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

AVSEDD ANVÄNDNING

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (Mueller Hinton-agar med 5 % fårblod), tillgänglig i flera plattformat och används för resistensbestämning med diskdiffusion av *Streptococcus pneumoniae* och andra streptokocker enligt standardisering från Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).[1]

PRINCIPER FÖR OCH FÖRKLARING AV METODEN

Mikrobiologisk metod.
Bauer-Kirby-proceduren baseras på diskdiffusion genom en agargel av antimikrobiella substanser, vilka är impregnerade på papperslappar.[2] I testproceduren, stryks en standardiserad suspenison av organismen över hela mediets yta. Papperslappar impregnerade med specifika mängder antibiotika eller andra antimikrobiella ämnen placeras därefter på mediets yta, plattan inkuberas och hämningszonerna runt varje lapp mäts. CLSI har skrivit en prestandastandard för Bauer-Kirby-proceduren och detta dokument bör konsulteras för detaljer.[1] Andra nationella standarder har utvecklats för antimikrobiell resistensbestämning enligt Bauer-Kirby-proceduren. I dessa standarder, kan inokulatdensiteter, inokulatmetoder, de följande zonstorlekarna och tolkningssättet skilja sig från CLSI-standard. Så länge vanliga europeiska standarder för resistensbestämning inte finns, bör lokal nationella standarder användas om ej CLSI-riktlinjerna är tillämpliga.
Icke-kompletterad Mueller Hinton-agar, fastän adekvat för resistensbestämning av snabbt växande aeroba patogener, är inte tillräcklig för mer kräsna (svårodlade) organismer såsom *Streptococcus pneumoniae.* CLSI-dokumentet M2 rekommenderar Mueller Hinton-agar kompletterad med 5 % defibrinerat fårblod, och detaljerar både kvalitetskontrollprocedurer och tolkningskriterier vid användning med *S. pneumoniae* och andra streptokocker.[1]

REAGENSER

BD Mueller Hinton-agar med 5 % fårblod
Sammansättning* per liter aqua purif.

Nötextrakt	2,0 g
Kaseinhydrolysat	17,5
Stärkelse	1,5
Agar	17,0 g
Fårblod, defibrinerat	5 %

pH 7,3 +/- 0,2
*Justerad och/eller kompletterad efter behov för att uppfylla prestandakriterierna.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Avsedd för in vitro-diagnostik
IVD . Endast för professionellt bruk.
Plattorna får inte användas om de visar tecken på mikrobiell kontamination, missfärgning, uttorkning, sprickbildning eller annan försämring. Svår krympning av detta mediet på grund av uttorkning kan leda till falska känslighetsresultat.
Se skriften **ALLMÄN BRUKSANVISNING** för information om aseptiska förfaranden vid hantering, biorisker och bortskaffning av använd produkt.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

Förvara plattorna mörkt vid 2 till 8 °C i originalomslaget efter mottagandet fram till dess de skall användas. Överhettning och nedfrysning skall undvikas. Plattorna kan inokuleras fram till utgångsdatum (se etiketten på förpackningen) och inkuberas under rekommenderad inkubationsperiod.
Plattor från öppnade 10-plattförpackningar kan användas i en vecka vid förvaring i ren miljö vid 2 till 8°C.

KVALITETSKONTROLL UTFÖRD AV ANVÄNDAREN

För användarkvalitetskontroll, bör lämpliga CLSI[1] eller, om tillämpligt, nationella standarder konsulteras. Principiellt bör procedurerna beskrivna nedan under **Testförfarande** följas, inkluderande kontrollstammen, *S. pneumoniae* ATCC 49619, och de antimikrobiella lapparna som normalt används av laboratoriet bör testas två gånger i veckan avseende korrekt prestanda. De korrekta zondiametrarna kommer att finnas i tabell 3A i CLSI-dokument M100, vilket inkluderas med CLSI-dokument M2.[1]
Utseende av icke-inokulerat medium: röd (blodfärg), opak.

FÖRFARANDE

Tillhandahållet material

BD Mueller Hinton-agar med 5 % fårblod (tillhandahålls I flera olika plattformat; se **Förpackning/Tillgänglighet**). Mikrobiologiskt kontrollerade.

Material som ej medföljer

1. Inokulatbuljong i 5 mL kvantiteter, såsom Mueller Hinton II-buljong (BBL kat. nr 4397701, 16 x 102 mm rör) eller 0,9 % koksalt, för beredning av standardinokulat.
2. Bariumsulfat, jämförande standard (0,5 mL 0,048 M $BaCl_2$ [1,175 % vikt/volym $BaCl_2 2H_2O$] till 99,5 mL 0,18 M [0,36 N] H_2SO_4 [1 % volym/volym]).
3. Fotometrisk utrustning för justering av inokulatsuspensionens grumlighet till motsvarande 0,5 McFarland standard.
4. Som ett alternativ till ovanstående material (1-3), kan **BD Prompt Inoculation System (BD Prompt Inoculation-systemet)** (utrustning för volumetrisk beredning av inokulat) användas.[1,3]
5. Kontrollodling - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
6. Papperslappar impregnerade med specificerade mängder antimikrobiella ämnen, såsom **BD Sensi-Disc**-lappar för resistensbestämning.
7. Lappapplikator, såsom **BD Sensi-Disc** automatiska 6-, 8- eller 12-platsapplikator.
8. Anordning för mätning eller tolkning av zondiametrar, såsom skjutmått eller en linjal.
9. En inkubator som producerar luft som innehåller 5 % CO_2, eller annan utrustning som producerar en liknande CO_2-anrikad aerob luft.
10. Extra odlingsmedier, reagenser och laboratorieutrustning efter behov.

Provtyper

Denna produkt används för resistensbestämning av rena kulturer som har isolerats från kliniska prover (se även **KLINISKA PRESTANDA OCH PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR**).

Testförfarande

Den direkta kolonisuspensionsmetoden bör användas när *S. Pneumoniae* testas.[1] Iakttag aseptiska tekniker.

1. Säkerställ att en ren, färsk (=över natten) odling från ett icke-selektivt blodagarmedium är tillgänglig.
2. Suspendera växten i buljong såsom Mueller Hinton II-buljong eller steril 0,9 % koksaltlösning. Justera grumligheten så att den blir lika med bariumsulfatstandarden (0,5 McFarland-standard). Grumligheten i standarden och testokulatet bör jämföras genom att hålla rören framför en vit bakgrund med fint dragna svarta linjer, eller så kan en fotometrisk anordning användas.

3. Alternativa metoder för beredning av inokulat som involverar anordningar vilka tillåter direkt standardisering av inokulat utan justering av grumlighet, såsom **BD Prompt Inoculation-systemet**, har befunnits vara acceptabla för rutinmässiga analyseringssyften.[1,3]
4. Inom 15 minuter efter det att inokulatets grumlighet har justerats skall en steril provpinne doppas i det korrekt spädda inokulatet, pressas och vridas ordentligt mot rörets övre insida flera gånger, så att överskottsvätska pressas ut.
5. Inokulera på **BD Mueller Hinton-agar med 5 % fårblod** genom att stryka hela agarytan på plattan tre gånger samt rotera plattan 60° mellan strykningarna för att erhålla en jämn okulering.
6. Sätt tillbaka locket på plattan och håll denna vid rumstemperatur under åtminstone 3 min., men ej längre än 15 min. för att tillåta fuktigheten på ytan att absorberas innan de läkemedelsimpregnerade lapparna appliceras. Använd ej fler än nio lappar per 150 mm-platta, eller fyra lappar per 90 mm- och 100 mm-platta. För penicillintestning av *S. pneumoniae*, använd en 1 µg oxacillinlapp.[4]
7. Inkubera under 20 till 24 h vid 35 °C i en miljö med 5 % CO_2.

Resultat
Efter inkubation bör en sammanhängande växt ses. Om endast isolerade kolonier växer var inokulatet för tunt och bestämningen bör göras om.
Mät diametern på zonerna med fullständig hämning (enligt bedömning med blotta ögat), inklusive lappens diameter, till närmaste hela millimeter med ett skjutmått, eller en linjal, från toppen av plattan när locket avlägsnats.[5] Slutpunkten skall tas där området inte visar någon tydlig tillväxt som kan detekteras med blotta ögat. Bortse från svag tillväxt av små kolonier som kan detekteras med svårighet nära hämningszonens markerade kant.
Med **BD Mueller Hinton-agar med 5 % fårblod** bör växtens inhibitionszon mätas och inte zonen för inhibition av hemolys.

Beräkning och tolkning av resultat
Zondiametrar bör jämföras med de i tabell 2G för *S. pneumoniae* och 2H för andra streptokocker i CLSI-dokumentet M100 (M2), vilket tillhandahåller tolkningskriterier.[1] Erhållna resultat kan sedan rapporteras som resistenta, intermediära eller känsliga. Iakttag speciella tolkningskriterier för isolat av *S. pneumoniae* med oxacillinzondiametrar ≤ 19 mm som nämns i denna standard (se också **KLINISKA PRESTANDA OCH METODENS BEGRÄNSNINGAR**).

Obs! Tilläggstabeller till CLSI-dokument M2, som innehåller reviderade versioner med reviderade tabeller för antimikrobiella lappar och tolkningsstandarder, publiceras regelbundet. De senaste tabellerna bör konsulteras för information om aktuella rekommendationer. Den fullständiga standarden och tilläggstabellerna kan beställas från Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA. Tel.: ++1-610-688-1100.

KLINISKA PRESTANDA OCH METODENS BEGRÄNSNINGAR
Diskdiffusionstestet för resistensbestämning är utformat endast för användning med rena odlingar. En gramfärgning och en sannolik identifikation av isolatet rekommenderas innan resistensbestämningen förbereds.[1]
Detta medium används för resistensbestämningen av *S. pneumoniae* och andra streptokocker mot utvalda antimikrobiotika.[1,2,5] Observera att det inte finns pålitliga diskdiffusionskriterier för *S. pneumoniae* för amoxycillin, ampicillin, cefepim, cefotaxim, ceftriaxon, cefuroxim, imipenem och meropenem. Effektiviteten in vitro bestäms lämpligast med en MIC-metod.[1]
För bestämning av penicillinkänslighet för *S. pneumoniae* bör en oxacillinlapp användas. Isolat av *S. pneumoniae* med oxacillinzondiametrar ≥ 20 mm är känsliga (MIC ≤ 0,06 mg/mL) för penicillin. Eftersom zoner ≤ 19 mm med oxacillinscreeningslapp uppträder vid penicillinresistens, intermediär, och vissa känsliga stammar, bör ett penicillin-MIC, meropenem- och cefotaxim- eller ceftriaxon-MIC, bestämmas för alla isolat av *S. pneumoniae* med oxacillinzoner ≤ 19 mm.[1]
För streptokocker, andra än *S. pneumoniae*, rekommenderas inte oxacillintestet för bestämning av penicillinkänslighet. För betahemolytiska streptokocker, använd en penicillin- eller

ampicillinlapp. För *S. viridans* gruppen är inte penicillin- och oxacillindiskdiffusionstestningen pålitligt; deras känslighet bör bestämmas med MIC-testning.[1]

Antimikrobiell resistensbestämning med diskdiffusion av *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 utfördes internt med cefaklor, cefprozil, kloramfenikol, erytromycin, ofloxacin, tetracyklin, trimetoprim/sulfametoxazol och vankomycin. Genom att följa de testförfaranden som beskrivs i M2-A5 utfördes tjugo tester med kvalitetskontrollstammen och åtta antimikrobiella lappar över en period på 10 testdagar. För alla åtta antimikrobiotika föll 100 % (160/160) av zonstorlekarna inom de förväntade zonstorleksområdena publicerade i M2-A5 och tabell 3C i NCCLS-dokument M100-S6.[6,7] Standarddeviationen för tetracyklin var mindre än 1 mm, och för alla andra mikrobiotika, mindre än 2 mm.[8]
Reproducerbarhetsstudier (3 gånger per dag under 3 dagar) utfördes vid två fältplatser med de antimikrobiotika som är listade ovan mot *S. pneumoniae* ATCC 49619 och nio ytterligare välkarakteriserade stammar av *S. pneumoniae*. Standarder för tolkning av zondiametrar från tabell 2C i NCCLS-dokument M2-A5 och Tilläggstabell M100-S6 följdes för varje antimikrobiotika.[6,7] Testning med kloramfenikol, erytromycin, ofloxacin, tetracyklin och vankomycin resulterade i över 95 % klassöverensstämmelse med NCCLS:s referensmetod. Testning med trimetoprim/ sulfametoxazol resulterade i 90 % klassöverensstämmelse med NCCLS:s referensmetod. Reproducerbarhet kunde inte bestämmas för cefaklor och cefprozil på grund av avsaknad av tolkningsstandarder för dessa två antimikrobiotika. Baserat på ovannämnda studier, rekommenderas inte användningen av cefaklor, ceprozil eller trimetoprim/sulfametoxazol på detta medium när *S. Pneumoniae* testas. Dessutom, refereras det i litteraturen om svåra tolkningsfel med diskdiffusionstestning med trimetoprim/sulfametoxazol på Mueller Hinton-agarplattor med fårblod.[9]

Vid vissa kombinationer av organismer/antimikrobiella ämnen har hämningszonen inte alltid en skarpt avgränsad kant, vilket kan leda till feltolkning.
Olika faktorer som påverkar resistensbestämning med diskdiffusion har identifierats. Dessa inkluderar mediet, agardjup, lappens läkemedelskoncentration, inokulatkoncentration, inokulatålder och pH.[2]
Felaktig inokulatkoncentration kan producera felaktiga resultat. Hämningszonerna kan vara för små om inokulatet är för tungt och för stora och svåra att mäta om inokulatet är för lätt.
Felaktig förvaring av antimikrobiella lappar kan orsaka försvagad läkemedelskoncentration och ett falskt resistent resultat.
En organisms känslighet in vitro mot ett specifikt antimikrobiellt ämne betyder inte nödvändigtvis att ämnet kommer att vara effektivt in vivo. Se tillämpliga referenser avseende vägledning vid resultattolkning.[2,10]
Använd inte detta mediet för resistensbestämning av bakterier andra än *S. pneumoniae* och betahemolytiska streptokocker.

REFERENSER

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. Yolken (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. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8thed. 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. Data on file at 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.

FÖRPACKNINGAR/TILLGÄNGLIGHET

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (90 mm **Stacker**-plattor).

Kat.nr 254030	Färdiga odlingsplattor, 20 st. per förpackning
Kat.nr 254080	Färdiga odlingsplattor, 120 st. per förpackning

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

Kat.nr 255080	Färdiga odlingsplattor, 20 st. per förpackning

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

Kat.nr 254517	Färdiga odlingsplattor, 20 st. per förpackning

YTTERLIGARE INFORMATION

Kontakta närmaste BD-representant för ytterligare information.

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