# BD Mueller Hinton II Agar • BD Mueller Hinton II Agar 150 mm • BD Mueller Hinton II Agar, Square

## POUŽITIE

Pôda **BD Mueller Hinton II Agar**, ktorá je dostupná v niekoľkých formátoch misiek a veľkostiach balenia, sa používa pri štandardizovanej diskovej difúzii na určenie citlivosti rýchlo rastúcich aeróbnych organizmov voči antibiotikám.

## PRINCÍPY A VYSVETLENIE POSTUPU

Mikrobiologická metóda.
Keďže laboratóriá klinickej mikrobiológie používali začiatkom 60. rokov 20. storočia veľké množstvo postupov na určenie citlivosti baktérií voči antibiotikám a chemoterapeutikám, Bauer, Kirby a ďalší vyvinuli štandardizovaný postup, pri ktorom ako testovaciu pôdu vybrali pôdu Mueller Hinton Agar, pôvodne navrhnutú na izoláciu gonokokov.[1-4] Následná štúdia v spolupráci s medzinárodnými odborníkmi potvrdila hodnotu pôdy Mueller Hinton Agar na tento účel vďaka relatívne dobrej reprodukovateľnosti pôdy, jednoduchosti jej zloženia a množstvu experimentálnych údajov zhromaždených pri jej používaní.[5]

Komisia CLSI napísala normu pre postup Bauer-Kirby, ktorú nájdete v použitej literatúre.[6] Podľa postupu Bauer-Kirby boli vyvinuté ďalšie národné normy na testovanie citlivosti na antibiotiká. V týchto normách sa môžu hustota očkovacích látok, metóda očkovania, veľkosti výsledných zón a spôsob interpretácie odlišovať od normy komisie CLSI. Kým neexistujú všeobecné európske normy testovania citlivosti, v prípade, že nie je možné uplatniť smernice komisie CLSI, obracajte sa na národné normy.

Postup Bauer-Kirby je založený na difúzii antibiotík, ktoré sú napustené do papierových diskov, cez agarový gél.[7] Na rozdiel od starších metód, ktoré používali disky s vysokými a nízkymi koncentráciami antibiotík a na ich interpretáciu používali prítomnosť alebo neprítomnosť inhibičných zón, táto metóda využíva disky s koncentráciou jediného antibiotika a priemery zón sú vo vzťahu k minimálnym inhibičným koncentráciám (MIC).[1,2,6,7]
Pri tomto teste sa štandardizovaná suspenzia organizmu rozotrie na celý povrch pôdy. Papierové disky napustené špecifickým množstvom antibiotických alebo iných bakteriostatických látok sa potom umiestnia na povrch pôdy, miska sa inkubuje a odmerajú sa inhibičné zóny okolo každého disku. Porovnaním získaných veľkostí zón s veľkosťami v tabuľkách 2A až 2D v dokumente CLSI M100 (M2)[6] sa určí, či je organizmus voči látke citlivý, stredne citlivý alebo rezistentný.

Zistilo sa viacero faktorov, ktoré ovplyvňujú testy citlivosti diskovou difúziou. Patrí medzi ne pôda, nadmerná vlhkosť povrchu pôdy, výška agaru, účinnosť disku, koncentrácia očkovacej kultúry, pH a produkcia ß-laktamázy testovacími organizmami.[5-8]
Pôda **BD Mueller Hinton II Agar** je pripravovaná tak, aby obsahovala nízke hladiny thymínu a tymidínu[9.10] a kontrolované hladiny kalcia a magnézia.[11-13] Hladiny thymínu a tymidínu v surových materiáloch sa určujú pomocou diskovej difúzie s trimethoprim-sulfametoxazolom (SXT) a baktériou *Enterococcus faecalis* ATCC 33186 a/alebo 29212. Hladiny kalcia a magnézia sa kontrolujú testovaním materiálu a dopĺňaním zdrojmi kalcia a/alebo magnézia tak, ako je nutné na produkciu správnych priemerov zón s aminoglykozidnými antibiotikami a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

## ZLOŽENIE

**BD Mueller Hinton II Agar**

Zloženie* na jeden liter deionizovanej vody

| | |
|---|---|
| Hovädzí extrakt | 2,0 g |
| Kyslý kazeínový hydrolyzát | 17,5 g |
| Škrob | 1,5 g |
| Agar | 17,0 g |

pH 7,3 +/- 0,2

*Upravené a/alebo doplnené podľa potreby do jedného litra.

## UPOZORNENIA

IVD . Iba na profesionálne použitie.

Pôdu nepoužívajte, ak nesie známky mikrobiálnej kontaminácie, zmenu farby, vysušenie, prasknutie alebo iné znaky poškodenia. Prílišné zmrštenie tejto pôdy spôsobené vysušením môže viesť k nesprávnym výsledkom citlivosti.

Ďalšie informácie o postupoch pri práci s aseptikami, o biohazardoch a likvidácii použitého produktu nájdete v dokumente **VŠEOBECNÉ POKYNY NA POUŽÍVANIE.**

## USKLADNENIE A ŽIVOTNOSŤ

Prijaté misky s pôdou uskladňujte na tmavom mieste pri teplote 2 až 8 °C v pôvodnom obale až do začiatku používania. Nezmrazujte a nevystavujte nadmerným teplotám. Misky môžu byť naočkované až do dňa exspirácie (uvedeného na obale) a môžu byť inkubované podľa odporúčania.

Pôdy z otvorených balení po 10 kusov sa môžu používať jeden týždeň (ak sú uskladnené na čistom mieste pri teplote 2 až 8 °C).

## KONTROLA KVALITY

Informácie o kontrole kvality nájdete v príslušnom dokumente komisie CLSI [6] alebo v národných normách, ak sú k dispozícii. V zásade postupujte podľa postupov opísaných v časti **Postup testu** vrátane referenčných kmeňov spomínaných v časti **Nedodávaný materiál**. Pôdy Mueller Hinton II Agar a používané bakteriostatické disky treba testovať dvakrát do týždňa kvôli správnemu účinku.

Vzhľad nenaočkovanej pôdy: bezfarebná až bledosmotanová.

## POSTUP

**Dodávaný materiál**

Pôda **BD Mueller Hinton II Agar** (dodávaná v niekoľkých formátoch misiek; pozri **BALENIE/DOSTUPNOSŤ**). Mikrobiologicky kontrolované.

**Nedodávaný materiál**

1. Živný bujón v skúmavke, napr. **BD Trypticase™ Soy Broth** (Sójovokazeínový hydrolyzát) alebo Mueller Hinton II Broth (katiónovo upravený) na prípravu štandardnej očkovacej kultúry a sterilný bujón alebo fyziologický roztok na riedenie očkovacej kultúry.
2. Norma na porovnanie bária sulfátu (0,5 ml z 0,048 M $BaCl_2$ [1,175% w/v $BaCl_2 \cdot 2H_2O$] až 99,5 ml z 0,18 M [0,36 N] $H_2SO_4$ [1% v/v]).
3. Fotometrické zariadenie na prispôsobenie zákalu očkovacej suspenzie tak, aby zodpovedala miere 0,5 McFarlanda.
4. Namiesto hore uvedených materiálov možno použiť zariadenie **BD Prompt™ Inoculation System** (odmerné zariadenie na prípravu očkovacej kultúry).[6,18]
5. Kontrolné kultúry *Staphylococcus aureus* ATCC™ 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 (iba na kombinácie s inhibítorom ß-laktam-ß-laktamázy), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a *Enterococcus faecalis* ATCC 33186 alebo ATCC 29212.[6]
6. Papierové disky napustené špecifickým množstvom antibiotík,[6] napr. disky na testovanie citlivosti **BD Sensi-Disc™.**
7. Dispenzér, napr. 6, 8 alebo 12-miestny dispenzér **BD Sensi-Disc**. Dostupný je aj vhodný dispenzér pre misky Mueller Hinton II Agar Square.

8. Pravítko alebo iné zariadenie na meranie veľkosti zóny v milimetroch.
9. Pomocné kultivačné pôdy, činidlá a potrebné laboratórne vybavenie.

**Typy vzoriek**
Tento produkt sa používa na testovanie citlivosti čistých kultúr a nie je určený na použitie priamo s klinickými vzorkami (pozri **VLASTNOSTI A OBMEDZENIA POSTUPU**). Navrhlo sa, aby sa priama citlivosť na antibiotiká mohla priamo testovať na krvných a urinárnych kultúrach [14-17], testy sa však musia opakovať a potvrdiť na čistých kultúrach.

**Postup testu**
Opis metódy priamej suspenzie kolónií[6]:

1. Uistite sa, že máte k dispozícii čistú čerstvú (jeden deň starú) kultúru z neselektívnej pôdy, napr. krvného agaru.
2. Očkovacia kultúra na rutinné testy citlivosti sa môže pripraviť tak, že sa vytvorí suspenzia kolónií s fyziologickým roztokom alebo bujónom.[6] Ihneď prispôsobte túto suspenziu miere zákalu bária sulfátu (miera 0,5 McFarlanda) bez inkubácie. Mieru zákalu štandardnej a testovacej očkovacej kultúry treba porovnať tak, že podržíte obidve skúmavky pred bielym pozadím s jemne nakreslenými čiernymi čiarami alebo použitím fotometrického zariadenia.
3. Alternatívne metódy prípravy očkovacej kultúry použitím zariadení umožňujúcich priamu štandardizáciu očkovacích kultúr bez úpravy zákalu (napr. zariadenia **BD Prompt Inoculation System**) sa osvedčili ako prijateľné na rutinné testovacie účely.[18]
4. Do 15 minút od úpravy zákalu očkovacej kultúry ponorte sterilný tampón do dostatočne zriedenej očkovacej kultúry a silno ním zakrúžte niekoľkokrát proti hornej vnútornej stene skúmavky, aby sa vytlačila nadbytočná tekutina.
5. Celý agarový povrch pôdy naočkujte trikrát - otočením misky o 60° po každej čiare, aby sa dosiahlo rovnomerné naočkovanie.
6. Uzáver môžete nechať pootvorený na 3 až 5 minút a misky zanechať pri izbovej teplote najdlhšie 15 minút, aby sa akákoľvek povrchová vlhkosť mohla absorbovať skôr, než použijete disky napustené antibiotikom.
7. Disky aplikujte pomocou dispenzéra, pričom dodržiavajte preventívne opatrenia pre prácu s aseptikami. Položte disky tak, aby ich stredy boli od seba vzdialené aspoň 24 mm. Po umiestnení diskov na agar ich zatlačte sterilnou ihlou alebo peánom, aby sa celkom dotýkali povrchu pôdy. Pri umiestňovaní diskov pomocou dispenzéra so samočinným zatlačením **BD Sensi-Disc** tento krok nie je potrebný.
8. V priebehu 15 minút od umiestnenia diskov prevráťte misky a umiestnite ich do inkubátora s teplotou 35 °C. Misky sa nesmú inkubovať pri zvýšenej koncentrácii oxidu uhličitého.
9. Misky inkubujte po dobu 16 až 18 hodín. Úplná 24-hodinová inkubácia s oxacilínom je potrebná pri druhu *Staphylococcus aureus* na zistenie baktérie *S. aureus* (MRSA) rezistentnej voči meticilínu[19] a pri druhu *Enterococcus*, keď sa testuje vankomycínom na zistenie kmeňov rezistentných voči vankomycínu. Znakom rezistencie je rast v zjavne inhibičnej zóne.[20]

**Výsledky**

1. Po inkubácii by mal byť viditeľný zarastený „trávnik“. Ak rastú iba izolované kolónie, očkovacia kultúra bola príliš slabá a test treba zopakovať.
2. Zmerajte priemer zón úplnej inhibície (voľným okom) vrátane priemeru disku pri zaokrúhlení na celé milimetre použitím posuvných meradiel, pravítka alebo šablóny pripravenej na tento účel. Meradlo držte na dne obrátenej misky nad čiernym, svetlo neodrážajúcim pozadím a osvetlením zhora.
3. Za koncový bod treba považovať oblasť, ktorá nevykazuje žiaden rast viditeľný voľným okom. Nevšímajte si mierny rast drobných kolónií, ktoré môžte s ťažkosťami spozorovať pri okraji inhibičnej zóny. Výnimkou je baktéria *Staphylococcus aureus* pri testovaní pomocou oxacilínových diskov, a tiež enterokoky pri testovaní vankomycínom. V týchto prípadoch sa prenášané svetlo používa na zistenie hmlistého rastu okolo disku, ktorý vykazujú „magicky rezistentné“ kmene MRSA[19] alebo enterokoky rezistentné voči vankomycínu.[6] Pri druhoch

baktérie *Proteus* si nevšímajte žiadne plazenie vo vnútri zóny, pokiaľ je inhibičná zóna dostatočne viditeľná, aby sa dala zmerať. Pri trimethoprime a sulfonamidoch môžu antagonistické látky v pôde umožňiť mierny rast; nevšímajte si preto mierny rast (20 % alebo menej z trávnika rastu) a pri určovaní priemeru zóny merajte najvýraznejší okraj.

**Výpočet a interpretácia výsledkov**
Porovnajte priemery zón okolo diskov s priemermi v tabuľkách 2A až 2D v dokumente CLSI M100 (M2).[6] Špecifické organizmy sa potom môžu pomocou získaných výsledkov označiť za citlivé, stredne citlivé alebo rezistentné.

Poznámka. Pravidelne sa vydávajú doplnené informácie k dokumentu CLSI Document M2 alebo aktualizované verzie obsahujúce upravené tabuľky bakteriostatických diskov a výkladové normy. Na konzultáciu sa odporúčajú najnovšie tabuľky. Úplnú normu a doplnené informácie si môžte objednať z Národnej komisie pre klinické laboratórne normy (CLSI): Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA. Telefón: ++1-610-688-1100.

## VLASTNOSTI A OBMEDZENIA POSTUPU

Mueller Hinton Agar je štandardná pôda používaná na testovanie citlivosti rýchlo rastúcich aeróbnych alebo fakultatívne anaeróbnych baktérií, napr. stafylokokov, enterokokov, baktérií čeľade *Enterobacteriaceae* a aeróbnych gramnegatívnych paličiek (napr. druhy *Pseudomonas*). Na testovanie náročných druhov, napr. *Haemophilus, Neisseria* a *S. pneumoniae* a streptokokov boli vyvinuté odlišné postupy a iné pôdy a podmienky.

Štandardný postup komisie CLSI nie je určený na testovanie viazaných anaeróbnych organizmov, organizmov, ktoré na pôde Mueller Hinton Agar vykazujú slabý alebo pomalý rast, alebo organizmov, ktoré vykazujú odchýlky medzi jednotlivými kmeňmi, čo sa týka rýchlosti rastu.[6] Náročné organizmy (napr. *Haemophilus influenzae*) by sa mali testovať podľa dokumentu CLSI M2[6]

Inhibičná zóna pri niektorých kombináciách organizmov a bakterioskopických látok nemusí mať ostro ohraničený okraj, čo môže viesť k nesprávnej interpretácii.
Nesprávna koncentrácia očkovacej kultúry môže viesť k chybným výsledkom. Ak je očkovacia kultúra príliš silná, inhibičné zóny môžu byť príliš malé a naopak, ak je očkovacia kultúra príliš slabá, môžu byť príliš veľké a ťažko merateľné.
Nevhodné uskladnenie bakteriostatických diskov môže spôsobiť stratu účinnosti a nesprávny výsledok testu na rezistenciu.
Nadmerné zmenšenie tejto pôdy spôsobené nevhodným uskladnením môže viesť k nesprávnym výsledkom testu na citlivosť.
Citlivosť organizmu na špecifické antibiotikum in vitro nemusí nevyhnutne znamenať, že antibiotikum bude účinné in vivo. Ďalšie informácie o postupoch pri interpretácii výsledkov nájdete v použitej literatúre.[7,8]
Môžte sa stretnúť s baktériami vyžadujúcimi tymín a tymidín.[20,21] Tieto organizmy na pôde Mueller Hinton Agar, ktorá obsahuje nízke hladiny tymínu a tymidínu, nemusia dostatočne rásť.
Vyvinuté boli nové postupy využívajúce disky s vysokým obsahom gentamicínu (120 mg) a streptomicínu (300 mg) na preverenie (skríning) vysokej rezistencie voči aminoglykozidom ako indikátora toho, že izolát enterokoka synergisticky neovplyvní kombinácia penicilínu alebo glykopeptidu s aminoglykozidom.[6,21,22]
V dokumentoch CLSI M2 a M7 nájdete kompletnú diskusiu o zisťovaní MRSA, rezistentných streptokokov, gramnegatívnych bacilov s rozšíreným spektrom produkujúcich ß-laktamázu a ďalších obmedzeniach testu.[23]
Pôda Mueller Hinton II Agar dokázala svoju spoľahlivosť pri zisťovaní MRSA, ktoré okolo oxacilínových diskov produkujú hmlistú inhibičnú zónu.[19] V prípade pochybností použite dodatočnú metódu, napr. pôdu **BD Oxacillin Screen Agar.**
Metóda očkovania, interpretácia a limity veľkostí zón uvedené v tomto dokumente a v norme CLSI sa môžu odlišovať od národných noriem. [6, 24]

## POUŽITÁ LITERATÚRA


1. Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496.
2. Ryan, K.J., F.D. Schoenknecht, and W.M.M. Kirby. 1970. Disc sensitivity testing. Hospital Practice 5:91-100.
3. Barry, A.L., F. Garcia, and L.D. Thrupp. 1970. An improved single-disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly-growing pathogens. Am. J. Clin. Pathol. 53:149-158.
4. Mueller, J.H., and J. Hinton. 1941. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 48:330-333.
5. Ericsson, H.M., and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B, Suppl. 217.
6. 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**
7. 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.C. Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
8. Thornsberry, C., T.L. Gavan, and E.H. Gerlach. 1977. Cumitech 6, New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Coordinating ed., J.C. Sherris. American Society of Microbiology, Washington, DC.
9. Koch, A.E., and J.J. Burchall. 1971. Reversal of the antimicrobial activity of trimethoprim by thymidine in commercially prepared media. Appl. Microbiol. 22:812-817.
10. Ferone, R., S.R.M. Bushby, J.J. Burchall, W.D. Moore, and D. Smith. 1975. Identification of Harper-Cawston factor as thymidine phosphorylase and removal from media of substances interfering with susceptibility testing to sulfonamides and diaminopyrimidines. Antimicrob. Agents Chemother. 7:91-98.
11. Reller, L.G., F.D. Schoenknecht, M.A. Kenny, and J.C. Sherris. 1974. Antibiotic susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*: selection of a control strain and criteria for magnesium and calcium content in media. J. Infect. Dis. 130:454-463.
12. Pollock, H.M., B.H. Minshew, M.A. Kenny, and F.D. Schoenknecht. 1978. Effect of different lots of Mueller-Hinton Agar on the interpretation of the gentamicin susceptibility of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 14:360-367.
13. D'Amato, R.F., and C. Thornsberry. 1979. Calcium and magnesium in Mueller-Hinton agar and their influence on disk diffusion susceptibility results. Current Microbiol. 2:135-138.
14. Wegner, D.L., C.R. Mathis, and T.R. Neblett. 1976. Direct method to determine the antibiotic susceptibility of rapidly growing blood pathogens. Antimicrob. Agents Chemother. 9:861-862.
15. Johnson, J.E., and J.A. Washington II. 1976. Comparison of direct and standardized antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. Antimicrob. Agents Chemother. 10:211-214.
16. Waterworth, P.M., and M. Del Piano. 1976. Dependability of sensitivity tests in primary culture. J. Clin. Pathol. 29:179-184.
17. Hollick, G.E., and J.A. Washington II. 1976. Comparison of direct and standardized disk diffusion susceptibility testing of urine cultures. Antimicrob. Agents Chemother. 9:804-809.
18. 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.
19. Hindler, J.A., and C.B. Anderbied. 1985. Effect of the source of Mueller-Hinton agar and resistance frequency on the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 21:205-210.
20. Maskell, R., O.A. Okubadejo, R.H. Payne, and L. Pead. 1977. Human infections with thymine-requiring bacteria. J. Med. Microbiol, 11:33-45.
21. Haltiner, R.C., P.C. Migneault, and R.G. Robertson. 1980. Incidence of thymidine-dependent enterococci detected on Mueller-Hinton agar with low thymidine content. Antimicrob. Agents Chemother. 18:365-368.
22. Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. 3:46-65.

23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Approved standard: M7. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI, Wayne, PA, USA.*Search for latest version at* **www.clsi.org**
24. Jorgensen, J.H., and J.D. Turnidge. 2003. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

## BALENIE/DOSTUPNOSŤ

**BD Mueller Hinton II Agar (90 mm Petriho misky Stacker™;** [Štandardná veľkosť]**)**

| | |
|---|---|
| Kat. č. 254032 | Pôda v Petriho miskách pripravená na použitie, 20 misiek |
| Kat. č. 254081 | Pôda v Petriho miskách pripravená na použitie, 120 misiek |

**BD Mueller Hinton II Agar (150 mm)**

| | |
|---|---|
| Kat. č. 254062 | Pôda v Petriho miskách pripravená na použitie, 20 misiek |

**BD Mueller Hinton II Agar, Square (120 x 120 mm)**

| | |
|---|---|
| Kat. č. 254518 | Pôda v Petriho miskách pripravená na použitie, 20 misiek |

## ĎALŠIE INFORMÁCIE

Ak máte záujem o ďalšie informácie, kontaktujte miestneho zástupcu firmy 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. © 2011 BD