



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

NAMJENA

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (Agar Mueller Hinton s 5% ovčje krvi), dostupan u nekoliko formata pločica i veličina pakiranja, preporučuje se za disk difuzijsko ispitivanje osjetljivosti kliničkih izolata *Streptococcus pneumoniae* i drugih streptokoka prema standardima Instituta za kliničke i laboratorijske studije (CLSI).¹

NAČELA I OBJAŠNJENJE POSTUPKA

Mikrobiološka metoda.

Bauer-Kirbyjev postupak temelji se na difuziji protumikrobnih tvari impregniranih na papirnatim diskovima kroz agarozni gel.² U testnom postupku standardna suspenzija organizama štapićem se nanosi na čitavu površinu podloge. Papirnati diskovi impregnirani s točno određenim količinama antibiotika ili drugih protumikrobnih agenasa stavljaju se na površinu podloge, pločica se inkubira i mjere se zone inhibicije oko svakog diska. CLSI je napisao standard učinkovitosti za Bauer-Kirbyjev postupak i u tom dokumentu treba potražiti pojedinosti.¹ Razvijeni su i drugi nacionalni standardi za ispitivanje protumikrobne osjetljivosti u skladu s Bauer-Kirbyjevim postupkom. U tim se standardima gustoća inokuluma, metoda inokulacije, veličine dobivenih zona i način interpretacije mogu razlikovati od standarda CLSI. Budući da zajednički europski standardi za ispitivanje osjetljivosti ne postoje, treba primjenjivati lokalne nacionalne standarde ako smjernice CLSI nisu primjenjive.

Agar Mueller Hinton bez dodataka, iako prikladan za ispitivanje osjetljivosti brzo rastućih aerobnih patogena, nije prikladan za zahtjevnije organizme kao što je *Streptococcus pneumoniae*. CLSI-jev dokument M2 preporučuje da se u agar Mueller Hinton doda 5% defibrinirane ovčje krvi te detaljno opisuje i postupke kontrole kvalitete i kriterije interpretacije koji se koriste za *S. pneumoniae* i druge streptokoke.¹

REAGENSI

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood

Formula* po litri pročišćene vode

Goveđi ekstrakt	2,0 g
Kiseli hidrolizat kazeina	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0 g
Ovčja krv, defibrirana	5%
pH 7,3 ± 0,2	

*Prilagođeno i/ili dodano prema potrebi kako bi se udovoljilo kriterijima učinkovitosti.

MJERE OPREZA

Za in vitro dijagnostiku **IVD**. Samo za profesionalnu primjenu. ⓧ

Ne upotrebljavajte pločice ako su vidljivi znakovi kontaminacije mikrobima, promjena boje, sušenje, pucanje ili ostali znakovi pogoršanja kvalitete. Preveliko skupljanje podloge uslijed sušenja može dovesti do lažnih rezultata osjetljivosti.

Pogledajte dokument **OPĆE UPUTE ZA UPOTREBU** o postupcima aseptičnog rukovanja, biološkim opasnostima i odlaganju iskorištenog proizvoda.

ČUVANJE I ROK VALJANOSTI

Po primitku pohranite pločice na tamnom mjestu pri temperaturi od 2 – 8 °C u originalnom pakiranju do trenutka upotrebe. Pazite da ne dođe do smrzavanja i pregrijavanja. Pločice se

mogu inokulirati do datuma isteka valjanosti (pogledajte naljepnicu na pakiranju) te inkubirati tijekom preporučenih rokova inkubacije.

Pločice iz otvorenih pakiranja po 10 pločica mogu se koristiti tjedan dana ako se čuvaju na čistom mjestu pri temperaturi od 2 – 8 °C.

KORISNIČKA KONTROLA KVALITETE

Za korisničku kontrolu kvalitete potrebno je pogledati odgovarajuće standarde CLSI-ja¹ ili nacionalne standarde, ako su primjenjivi. Prije svega, treba slijediti dolje opisane postupke u **Postupku ispitivanja**, uključujući kontrolni soj, *S. pneumoniae* ATCC 49619, a odgovarajuću učinkovitost protumikrobnih diskova koji se obično koriste u laboratorijima treba ispitivati barem dva puta tjedno.

Ispravni promjeri zona navedeni su u tabeli 3A CLSI-jevog dokumenta M100 koji je uključen u CLSI-jev dokument M2.¹

Izgled neinokulirane podloge: crvena (boja krvi), neprozirna.

POSTUPAK

Priloženi materijal

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (isporučuje se u više različitih formata pločica; pogledajte **Pakiranje/ Dostupnost**). Mikrobiološki kontrolirano.

Materijal koji nije priložen

1. Bujon za inokulum u količinama od 5 mL, kao što je bujon Mueller Hinton II (BBL kat. br. 4397701, epruveta od 16 x 102 mm) ili 0,9% fiziološke otopine za pripremu standardnog inokuluma.
2. Standard usporedbe barijevog sulfata (0,5 mL 0,048 M BaCl₂ [1,175% w/v BaCl₂·2H₂O] s 99,5 mL 0,18 M [0.36 N] H₂SO₄ [1% v/v]).
3. Fotometrički uređaj za podešavanje zamućenosti suspenzije inokuluma da odgovara McFarland standardu 0,5.
4. Kao alternativa gore navedenim materijalima (1-3), može se koristiti **BD Prompt Inoculation System** (volumetrički uređaj za pripremu inokuluma).^{1,3}
5. Kontrolna kultura - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
6. Papirnati diskovi impregnirani s točno određenim količinama protumikrobnih agensa, kao što su diskovi za ispitivanje osjetljivosti **BD Sensi-Disc**.
7. Uređaj za doziranje diskova, kao što dozator sa samopopunjavanjem **BD Sensi-Disc** sa 6, 8 ili 12 mjesta.
8. Pribor za mjerenje ili interpretaciju promjera zona, kao što je šestar ili ravnalo.
9. Inkubator koji stvara atmosferu koja sadrži 5% CO₂ ili drugi uređaj koji stvara sličnu atmosferu obogaćenu CO₂.
10. Podloge za dodatne kulture, reagensi i laboratorijska oprema prema potrebi.

Vrste uzoraka

Ovaj proizvod koristi se za ispitivanje osjetljivosti čistih kultura koje su izolirane iz kliničkih uzoraka (pogledajte također **KARAKTERISTIKE SVOJSTAVA I OGRANIČENJA POSTUPKA**).

Postupak ispitivanja

Za ispitivanje *S. pneumoniae* treba koristiti direktnu metodu suspenzije kolonije.¹ Primjenjujte aseptične tehnike.

1. Osigurajte čistu, svježu (=koja je odležala preko noći) kulturu iz neselektivne podloge krvnog agara.
2. Otopite rast u bujonu kao što je bujon Mueller Hinton II ili u 0,9% sterilne fiziološke otopine. Podesite zamućenost da odgovara standardu barijevog sulfata (McFarland standard 0,5). Zamućenost standarda i inokuluma koji se ispituje treba usporediti držeći obje epruvete ispred bijele podloge s gusto iscrtanim crnim linijama ili možete koristiti fotometrički uređaj.
3. Alternativne metode pripreme inokuluma koje podrazumijevaju uređaje s direktnom standardizacijom inokuluma bez podešavanja zamućenosti, kao što je **BD Prompt Inoculation System**, mogu se koristiti za rutinska ispitivanja.^{1,3}

4. U roku od 15 min od podešavanja zamućenosti inokuluma umočite sterilni štapić u ispravno razrijeđeni inokulum i okrenite ga nekoliko puta čvrsto prema gornjoj unutrašnjoj stijenci epruvete kako biste iscijedili višak tekućine.
5. Inokulirajte na **BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood** tako da tri puta razmažete preko cijele površine pločice agara, pločicu zakrećite za 60° između razmazivanja kako biste postigli ravnomjernu inokulaciju.
6. Vratite poklopac na pločicu i čuvajte pločicu na sobnoj temperaturi najmanje 3 min, ali ne dulje od 15 min, kako biste omogućili apsorpciju vlage s površine prije nanošenja diskova impregniranih s lijekom. Nemojte koristiti više od devet diskova na pločici od 150 mm ili četiri diska na pločici od 90 i 100 mm. Za ispitivanje osjetljivosti *S. pneumoniae* na penicilin koristite oksacilinski disk od 1 µg.⁴
7. Inkubirajte tijekom 20 – 24 sata na temperaturi od 35 °C u atmosferi s 5% CO₂.

Rezultati

Nakon inkubacije morao bi biti vidljiv rast koji se slijeva u jednu točku. Ako rastu samo izolirane kolonije, inokulum je bio prelagan i treba ponoviti ispitivanje.

Izmjerite promjer zona potpune inhibicije (kako je vidljivo golim okom), uključujući promjer diska, do najbližeg cijelog milimetra, pomoću pomičnog kutnika ili ravnala, od vrha pločice bez poklopca.⁵ Za krajnju točku treba smatrati područje koje ne pokazuje očit rast vidljiv golim okom. Zanimarite slabi rast sitnih kolonija koje se teško mogu otkriti uz rub očite zone inhibicije.

S BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood treba mjeriti zonu inhibicije rasta, a ne zonu inhibicije hemolize.

Računanje i interpretacija rezultata:

Promjere zona treba usporediti s promjerima u tabeli 2G za *S. pneumoniae* i 2H za druge streptokoke u CLSI-jevom dokumentu M100 (M2) koji navodi kriterije interpretacije.¹ Dobiveni rezultati mogu se prijaviti kao rezistentni, umjereno osjetljivi ili osjetljivi. Pogledajte posebne kriterije interpretacije za izolate *S. pneumoniae* s oksacilinskim zonama promjera ≤ 19 mm koji se spominju u ovom standardu (pogledajte također **KARAKTERISTIKE UČINKOVITOSTI I OGRANIČENJA POSTUPKA**).

Napomena: Povremeno se objavljuju informativni dodaci CLSI-jevom dokumentu M2 ili revidirane verzije koje sadrže revidirane tabele protumikrobnih diskova i standardi za interpretaciju. Za trenutačne preporuke pogledajte posljednje tabele. Sve standarde i informativne dodatke možete dobiti od Instituta za kliničke i laboratorijske studije (Clinical and Laboratory Standards Institute), 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, SAD. Telefon: ++1-610-688-1100. www.clsi.org

KARAKTERISTIKE SVOJSTAVA I OGRANIČENJA POSTUPKA

Disk difuzijsko ispitivanje osjetljivosti namijenjeno je isključivo za upotrebu s čistim kulturama. Bojenje po Gramu i vjerojatna identifikacija izolata preporučuju se prije pripreme ispitivanja osjetljivosti.¹

Ova podloga se koristi za ispitivanje osjetljivosti *S. pneumoniae* i drugih streptokoka na odabrane protumikrobne agense.^{1,2,5} Napomenimo da za amoksisilin, ampicilin, cefepim, cefotaksim, ceftriakson, cefuroksim, imipenem i meropenem ne postoje pouzdani kriteriji disk difuzijskog testa za *S. pneumoniae*. In vitro aktivnost ovih protumikrobnih agenasa najbolje se utvrđuje pomoću metode MIC.¹

Oksacilinski disk koristit će se za određivanje osjetljivosti *S. pneumoniae* na penicilin. Izolati *S. pneumoniae* s promjerima oksacilinskih zona ≥ 20 mm osjetljivi su (MIC ≤ 0,06 mg/mL) na penicilin. Budući da se zone ≤ 19 mm s oksacilinskim probirnim diskom javljaju sa sojevima rezistentnim na penicilin, umjereno osjetljivim i nekim osjetljivim sojevima, penicilin, meropenem i cefotaksim ili ceftriakson MIC mora se odrediti na svim izolatima *S. pneumoniae* s oksacilinskim zonama ≤ 19 mm.¹

Za streptokoke koji nisu *S. pneumoniae* ne preporučuje se oksacilinski test za određivanje osjetljivosti. Za beta hemolitičke streptokoke koristite penicilinske ili ampicilinske diskove. Za skupinu streptokoka *viridans* difuzijsko ispitivanje penicilinskog i oksacilinskog diska nije pouzdano; njihovu osjetljivost treba odrediti ispitivanjem MIC.¹

Protumikrobno disk difuzijsko ispitivanje osjetljivosti *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 interno je provedeno s cefaklorom, cefprozilom, kloramfenikolom, eritromicinom, ofloksacinom, tetraciklinom, trimetoprimom/sulfametoksazolom i vankomicinom. U razdoblju od 10 dana ispitivanja provedeno je dvadeset ispitivanja sa sojevima za kontrolu kvalitete i s osam protumikrobnih diskova, poštujući postupke ispitivanja opisane u dokumentu M2-A5. Za svih osam protumikrobnih diskova, 100% (160/160) veličina zona ušlo je unutar očekivanog raspona veličina zona kao što je objavljeno u dokumentu M2-A5 i tabeli 3C NCCLS-ovog dokumenta M100-S6.^{6,7} Odstupanje standarda za tetraciklin bilo je manje od 1 mm, a za sve ostale protumikrobne agense manje od 2 mm.⁸

Reproduktivnost serije (3 puta na dan tijekom 3 dana) napravljena je u dva terenska centra s gore navedenim protumikrobnim agensima na *S. pneumoniae* ATCC 49619, a devet dodatnih jasno je otkrilo sojeve *S. pneumoniae*. Za svaki protumikrobni agens primijenjeni su standardi za interpretaciju promjera zona iz tabele 2C u NCCLS-ovom dokumentu M2-A5 i dodatku M100-S6.^{6,7} Ispitivanje s kloramfenikolom, eritromicinom, ofloksacinom, tetraciklinom i vankomicinom rezultiralo je s preko 95% slaganja kategorije s referentnom metodom NCCLS-a. Ispitivanje s trimetoprimom/sulfametoksazolom rezultiralo je s 90% slaganja kategorije s referentnom metodom NCCLS. Reprodukivnost se ne može odrediti za cefaklor i cefprozil zbog odsutnosti standarda interpretacije za ova dva protumikrobna agensa. Na temelju gore navedenih studija, upotreba cefaklora, cefprozila ili trimetoprima/sulfametoksazola ne preporučuje se na ovoj podlozi za ispitivanje *S. pneumoniae*. Osim toga, reference u literaturi navode pretjerane pogreške u interpretaciji disk difuzijskog ispitivanja s trimetoprimom/sulfametoksazolom na pločicama agara Mueller Hinton s ovčjom krvi.⁹

S nekim kombinacijama organizama-protumikrobnih agenasa zone inhibicije možda neće imati jasno izražene rubove što može dovesti do nepravilne interpretacije.

Otkriveno je da različiti faktori utječu na disk difuzijska ispitivanja osjetljivosti. Oni uključuju podlogu, dubinu agara, potentnost diska, koncentraciju inokuluma, starost inokuluma i pH vrijednost.²

Neispravna koncentracija inokuluma može dovesti do neispravnih rezultata. Zone inhibicije mogu biti premale ako je inokulum pretežak i mogu biti prevelike pa je mjerenje prekomplikirano ako je inokulum prelagan.

Nepravilno čuvanje protumikrobnih diskova može uzrokovati gubitak potentnosti i može dovesti do lažno rezistentnih rezultata.

In vitro osjetljivost organizma na određeni protumikrobni agens ne znači nužno da je taj agens učinkovit in vivo. U odgovarajućim referencama potražite upute za interpretaciju rezultata.^{2,10}

Ovu podlogu koristite isključivo za ispitivanje osjetljivosti bakterija *S. pneumoniae* i beta hemolitičkih streptokoka, a ne za druge bakterije.

REFERENCE

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, 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. Podaci u datoteci u mikrobiološkim sustavima tvrtke Becton Dickinson.
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.

PAKIRANJE/DOSTUPNOST

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (pločice Stacker od 90 mm)

Kat. br. 254030

Pločaste podloge spremne za upotrebu, cpu 20

Kat. br. 254080

Pločaste podloge spremne za upotrebu, cpu 120

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

Kat. br. 255080

Pločaste podloge spremne za upotrebu, cpu 20

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood, četverokutni (120 x 120 mm)

Kat. br. 254517

Pločaste podloge spremne za upotrebu, cpu 20

DODATNE INFORMACIJE

Dodatne informacije zatražite od lokalnog predstavnika tvrtke 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