



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

PRZEZNACZENIE

Podłoże **BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood**, dostępne w kilku formatach płytek, służy do dyfuzyjnego krążkowego badania wrażliwości izolatów klinicznych *Streptococcus pneumoniae* i innych paciorkowców zgodnie z normami opracowanymi przez Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (CLSI).¹

ZASADY I OBJAŚNIENIE PROCEDURY

Metoda mikrobiologiczna.

Procedura Bauera-Kirby opiera się na dyfuzji antybiotyków, jakimi są nasyczone papierowe krążki, w żelu agarowym.² W procedurze testowej na całej powierzchni podłoża rozprawdza się standaryzowaną zawiesinę drobnoustrojów. Krążki papierowe nasyczone określonymi ilościami antybiotyków lub innych preparatów przeciwbakteryjnych są umieszczane na powierzchni podłoża, płytka jest inkubowana, a następnie mierzone są strefy zahamowania wzrostu wokół poszczególnych krążków. CLSI opracowała standard wykonywania procedury Bauera-Kirby – szczegółowy opis przedstawiono w dokumencie wskazanym poniżej.¹ Na podstawie procedury Bauera-Kirby opracowano inne, krajowe standardy badań wrażliwości bakterii. W tych standardach gęstość posiewanego materiału, metoda inokulacji, rozmiary powstających stref oraz sposób interpretacji mogą się różnić od standardu CLSI. Wprawdzie nie istnieją wspólne europejskie standardy badań wrażliwości, jednak gdy wytyczne CLSI nie znajdują zastosowania, należy korzystać ze standardów krajowych obowiązujących na danym terenie.

Chociaż agar Muellera Hinton bez dodatków nadaje się do badań wrażliwości patogenów tlenowych wykazujących szybki wzrost, jednak nie jest odpowiednim podłożem dla bakterii o większych wymaganiach odżywczych, np. *Streptococcus pneumoniae*. W dokumencie M2 wydanym przez CLSI zaleca się stosowanie agaru Muellera Hinton wzbogaconego 5% krwią owczą pozbawioną włókna oraz opisuje szczegółowe informacje na temat procedur kontroli jakości i kryteriów interpretacji wyników badań *S. pneumoniae* i innych paciorkowców.¹

ODCZYNNIKI

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood

Skład* w przeliczeniu na jeden litr wody oczyszczonej

Wyciąg wołowy	2,0 g
Kwaśny hydrolizat kazeiny	17,5
Skrobia	1,5
Agar	17,0 g
Krew owcza pozbawiona włókna	5%

pH 7,3 ± 0,2

*Skorygowany i (lub) uzupełniony zgodnie z wymaganiami mającymi na celu spełnienie kryteriów wydajności.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

IVD . Wyłącznie do zastosowań profesjonalnych. ⓧ

Nie należy używać płytek, jeżeli są na nich widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia, pęknięcia lub inne zjawiska wskazujące na pogorszenie jakości.

Nadmierne obkurczenie opisywanego podłoża na skutek wysychania może prowadzić do uzyskania fałszywych wyników, wskazujących na występowanie wrażliwości.

Procedury aseptycznej techniki pracy z produktem, zagrożenia biologiczne oraz usuwanie zużytego produktu opisano w dokumencie **OGÓLNE INSTRUKCJE DOTYCZĄCE STOSOWANIA**.

PRZECHOWYWANIE I DOPUSZCZALNY OKRES PRZECHOWYWANIA

Po otrzymaniu, płytki należy przechowywać w ciemnym miejscu w temperaturze od 2 do 8° C, w ich oryginalnym opakowaniu izolującym do chwili użycia. Unikać zamrażania i przegrzewania. Posiewu na płytki można dokonywać aż do daty ważności (patrz etykieta na opakowaniu) i inkubować w zalecanych czasach inkubacji.

Płytek z otwartych stosów zawierających po 10 płytek można używać przez okres jednego tygodnia, przechowując w czystym miejscu w temperaturze od 2 do 8° C.

KONTROLA JAKOŚCI PRZEZ UŻYTKOWNIKA

Procedury kontroli jakości przez użytkownika przedstawiono w standardach CLSI¹ bądź w odpowiednich standardach krajowych. Zasadniczo należy stosować procedury opisane w części **Procedura testowa**, używając szczepu kontrolnego, *S. pneumoniae* ATCC 49619, a krążki nasycone środkami przeciwbakteryjnymi wykorzystywane w normalnej pracy laboratorium należy testować co najmniej dwa razy w tygodniu w ramach kontroli prawidłowego działania. Prawidłowe średnice stref przedstawiono w tabeli 3A dokumentu CLSI M100, dołączonego do dokumentu CLSI M2¹

Wygląd podłoża bez posiewu: Zabarwienie czerwone (kolor krwi), matowe.

PROCEDURA

Dostarczane materiały

Podłoże **BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood** (dostarczane w kilku różnych formatach płytek; zobacz część **Pakowanie / dostępność**). Sprawdzane pod kątem obecności mikroorganizmów.

Materiały niedostarczane

1. Pożywka w objętości 5 ml, np. Mueller Hinton II Broth (Nr kat. BBL 4397701, probówka 16 x 102 mm) lub roztwór soli fizjologicznej o stężeniu 0,9% do przygotowywania standardowego inokulum.
2. Roztwór wzorcowy z siarczanem (VI) baru (0,5 ml roztworu BaCl₂ o stężeniu 0,048 M [roztwór BaCl₂·2H₂O o stężeniu wagowo-objętościowym 1,175%] w 99,5 ml H₂SO₄ o stężeniu objętościowo-objętościowym 0,18 M [0,36 N]).
3. Urządzenie fotometryczne w celu korekty zmętnienia zawiesiny inokulum, tak aby było ono równe wzorcowi 0,5 McFarland.
4. Alternatywnie do wyżej wymienionych materiałów (1-3) można użyć **BD Prompt Inoculation System** (urządzenie wolumetryczne do przygotowywania inokulum).^{1,3}
5. Posiew kontrolny – *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
6. Krążki bibułowe nasycone określoną ilością antybiotyków, np. krążki do badania wrażliwości **BD Sensi-Disc**.
7. Aplikator krążków, np. automatyczny 6-, 8- lub 12-pozycyjny aplikator **BD Sensi-Disc**.
8. Przyrząd do pomiaru i interpretowania średnicy stref, np. cyrkiel lub linijka.
9. Inkubator wytwarzający atmosferę zawierającą 5% CO₂ bądź inne urządzenie, wytwarzające podobną atmosferę wzbogaconą w CO₂.
10. Pomocnicze pożywki hodowlane, odczynniki i wyposażenie laboratoryjne zgodnie z wymaganiami.

Typy próbek

Produkt ten jest używany do badań wrażliwości czystych hodowli, które wyizolowano z próbek klinicznych (patrz także **CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA I OGRANICZENIA PROCEDURY**).

Procedura testowa

Podczas badania w kierunku obecności *S. pneumoniae* należy stosować metodę bezpośredniej zawiesiny kolonii.¹ Należy przestrzegać zasad techniki aseptycznej.

1. Upewnić się, czy dostępna jest czysta, świeża (=jednodniowa) hodowla z nieselektywnego podłoża agarowego z krwią.
2. Wykonać zawiesinę bakterii w pożywce takiej jak Mueller Hinton II Broth lub sterylnym roztworze soli fizjologicznej o stężeniu 0,9%. Skorygować zmętnienie, tak aby było równoważne wzorcowi z siarczanem (VI) baru (wzorzec 0,5 McFarland). Zmętnienie standardu i badanego inokulum należy porównać przez obejrzenie obu probówek na białym tle z wyraźnymi czarnymi liniami; można do tego celu użyć także urządzenia fotometrycznego.
3. W przypadku rutynowych badań za dopuszczalne uznaje się stosowanie alternatywnych metod przygotowywania inokulum, w tym za pomocą urządzeń umożliwiających bezpośrednią standaryzację inokulum bez korygowania zmętnienia, takich jak **BD Prompt Inoculation System**.^{1,3}
4. W ciągu 15 min od skorygowania zmętnienia inokulum należy zanurzyć sterylną wymazówkę w odpowiednio rozcieńczonym inokulum i kilkakrotnie ją obrócić, mocno przyciskając do górnej wewnętrznej ścianki probówki, tak by odsączyć nadmiar płynu.
5. Wykonać posiew na **BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood**, trzykrotnie rozprowadzając materiał po całej powierzchni podłoża agarowego na płytce, obracając płytkę za każdym razem o 60°, aby uzyskać równomierny posiew.
6. Złożyć na płytkę pokrywkę i pozostawić ją w temperaturze pokojowej na co najmniej 3 min, lecz nie dłużej niż 15 min, w celu zaabsorbowania wilgoci na powierzchni podłoża przed nałożeniem nasyconych krążków. Nie należy stosować więcej niż dziewięciu krążków na płytce o średnicy 150 mm lub czterech krążków na płytkach o średnicy 90 i 100 mm. W przypadku badania wrażliwości *S. pneumoniae* na penicylinę należy stosować krążek nasycony 1 µg oksacyliny.⁴
7. Inkubować płytki przez 20–24 godz. w temperaturze 35°C w atmosferze 5% CO₂.

Wyniki

Po inkubacji powinien być widoczny zlewny wzrost. Wystąpienie jedynie izolowanych kolonii oznacza, że inokulum było zbyt rozcieńczone. Należy wówczas powtórzyć test.

Zdjąć pokrywkę i zmierzyć średnicę stref całkowitego zahamowania wzrostu (ocenianą nieuzbrojonym okiem), włączając średnicę krążka, w zaokrągleniu do pełnych milimetrów, za pomocą cyrkla lub linijki, od strony górnej powierzchni płytki.⁵ Jako granicę należy przyjąć obszar niewykazujący wyraźnie widocznych oznak wzrostu, który można dostrzec nieuzbrojonym okiem. Należy pominąć śladowy wzrost oraz małe kolonie, które można z trudem zauważyć w pobliżu granicy wyraźnej strefy hamowania.

W przypadku podłoża **BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood** należy mierzyć strefę zahamowania wzrostu, a nie strefę zahamowania hemolizy.

Obliczanie i interpretacja wyników

Średnice stref należy porównać z wartościami podanymi w tabeli 2G dla *S. pneumoniae* i 2H dla innych paciorkowców, zamieszczonymi w dokumencie CLSI M100 (M2), w którym przedstawiono kryteria interpretacji.¹ Uzyskane wyniki można następnie przekazać osobie zlecającej badanie (oporne, pośrednie, wrażliwe). Należy przestrzegać specjalnych kryteriów interpretacji w przypadku szczepów *S. pneumoniae* ze strefami oksacyliny o średnicy ≤ 19 mm, omówionymi w tym standardzie (zobacz także **CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW I OGRANICZENIA DOTYCZĄCE PROCEDURY**).

Uwaga: Okresowo są publikowane informacyjne dodatki do dokumentu CLSI M2, bądź jego uaktualnione wersje, zawierające poprawione tabele krążków przeciwbakteryjnych oraz standardy interpretacji. Należy przestrzegać zaleceń podanych w tych tabelach. Pełny wzorzec i dodatki informacyjne można zamówić pod adresem Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA. Telefon: +1-610-688-1100.

CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW I OGRANICZENIA DOTYCZĄCE PROCEDURY

Dyfuzyjne krążkowe badanie wrażliwości można wykonywać wyłącznie na czystych hodowlach. Przed badaniem wrażliwości zaleca się wykonanie barwienia metodą Grama oraz wstępną identyfikację izolowanych szczepów.¹

Opisywane podłoże służy do badania wrażliwości *S. pneumoniae* i innych paciorkowców na wybrane antybiotyki.^{1,2,5} Należy zwrócić uwagę na to, że nie istnieją miarodajne kryteria dla dyfuzyjnych krążkowych badań wrażliwości *S. pneumoniae* na amoksycylinę, ampicylinę, cefepim, cefotaksym, ceftriakson, cefuroksym, imipenem i meropenem. Aktywność tych antybiotyków *in vitro* najlepiej określać metodą MIC.¹

Do określenia wrażliwości *S. pneumoniae* na penicylinę należy stosować krążek nasycony oksacyliną. Szczepy *S. pneumoniae* w przypadku których średnica stref dla oksacyliny wynosi ≥ 20 mm, są wrażliwe ($MIC \leq 0,06$ mg/ml) na penicylinę. Ponieważ w przypadku opornych na penicylinę, pośrednich, a także niektórych wrażliwych szczepów *S. pneumoniae* średnica strefy zahamowania wokół krążka z oksacyliną wynosi ≤ 19 mm, dla takich szczepów należy oznaczyć MIC dla penicyliny, meropenemu i cefotaksymu lub ceftriaksonu.¹

W przypadku paciorkowców innych niż *S. pneumoniae* określanie wrażliwości na penicylinę za pomocą oksacyliny nie jest zalecane. W przypadku paciorkowców beta-hemolizujących należy stosować krążek nasycony penicyliną lub ampicyliną. W przypadku paciorkowców z grupy *viridans* badania dyfuzyjne z krążkami nasyconymi penicyliną i oksacyliną nie są miarodajne; wrażliwość tych drobnoustrojów należy określić w teście MIC.¹

Dyfuzyjne krążkowe badania wrażliwości na antybiotyki z zastosowaniem szczepu *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 zostały wykonane przez producenta dla cefakloru, cefprozylu, chloramfenikolu, erytromycyny, ofloksacyny, tetracykliny, trimetoprimu/sulfametoksazolu oraz wankomycyny. Po wykonaniu procedur testowych opisanych w dokumencie M2-A5, w okresie 10 dni badań zostało wykonanych dwadzieścia testów ze szczepem do kontroli jakości i ośmioma krążkami przeciwbakteryjnymi. W przypadku wszystkich ośmiu antybiotyków, 100% (160/160) rozmiarów stref mieściło się w oczekiwanych zakresach, opublikowanych w dokumencie M2-A5 i w tabeli 3C dokumentu NCCLS M100-S6.^{6,7} Odchylenie standardowe dla tetracykliny wynosiło poniżej 1 mm, a dla wszystkich pozostałych antybiotyków – poniżej 2 mm.⁸

W dwóch ośrodkach terenowych przeprowadzono badania odtwarzalności (3 razy dziennie przez 3 dni) wymienionych antybiotyków ze szczepem *S. pneumoniae* ATCC 49619 i dziewięcioma dodatkowymi dobrze scharakteryzowanymi szczepami *S. pneumoniae*. We wszystkich badaniach przestrzegano standardów interpretacji średnicy stref, wyszczególnionych w tabeli 2C dokumentu NCCLS M2-A5 i dodatku M100-S6.^{6,7} Badania chloramfenikolu, erytromycyny, ofloksacyny, tetracykliny i wankomycyny wykazały zgodność kategorii z metodą referencyjną NCCLS w ponad 95%. Badania trimetoprimu/sulfametoksazolu wykazały zgodność kategorii z metodą referencyjną NCCLS w ponad 90%. Odtwarzalności nie można było określić w przypadku cefakloru i cefprozylu z uwagi na brak standardów interpretacyjnych dla tych dwóch antybiotyków. Z przedstawionych wyników badań wynika, że nie zaleca się stosowania cefakloru, cefprozylu i trimetoprimu/sulfametoksazolu do badań *S. pneumoniae* na tym podłożu. Ponadto w piśmiennictwie istnieją doniesienia na temat znacznych błędów w interpretacji testów dyfuzyjnych z krążkami nasyconymi trimetoprimem/sulfametoksazolem na płytkach z agarem Muellera Hintona z dodatkiem krwi owczej.⁹

W przypadku pewnych połączeń drobnoustroj-antybiotyk strefa zahamowania może nie mieć wyraźnej granicy, co może być przyczyną błędów interpretacji.

Zidentyfikowano różne czynniki mające wpływ na dyfuzyjne krążkowe badania wrażliwości. Należy do nich rodzaj podłoża, głębokość agaru, moc krążka, stężenie inokulum, czas od przygotowania inokulum oraz pH.²

Niewłaściwe stężenie inokulum może prowadzić do uzyskania nieprawidłowych wyników. Jeśli stężenie inokulum jest zbyt duże, strefy zahamowania mogą być zbyt małe, natomiast jeśli stężenie inokulum jest zbyt małe, strefy mogą być za duże i trudne do zmierzenia.

Niewłaściwe przechowywanie krążków z antybiotykami może spowodować utratę skuteczności i fałszywe wyniki wskazujące na występowanie oporności.

Wrażliwość drobnoustroju *in vitro* na określony antybiotyk nie zawsze oznacza, że dany lek będzie skuteczny w warunkach *in vivo*. Wskazówki dotyczące interpretacji wyników przedstawiono w odpowiednich publikacjach.^{2,10} Nie należy wykorzystywać opisywanego podłoża do badania wrażliwości bakterii innych niż *S. pneumoniae* i paciorkowce beta-hemolizujące.

PIŚMIENNICTWO

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. 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.

PAKOWANIE / DOSTĘPNOŚĆ

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

Nr katalogowy 254030 Gotowe podłoża na płytkach
hodowlanych, cpu 20

Nr katalogowy 254080 Gotowe podłoża na płytkach
hodowlanych, cpu 120

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

Nr katalogowy 255080 Gotowe podłoża na płytkach
hodowlanych, cpu 20

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

Nr katalogowy 254517 Gotowe podłoża na płytkach
hodowlanych, cpu 20

DODATKOWE INFORMACJE

W celu uzyskania dodatkowych informacji należy się skontaktować z lokalnym przedstawicielem 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. © 2013 BD