



BD Haemophilus Test Medium Agar (HTM)

UTILIZARE SPECIFICĂ

BD Haemophilus Test Medium Agar (HTM) este utilizat pentru procedura de sensibilitate cu difuziune pe disc pentru izolatele clinice ale speciilor de *Haemophilus* așa cum este descrisă în standardul aprobat M2, publicat de Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).¹

PRINCIPIILE ȘI EXPLICAȚIILE PROCEDURII

Metodă microbiologică.

Mueller Hinton Agar suplimentat cu 1% hemoglobină și 1% mediu de îmbogățire IsoVitaleX (Mueller Hinton Chocolate Agar) era mediul recomandat în trecut pentru *Haemophilus influenzae*.² Studii extinse efectuate de Jorgensen și colegii au dus la dezvoltarea Haemophilus Test Medium Agar (HTM).^{3,4} Acest mediu este Mueller Hinton agar suplimentat cu factor X (hemină sau hematină), factor V (nicotinamidă adenină dinucleotidă, NAD) și extras de drojdie.

Un avantaj major al HTM Agar comparat cu Mueller Hinton Chocolate Agar este claritatea optică, permițând măsurători ale diametrului zonei de la fundul vasului și este procedura de testare standard pentru organisme non pretențioase pe Mueller Hinton Agar. În plus, HTM Agar conține concentrații reduse de timină și este prin urmare adecvat pentru testarea trimetoprimului/sulfametoxazolei.

Criteriile de interpretare pentru testarea sensibilității antimicrobiene sunt furnizate în documentul CLSI M100 (M2), care este inclus în documentul CLSI M2.¹ Acest document trebuie consultat pentru detalii suplimentare.

BD Haemophilus Test Medium Agar este format din Mueller Hinton Agar suplimentat cu factor X (hemină sau hematină), factor V (nicotinamidă adenină dinucleotidă, NAD) și extras de drojdie.

REACTIVI

BD Haemophilus Test Medium Agar (HTM)

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
Extract de drojdie	5,0
Hematină	0,015
Nicotinamidă Adenină Dinucleotidă (NAD)	0,015

pH 7,3 ± 0,1

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

PRECAUȚII

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 posibil, standardele naționale. În principal, trebuie respectate procedurile descrise mai jos în **Procedura de testare**, utilizând tulpinile de referință menționate în **Materiale nefurnizate**. Plăcile cu **BD Haemophilus Test Medium Agar (HTM)** și discurile cu agenți antimicrobieni trebuie testate cel puțin de două ori pe săptămână pentru o performanță corespunzătoare. Aspectul mediului neinoculat: Galben deschis

PROCEDURĂ

Materiale furnizate

BD Haemophilus Test Medium Agar (plăci **Stacker** de 90 mm). Controlate microbiologic.

Materiale nefurnizate

1. Bulion pentru inocul în flacon, precum **BD Trypticase Soy Broth** (bulion cu extract de cazeină-soia) sau Mueller Hinton II Broth (cation-ajustată), pentru prepararea inoculului standard și bulion steril sau soluție salină pentru diluarea inoculului.
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).^{5,6}
5. Culturi de control - *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, ATCC 49766 și ATCC 10211.
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 cu 6 poziții Sensi-Disc.
8. Riglă sau alt dispozitiv pentru măsurarea în milimetri a dimensiunii zonelor.
9. Un incubator care produce o atmosferă cu conținut de 5% CO₂ sau alt dispozitiv care produce o atmosferă aerobă similară îmbogățită în CO₂.
10. Un reactiv pentru efectuarea unui test rapid de β-lactamază utilizând discuri **BD Cefinase**.
11. Medii de cultură auxiliare, reactivi și echipamentul de laborator necesar.

Tipuri de probe

Acest produs este utilizat numai pentru testarea sensibilității culturilor pure de *Haemophilus* care au fost izolate din probele clinice (consultați și Caracteristici de performanță și limitările procedurii).

Procedura de testare

1. Preparați o colorație Gram înainte de a începe testul de sensibilitate pentru a confirma puritatea culturii și tentativa de identificare a *Haemophilus*.
2. Utilizați mai multe colonii bine izolate extrase direct dintr-o placă de Chocolate Agar lăsată peste noapte (preferabil 20 la 24 h) ca și sursă a inoculului.
3. Un test rapid al β-lactamazei trebuie utilizat pentru detectarea rapidă a tulpinilor rezistente la penicilină, ampicilină sau amoxicilină.
4. Preparați o suspensie din organismul de testare în bulion Mueller Hinton Broth, Mueller Hinton II Broth sau în soluție salină 0,9%. Această suspensie trebuie ajustată la un standard de turbiditate echivalent cu 0,5 McFarland utilizând un dispozitiv fotometric. Această suspensie va conține aproximativ 1 – 4 x 10⁸ CFU/mL. Această suspensie trebuie preparată cu foarte multă grijă deoarece concentrațiile mai mari de inocul pot duce la rezultate fals rezistente cu anumite antibiotice β-lactami, în special atunci când sunt testate tulpini de *H. influenzae* care produc beta-lactamază.¹

5. 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 inclusiv testarea *H. influenzae*.^{5,6}
6. În 15 min de la ajustarea turbidității inoculului, înmuiați 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.
7. Inoculați prin însămânțarea de trei ori a întregii suprafețe de agar a unei plăci **BD Haemophilus Test Medium Agar**, răducind placa cu 60° între însămânțări pentru a obține o inoculare uniformă.
8. Capacul poate fi lăsat întredeschis timp de 3 până la 5 min, cu placa ținută la temperatura camerei nu mai mult de 15 min, pentru a permite absorbția eventualei umezeli de la suprafață înainte de aplicarea discurilor impregnate cu medicament.
9. Aplicați discurile cu ajutorul unui dispenser de discuri antimicrobiene, luând precauții de asepsie. Majoritatea agenților antimicrobieni produc zone mai mari de inhibiție atunci când sunt testați împotriva *Haemophilus* în comparație cu alte organisme. De aceea, nu mai mult de patru discuri antimicrobiene trebuie plasate pe o singură placă de 100 mm, incluzând nu mai mult de șase dintre următoarele discuri: cefalosporine din a treia generație (de ex., cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxon, ceftizoxim), aztreonam, imipenem sau ciprofloxacina. După așezarea discurilor pe agar, presați-le cu un ac steril sau pensă sterilă pentru a realiza contactul complet cu suprafața mediului.
10. În interval de 15 min de la aplicarea discurilor, inversați plăcile și incubați pentru 16 până la 18 h la 35°C, într-o atmosferă aerobă îmbogățită cu 5% dioxid de carbon.
11. Însămânțați o placă de **BD Haemophilus Test Medium Agar** cu *H. influenzae* ATCC 10211 și incubați împreună cu plăcile de testare a sensibilității pentru a determina dacă mediul susține creșterea adecvată.

Rezultate

1. Examinați plăcile după 16 până la 18 h de incubare. Trebuie obținută o creștere în „luminișuri” confluențe. Dacă au crescut numai colonii izolate, inoculul a fost prea slab și trebuie repetat testul.
2. Determinați diametrul zonelor de inhibiție completă (apreciate cu ochiul liber), incluzând diametrul discului, până la primul milimetru întreg, utilizând un compas reglabil, o riglă sau un șablon pregătit în acest scop. Dispozitivul de măsurare este ținut pe spatele plăcii care este ținută pe un fundal negru, fără reflecții și iluminat de deasupra.
3. Ca limită trebuie considerată suprafața pe care nu este vizibilă o creștere evidentă, observată cu ochiul liber. Neglijați o creștere estompată de colonii foarte mici, care poate fi observată cu dificultate aproape de marginea zonei de inhibiție evidentă.
Cu trimetoprim și sulfonamide, urmele de antagoniști din mediu pot permite o creștere ușoară; de aceea, neglijați creșterea ușoară (20% sau mai puțin din luminișul de creștere) și măsurați marginile evidente pentru a determina diametrul zonei.

Calcularea și interpretarea rezultatelor

Consultați documentul CLSI M100 (M2) pentru interpretarea rezultatelor obținute cu izolați clinici ai *Haemophilus*.¹ Rezultatele pot fi raportate ca rezistente, intermediare sau sensibile în funcție de diametrele zonelor obținute.

Organismele testate pozitiv pentru producția de beta-lactamază trebuie considerate rezistente la ampicilină indiferent de diametrele zonelor obținute. Trebuie reținut că au fost descrise tulpini rezistente la ampicilină

ale *H. influenzae*, care nu prezintă activitate de β -lactamază.⁷

De aceea, dacă diametrul zonei indică rezistență la penicilină, izolatul trebuie raportat ca rezistent la acest medicament, chiar dacă testul de β -lactamază este negativ.

Trebuie incluse culturi de control de fiecare dată când se efectuează un test de sensibilitate sau săptămânal dacă performanța satisfăcătoare poate fi documentată conform standardului CLSI M2, care include tabele (M100) cu diametre corecte ale zonelor.¹

Notă: periodic sunt publicate suplimente informaționale ale documentului CLSI M2 sau versiuni revizuite, conținând tabele revizuite ale discurilor antimicrobiene și ale standardelor de interpretare.

Pentru recomandări curente trebuie consultate cele mai recente tabele. Standardul complet și suplimentele informaționale pot fi obținute de la Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 S.U.A. Telefon: ++1-610-688-1100.

CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ ȘI LIMITĂRILE PROCEDURII

A. Studiu de reproductibilitate ⁸

Trei loturi de producție ale **BD Haemophilus Test Medium Agar** au fost evaluate utilizând procedura de testare a sensibilității antimicrobiene cu disc (M2-A4) recomandată de NCCLS la acea dată.⁹ Un total de 12 agenți antimicrobieni (amoxicilină/clavulanat, ampicilină, ampicilină/sulbactam, cefaclor, cefonicid, ceftriaxon, cefuroxim, cloramfenicol, ciprofloxacina, rifampin, tetraciclină, trimetoprim/sulfametoxazol) și 14 tulpini de *H. influenzae* au fost utilizate în cadrul studiului. Din cele 14 tulpini, șapte au fost tulpini American Type Culture Collection (ATCC) și celelalte șapte au fost culturi de bază, care includeau șase izolați clinici și o cultură de control de calitate industrială. Diametrele zonelor obținute cu fiecare dintre cele trei loturi de medii au fost comparate cu criterii interpretative (Tabelul 2A) în M2-A4.⁹ Numai în șase cazuri au fost zone obținute cu un loc care ar putea produce o categorie interpretativă diferită în raport cu celelalte două loturi. Dintre cele șase discrepante, au fost înregistrate patru cu tetraciclina, una cu cefaclor și una cu cefuroxim. În cazul tetraciclinei, rezultatul ar produce o categorie interpretativă fie sensibilă fie intermediară (eroare minoră). Cu cefaclor și cefuroxim, diferența de 1 mm care a intervenit ar putea rezulta dintr-o categorie intermediară sau rezistentă, de asemenea o eroare minoră.

În acest studiu au fost cinci tulpini de *H. influenzae* care au produs beta-lactamază. Cu fiecare dintre aceste tulpini, fiecare lot HTM a produs diametre ale zonelor cu ampicilină care ar putea fi interpretate ca fiind rezistente. Două din cele cinci tulpini au produs de asemenea cloramfenicol acetiltransferază (CAT). Zonele de cloramfenicol obținute cu aceste două tulpini ar corespunde rezistenței la cloramfenicol.^{10,11}

B. Comparația cu Mueller Hinton Chocolate Agar ⁸

Procedura NCCLS cu disc a fost efectuată cu 213 izolați clinici ai *H. influenzae* pe HTM Agar și Mueller Hinton Chocolate Agar.^{9,12} Agenții antimicrobieni testați au fost ampicilina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulanat și cloramfenicol. Aceștia au fost singurii agenți antimicrobieni pentru care au fost definite criterii de interpretare a diametrului zonei pentru Mueller Hinton Chocolate Agar.^{13,14} Au fost obținute următoarele rezultate.

BD Haemophilus Test Medium Agar				
		S	I	R
Mueller Hinton	S	808	1	2
Chocolate Agar	I	0	0	0
	R	0	0	41

Echivalență: 99.6%

S = Sensibil

I = Intermediar

R = Rezistent

Au fost înregistrate două erori majore și o eroare minoră cu ampicilina. În ambele erori majore **BD Haemophilus Test Medium Agar** a produs un rezultat rezistent în timp ce Mueller Hinton Chocolate Agar a produs un rezultat sensibil. Ambii izolați au fost pozitivi la beta-lactamază. De aceea, rezultatul rezistent a fost corect. O eroare minoră a fost înregistrată cu un izolat care a produs un rezultat intermediar pe HTM Agar și un rezultat sensibil pe agar Mueller Hinton Chocolate Agar.

C. Limitările procedurii

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.

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 inadecvată 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.^{2,15}

REFERINȚE

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Approved standard: M2. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA. Search for latest version at www.clsi.org
2. Thornsberry, C., T.L. Gavan, E.H. Gerlach. 1977. Cumitech 6, New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Coordinating ed., J.C. Sherris. American Society for Microbiology, Washington, D.C
3. Jorgensen, J.H., J.S. Redding, L.A. Maher, and A.W. Howell. 1987. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol. 25:2105-2113.
4. Jorgensen, J.H., A.W. Howell, and L.A. Maher. 1990. Antimicrobial susceptibility testing of less commonly isolated *Haemophilus* species using *Haemophilus* test medium. J. Clin. Microbiol. 28:985-988.
5. 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.
6. Marsik, F., G. Evans, J. Fowler, and L. Thompson. 1989. Comparison of the BBL Prompt system, Abbott A-Just, and visual method for the preparation of *Haemophilus influenzae* inoculum for the Bauer-Kirby procedure, abstr. C-67, p. 404. Abstr. 89th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1989.
7. Doern, G.V., J.H. Jorgensen, C. Thornsberry, D.A. Preston, T.A. Tubert, J.S. Redding, and L.A. Maher. 1988. A national collaborative study of the prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 32:180-185.
8. Data on file. BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1990. Approved standard: M2-A4. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 4th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
10. Azemun, P., T. Stull, M. Roberts, and A.L. Smith. 1981. Rapid detection of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 20:168-170.
11. Doern, G.V., G.S. Daum, and T.A. Tubert. 1987. In vitro chloramphenicol susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*: disk diffusion procedures and assays for chloramphenicol acetyltransferase. J. Clin. Microbiol. 25:1453-1455.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1984. Approved standard: M2-A3. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 3rd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1987. Second Informational Supplement: M100-S2. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
14. Doern, G.V. and R.N. Jones. 1988. Antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, and *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob. Agents Chemother. 32:1747-1753.
15. Woods, G.L., and J.A. Washington. 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. USA.

AMBALAJ/DISPONIBILITATE**BD Haemophilus Test Medium**

Nr. cat. 254058

Medii pe plăci pregătite pentru utilizare, 20 cpu

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 is a trademark of 3M

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

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