (160/160) din dimensiunile zonelor s-au încadrat în intervalul de valori pentru dimensiunile zonelor publicat în M2-A5 și tabelul 3C din documentul NCCLS M100-S6.^{6,7} Deviația standard pentru tetraciclină a fost mai mică de 1 mm, iar pentru alți agenți antimicrobieni, mai puțin de 2 mm.⁸

Studiile de reproductibilitate (de 3 ori pe zi timp de 3 zile) au fost realizate în două centre din domeniu, cu agenții antimicrobieni menționați mai sus împotriva *S. pneumoniae* ATCC 49619 și alte nouă tulpini suplimentare de *S. pneumoniae* bine caracterizate. Pentru fiecare agent antimicrobian, au fost respectate standardele de interpretare a diametrului zonei din tabelul 2C al documentului NCCLS M2-A5 și suplimentul M100-S6.^{6,7} Rezultatele testelor cu cloramfenicol, eritromicină, ofloxacină, tetraciclină și vancomicină au fost peste 95% echivalente cu cele obținute prin metodele de referință ale NCCLS. Rezultatele testării cu trimetoprim/sulfametoxazol au fost 90% echivalente cu cele obținute prin metoda de referință NCCLS. Reproducibilitatea nu a putut fi determinată pentru cefaclor și cefprozil datorită absenței standardelor de interpretare pentru acești doi agenți antimicrobieni. Pe baza studiilor subliniate mai sus, nu este recomandată utilizarea cefaclor, cefprozil sau trimetoprim/sulfametoxazol pe acest mediu pentru testarea *S. pneumoniae*. În plus, în referințele din literatură sunt raportate erori excesive de interpretare în cazul testării prin difuziune cu disc ce conține trimetoprim/sulfametoxazol pe plăcile cu mediu agar Mueller Hinton cu sânge de oaie.⁹

Este posibil ca, în cazul unor combinații organism-agent antimicrobian, zona de inhibiție să nu prezinte o margine delimitată clar, ceea ce poate duce la interpretări incorecte.

Au fost identificați numeroși factori care influențează testele de sensibilitate prin difuziune cu disc. Printre aceștia pot fi mediul, adâncimea agarului, potența discului, concentrația inoculului și pH-ul.²

O concentrație incorectă a inoculului poate duce la rezultate incorecte. Zonele de inhibiție pot fi prea mici dacă inoculul este prea încărcat și pot fi prea mari și dificil de determinat dacă inoculul este prea slab.

Depozitarea neadecvată a discurilor cu agenți antimicrobieni poate cauza pierderea potenței și un rezultat fals-rezistent.

Sensibilitatea in vitro a unui organism față de un agent antimicrobian specific nu înseamnă neapărat că acel agent va fi eficient in vivo. Pentru indicații privind interpretarea rezultatelor, consultați referințele corespunzătoare.^{2,10}

Nu utilizați acest mediu pentru testarea sensibilității altor bacterii în afară de *S. pneumoniae* și streptococii beta-hemolitici.

REFERINȚE

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Approved Standard: M2. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA. Search for latest version at www.clsi.org.
2. Washington, J.A., and G.L. Woods. 1995. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods, p. 1327-1341. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

3. Baker, C.N., C. Thornsberry, and R.W. Hawkinson. 1983. Inoculum standardization in antimicrobial susceptibility testing: evaluation of overnight agar cultures and the rapid inoculum standardization system. *J. Clin. Microbiol.* 17:450-457.
4. Swenson, J.M., B.C. Hill, and C. Thornsberry. 1986. Screening pneumococci for penicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 24:749-752.
5. Hindler, J.F., and J.M. Swenson. 2003. Susceptibility test methods: fastidious bacteria. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Approved Standard: M2-A5. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 5th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995. Sixth informational supplement: M100-S6. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
8. Datele din fișier, Becton Dickinson Microbiology Systems.
9. Jorgensen, J.J. 1994. Detection of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* by use of standardized susceptibility testing methods and recently developed interpretive criteria. *Clin. Microbiol. Newsl.* 16(13):97-104.
10. Neumann, M.A., D.F. Sahm, C. Thornsberry, J.E. McGowan, Jr. 1991. Cumitech 6A, New developments in antimicrobial agent susceptibility testing: a practical guide. Coordinating ed., J.E. McGowan, Jr. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

AMBALAJ/DISPONIBILITATE

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (plăci **Stacker™ de 90 mm)**

Nr. cat. 254030

Medii pe plăci pregătite pentru utilizare, cpu 20

Nr. cat. 254080

Medii pe plăci pregătite pentru utilizare, cpu 120

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (150 mm)

Nr. cat. 255080

Medii pe plăci pregătite pentru utilizare, cpu 20

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep blood, Square (120 x 120 mm)

Nr. cat. 254517

Medii pe plăci pregătite pentru utilizare, cpu 20

INFORMAȚII SUPLIMENTARE

Pentru informații suplimentare, contactați reprezentantul local BD.



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>

<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

Prompt este o marcă comercială a 3M.

ATCC este o marcă comercială a American Type Culture Collection

BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. © 2013 BD