



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

PRZEZNACZENIE

BD Mueller Hinton II Agar (Podłoże Muellera Hintona II), dostępne w kilku formatach płytek, jest wykorzystywane we wzorcowej dyfuzyjnej, krążkowej procedurze określania wrażliwości izolatów wykazujących szybki wzrost drobnoustrojów tlenowych na środki przeciwdrobnoustrojowe wzorcowane przez Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) oraz Europejski Komitet Badania Wrażliwości Drobnoustrojów (ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST).^{1,2}

ZASADY I OBJAŚNIENIE PROCEDURY

Metoda mikrobiologiczna.

Ponieważ we wczesnych latach 60. w klinicznych laboratoriach mikrobiologicznych stosowano wiele różnych procedur do określania wrażliwości bakterii na antybiotyki i inne chemioterapeutyki, Bauer, Kirby i inni opracowali wzorcową procedurę, do której jako podłoże testowe wybrano agar Muellera Hintona, pierwotnie opracowane do izolacji gonokoków.¹⁻⁵ Przeprowadzone później wspólne, międzynarodowe badanie potwierdziło przydatność agaru Muellera Hintona do tego celu ze względu na jego stosunkowo dobrą odtwarzalność, prosty skład oraz dużą ilość dostępnych danych eksperymentalnych na jego temat.⁶

CLSI i EUCAST opublikowały normy wydajności dla procedury Bauer-Kirby i w dokumentach tych należy sprawdzać szczegóły.^{7,8} Na podstawie procedury Bauera-Kirby opracowane zostały inne, krajowe normy badań wrażliwości przeciwdrobnoustrojowej bakterii. W normach tych gęstość inokulum, metoda zaszczepiania, rozmiary powstających stref oraz sposób interpretacji mogą różnić się od zaleceń CLSI i EUCAST.

Procedura Bauera-Kirby jest oparta na dyfuzji substancji przeciwdrobnoustrojowych, jakimi są nasyczone papierowe krążki, w żelu agarowym.⁹ W odróżnieniu od wcześniej stosowanych metod, w których wykorzystywano krążki o dużym i małym stężeniu antybiotyku, a interpretacji dokonywano na podstawie występowania lub braku stref zahamowania, w opisywanej metodzie stosuje się krążki o jednym, określonym stężeniu antybiotyku, a średnice stref są skorelowane z minimalnym stężeniem hamującym (MIC).^{1-3,7-9}

W procedurze testowej standaryzowana zawiesina drobnoustrojów jest rozprowadzana po całej powierzchni podłoża. Na powierzchni podłoża umieszczane są krążki papierowe nasyczone określonymi ilościami antybiotyków lub innych środków przeciwbakteryjnych, płytka jest inkubowana, a następnie mierzone są strefy zahamowania wzrostu wokół poszczególnych krążków. Określanie, czy organizm jest wrażliwy (S), pośredni (I) lub odporny (R) na środek odbywa się przez porównanie uzyskanych wielkości stref do tych uzyskanych w Tabelach od 2A do 2D w dokumencie M100 (M2) CLSI.¹⁰ Określanie wrażliwości (S) lub oporności (R) na środek przeprowadza się porównując uzyskane strefy do tych wymienionych w tabelach punktów przerwania EUCAST.¹¹

Zidentyfikowano różne czynniki, które mają wpływ na wyniki dyfuzyjnych krążkowych badań wrażliwości. Należy do nich rodzaj podłoża, nadmierna wilgotność na powierzchni podłoża, głębokość agaru, moc krążków, stężenie inokulum, pH, a także wytwarzanie β -laktamazy przez badane drobnoustroje.^{6-9,12}

Podłoże **BD Mueller Hinton II Agar** jest wytwarzane w taki sposób, aby zawierało niski poziom tyminy i tymidyny, a także kontrolowany poziom wapnia i magnezu.¹⁵⁻¹⁷ Poziom tyminy i tymidyny w surowcach jest określany na podstawie dyfuzyjnej krążkowej procedury z zastosowaniem krążków nasyconych trimetoprimem-sulfametoksazolem (SXT) oraz szczepów *Enterococcus faecalis* ATCCTM 17 i (lub) 29212. Poziom wapnia i magnezu jest kontrolowany poprzez badanie surowców i dodanie niezbędnych ilości substancji będących źródłami wapnia i (lub) magnezu, aż do uzyskania prawidłowych średnic stref przy zastosowaniu antybiotyków aminoglikozydowych i szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Głębokość agaru każdego formatu płytki **BD Mueller Hinton II Agar** dostosowano, aby spełniała zalecenia zarówno CLSI jak i EUCAST.^{7,8}

ODCZYNNIKI

BD Mueller Hinton II Agar

Skład* w przeliczeniu na litr wody oczyszczonej

Ekstrakt wołowy	2,0 g
Kwaśny hydrolizat kazeiny	17,5
Skrobia	1,5
Agar	17,0

pH 7,3+/-0,2

*Odpowiednio skorygowany lub uzupełniony w celu spełnienia kryteriów wydajności.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

IVD . Wyłącznie do zastosowań profesjonalnych. 

Nie należy używać płytek, jeżeli są na nich widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia, pęknięcia lub inne oznaki pogorszenia jakości. Nadmierne obkurczenie się opisywanego podłoża na skutek wysychania może prowadzić do uzyskania fałszywych wyników wskazujących na występowanie wrażliwości.

Procedury aseptycznej techniki pracy z produktem, zagrożenia biologiczne oraz utylizowanie zużytego produktu opisano w dokumencie **OGÓLNA INSTRUKCJA DOTYCZĄCA STOSOWANIA**.

WARUNKI I OKRES PRZECHOWYWANIA

Dostarczone płytki należy przechowywać w zaciemnionym pomieszczeniu, w temperaturze od 2 – 8°C, w oryginalnych opakowaniach w formie rękawa, aż do momentu użycia. Nie zamrażać i nie przegrzewać. Płytki należy wykorzystać do posiewu bakterii przed upływem daty ważności (zobacz etykietę na opakowaniu) i inkubować zgodnie z zalecanymi czasami inkubacji. Płytki z otwartego zestawu 10 płytek można zużyć w ciągu tygodnia, pod warunkiem przechowywania w czystym miejscu w temperaturze od 2 do 8°C.

KONTROLA JAKOŚCI PRZEZ UŻYTKOWNIKA

Procedury kontroli jakości przez użytkownika przedstawiono w odpowiednich normach CLSI¹⁰ i EUCAST¹⁸ bądź normach krajowych (jeżeli dotyczy). Reprezentatywne próbki podłoża należy zaszczyć hodowlami wymienionych niżej szczepów (szczegółowe informacje — patrz **Typy próbek i Procedura testowa**). Inkubować płytki, najlepiej w pozycji odwróconej, zgodnie ze wskazanymi poniżej wartościami temperatury, czasu i warunków atmosferycznych. Wykorzystywane płytki z podłożem **BD Mueller Hinton II Agar** oraz krążki nasycone antybiotykami należy testować co najmniej dwa razy w tygodniu w ramach kontroli jakości.

Tabela 1: Oczekiwane wyniki zakresów średnicy stref zahamowania dla szczepów kontroli jakości według CLSI¹⁹ i EUCAST²⁰

Media: CLSI, EUCAST

Szczep	Środek przeciwdrobnoustrojowy	Zakres (mm)	Inkubacja
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ¹	Ampicylina (10 µg)	15-22	CLSI: 16 – 18 h, 35±2°C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1°C
	Imipenem (10 µg)	26-32	
	Gentamycyna (10 µg)	19-26	
	Amikacyna (30 µg)	19-26	
	Ciprofloksacyna (5 µg)	30-40	
	Trimetoprym-sulfametoksazol SXT (1,25 µg – 23,75 µg)	23-29	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 ¹	Amoksycylina/kwas klawulanowy (30 µg)	17-22	CLSI: 16 – 18 h, 35±2°C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1°C
	Ampicylina/sulbaktam (30 µg)	13-19	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 ²	Trimetoprym-sulfametoksazol (1,25 µg – 23,75 µg)	26-34	CLSI: 16 – 18 h, 35±2°C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1°C
	Ciprofloksacyna (5 µg)	19-25	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ³	Tetracyklina (30 µg)	24-30	CLSI: 16 – 18 h, 35±2°C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1°C
	Gentamycyna (10 µg)	19-27	
	Erytromycyna (15 µg)	22-30	
	Klindamycyna (2 µg)	24-30	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 ²	Tetracyklina (30 µg)	23-31	CLSI: 16 – 18 h, 35±2°C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1°C
	Gentamycyna (10 µg)	19-25	
	Erytromycyna (15 µg)	23-29	
	Klindamycyna (2 µg)	23-29	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ¹	Aztreonam (30 µg)	23-29	CLSI: 16 – 18 h, 35±2°C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1°C
	Amikacyna (30 µg)	18-26	
	Gentamycyna (10 µg)	17-23	
	Imipenem (10 µg)	20-28	
Bez posiewu	Bezbarwne do jasnobursztynowego		

¹: Wyniki dla szczepów kontroli jakości według CLSI i EUCAST

²: Wyniki dla szczepów kontroli jakości według EUCAST

³: Wyniki dla szczepów kontroli jakości według CLSI

PROCEDURA

Dostarczane materiały

Podłoże **BD Mueller Hinton II Agar** (dostarczane w kilku różnych formatach płytek; zobacz **Pakowanie/dostępność**). Sprawdzane pod względem obecności drobnoustrojów.

Materiały niedostarczane

1. Według CLSI: Pożywka płynna w probówce, taka jak **BD Trypticase™ Soy Broth** (pożywka z ekstraktem sojowo-kazeinowym) lub Mueller Hinton II Broth (ze skorygowaną zawartością kationów) do przygotowania inokulum standardowego, a także sterylna pożywka płynna lub roztwór fizjologiczny do rozcieńczenia inokulum.⁷
Według EUCAST: 0,9% sól fizjologiczna (5 mL) do przygotowywania inokulum standardowego.⁸
2. Wzorzec porównawczy z siarczanem (VI) baru (0,5 mL 0,048 M roztworu BaCl₂ [1,175% stężenie wagowo-objętościowe BaCl₂ · 2H₂O] do 99,5 mL 0,18 M [0,36 N] H₂SO₄ [1% stężenie wagowo-objętościowe]) lub
3. Urządzenie fotometryczne do korygowania zmętnienia zawiesiny inokulum, tak aby było ono równe standardowi 0,5 McFarland.
4. Alternatywnie do wyżej wymienionych materiałów (1 – 3) można użyć **BD Prompt™ Inoculation System** (urządzenie wolumetryczne do przygotowywania inokulum).^{7,8,25}
5. Hodowle kontrolne według CLSI: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 i ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.¹⁰
Hodowle kontrolne według EUCAST: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 i ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i ATCC 51299, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 i *Staphylococcus aureus* NCTC 12493.¹⁸
6. Krążki papierowe nasycone określoną ilością środków przeciwdrobnoustrojowych,^{7,8} takie jak krążki do badania wrażliwości **BD Sensi-Disc™**.
7. Aplikator krążków, taki jak automatyczny 6, 8 lub 12-pozycyjny aplikator **BD Sensi-Disc**. Do płytek Mueller Hinton II Agar Square także dostępny jest odpowiedni zasobnik.
8. Linijka lub inne urządzenie do pomiaru średnicy stref w milimetrach.
9. Pomocnicze pożywki hodowlane, odczynniki oraz wyposażenie laboratoryjne zgodne z wymaganiami.

Typy próbek

Opisywany produkt jest używany do badań wrażliwości czystych hodowli, które izolowano z próbek klinicznych (zobacz także **CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW I OGRANICZENIA DOTYCZĄCE PROCEDURY**). Wysuwane są propozycje wykonywania badań wrażliwości na antybiotyki bezpośrednio na hodowlach wykonanych z próbek krwi lub moczu; jednak badania takie należy powtórzyć i potwierdzić na czystych hodowlach.²¹⁻²⁴

Procedura testowa

Metodologia ta opisuje metodę bezpośredniej zawiesiny kolonii zalecaną przez CLSI⁷ i EUCAST⁸:

1. Upewnić się, czy dostępna jest czysta, świeża (=jednodniowa) hodowla z nieselektywnego podłoża, takiego jak agar z krwią.
Według CLSI: Do rutynowych badań wrażliwości można przygotować inokulum, wykonując bezpośrednią zawiesinę kolonii w roztworze fizjologicznym lub pożywce płynnej.
Według EUCAST: Do rutynowych badań wrażliwości można przygotować inokulum, wykonując bezpośrednią zawiesinę kilku kolonii podobnych morfologicznie.
2. Należy niezwłocznie skorygować zmętnienie zawiesiny za pomocą wzorców z siarczanem (VI) baru (0,5 McFarland) bez inkubacji. 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. Dla celów rutynowych badań za dopuszczalne uznaje się stosowanie alternatywnych metod przygotowywania inokulum za pomocą urządzeń umożliwiających bezpośrednią standaryzację inokulum bez korygowania zmętnienia, takich jak **BD Prompt Inoculation System**.²⁵

4. Stosować inokulum optymalnie w ciągu 15 min. Zawiesina musi być zawsze stosowana w ciągu 60 min od przygotowania. Zanurzyć sterylny wacik w odpowiednio rozcieńczonym inokulum i kilkakrotnie go obrócić, mocno przyciskając do górnej wewnętrznej ścianki probówki, tak aby odsączyć nadmiar płynu i uniknąć nadmiernej inokulacji.
5. Wykonać posiew, trzykrotnie rozprowadzając materiał po całej powierzchni podłoża agarowego na płytce, obracając płytkę za każdym razem o 60°, aby uzyskać równomierny posiew.
6. Według CLSI: Płytkę z uchyloną pokrywką pozostawić w temperaturze pokojowej na 3-5 min., lecz nie dłużej niż 15 min., w celu zaabsorbowania wilgoci na powierzchni podłoża przed nałożeniem krążków nasasyconych antybiotykami. Nałożyć krążki nasasycone antybiotykami za pomocą odpowiedniego aplikatora, zachowując zasady aseptyki. Krążki należy rozmieścić w taki sposób, aby ich centralne części znajdowały się w odległości co najmniej 24 mm od siebie.
Według EUCAST: Stosując aseptyczne środki ostrożności, nanieść krążki wysuszonej płytki w ciągu 15 min od inokulacji. Rozmieścić maksymalnie sześć krążków na płytce.
7. Po umieszczeniu krążków na agarze należy je lekko docisnąć za pomocą sterylnej igły lub pincety, aby dokładnie przylegały one do powierzchni podłoża. Czynność ta nie jest konieczna, jeśli krążki są nakładane za pomocą automatycznego aplikatora **BD Sensi-Disc**.
8. W ciągu 15 minut od nałożenia krążków płytki należy odwrócić i umieścić w inkubatorze. Nie należy prowadzić inkubacji płytek w atmosferze o zwiększonym stężeniu dwutlenku węgla. Zalecane warunki inkubacji, patrz CLSI i EUCAST.^{7,8,10,11}

Odczytywanie wyników

1. Po inkubacji powinien być widoczny zlewny wzrost. Wystąpienie samych izolowanych kolonii oznacza, że inokulum było zbyt rozcieńczone. Należy wówczas powtórzyć test.
2. Według CLSI: Zmierzyć średnicę stref całkowitego zahamowania wzrostu (ocenianą nieuzbrojonym okiem), włączając średnicę krążka, w zaokrągleniu do pełnych milimetrów, za pomocą cyrkla, linijki lub specjalnego szablonu. Urządzenie wykorzystywane do pomiaru należy przystawić do dna odwróconej płytki umieszczonej na czarnym, nieodbijającym tle i oświetlonej z góry.⁷
Według EUCAST: Zmierzyć średnicę stref całkowitego zahamowania wzrostu (ocenianą nieuzbrojonym okiem), włączając średnicę krążka, w zaokrągleniu do pełnych milimetrów, za pomocą cyrkla lub linijki. Urządzenie wykorzystywane do pomiaru należy przystawić do dna odwróconej płytki umieszczonej na czarnym tle oświetlonej światłem odbitym. Płytkę jest trzymana około 30 cm od oka.⁸
3. Jako granicę należy przyjąć obszar nie wykazujący wyraźnie widocznych oznak wzrostu, które można dostrzec okiem nieuzbrojonym. Należy pominąć śladowy wzrost oraz małe kolonie, które można z trudem zauważyć w pobliżu granicy wyraźnej strefy zahamowania.
4. Według CLSI: Wyjątek stanowi badanie *Staphylococcus aureus* z krążkami nasasyconymi oksacyliną, a także badanie wrażliwości paciorkowców jelitowych na wankomycynę. W tych przypadkach należy użyć światła przechodzącego do wykrycia wokół krążka strefy wzrostu „skrycie opornych” szczepów MRSA lub paciorkowców jelitowych opornych na wankomycynę.^{7,26} W przypadku rodzaju *Proteus*, jeśli strefa zahamowania jest widoczna na tyle, że możliwe jest wykonanie jej pomiaru, należy pominąć jakikolwiek wzrost wewnątrz tej strefy. W przypadku trimetoprimu i sulfonamidów, antagoniści w podłożu mogą umożliwić śladowy wzrost; w związku z tym należy pominąć nieznaczny wzrost (do 20% wzrostu zlewego) i zmierzyć najbardziej wyraźną granicę w celu określenia średnicy strefy.
Według EUCAST: W przypadku stref podwójnych, jeżeli nie zaznaczono inaczej, należy mierzyć strefę wewnętrzną.⁸

Obliczanie i interpretacja wyników

Według CLSI:

Zmierzone wokół krążków średnice stref należy porównać z wartościami podanymi w tabelach 2A do 2D zamieszczonych w dokumencie M100 (M2) CLSI.¹⁰ Następnie można odesłać osobie zlecającej badanie wyniki uzyskane dla konkretnych organizmów: odporne, częściowo wrażliwe lub wrażliwe.

Według EUCAST:

Interpretować średnice stref odnosząc się do tabel punktów przerwania.¹¹ Wyniki uzyskane z określonymi organizmami mogą być następnie zgłaszane jako odporne lub wrażliwe. Dodatkowe informacje na temat swoistych charakterystyk wzrostu, interpretacji i innych dokumentów, patrz EUCAST.

CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA I OGRANICZENIA PROCEDURY

Podłoże Mueller Hinton Agar jest standardowym podłożem używanym do badań wrażliwości wykazujących szybki wzrost bakterii tlenowych lub względnie beztlenowych, takich jak gronkowce, paciorkowce jelitowe, bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz Gram-ujemne pałeczki tlenowe (np. *Pseudomonas* spp.). Dokumenty wytycznych do interpretacji wrażliwości są aktualizowane raz w roku i w celu prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników należy sprawdzić najnowszą wersję.^{10,11} Do badań gatunków o wysokich wymaganiach żywieniowych, tj. *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp. i *Streptococcus pneumoniae* oraz paciorkowców opracowano inne procedury, podłoża i warunki wykonywania badań.

Wzorcowej procedury CLSI i EUCAST nie stosuje się do badań drobnoustrojów bezwzględnie beztlenowych, bakterii, w przypadku których na podłożu Mueller Hinton Agar obserwuje się słaby lub powolny wzrost, a także mikroorganizmów, wśród których występują znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi szczepami pod względem szybkości wzrostu.^{7,8} Organizmy o wysokich wymaganiach żywieniowych (np. *Haemophilus influenzae*) powinny być badane zgodnie z zaleceniami CLSI i EUCAST.^{7,8}

Wewnętrzna ocena wydajnościowa

Wydajność podłoża **BD Mueller Hinton II Agar** (wszystkie formaty płytek) była walidowana wewnętrznie przy użyciu zalecanych szczepów kontroli jakości (KJ), w tym tych o scharakteryzowanych mechanizmach oporności (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Staphylococcus aureus* NCTC 12493, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 z amoksycyliną-kwasem klawulanowym AMC-3).^{19,20,34}

Tabela 2 podsumowuje zwalidowane środki przeciwdrobnoustrojowe dla szczepów KJ i szczepy o scharakteryzowanych mechanizmach oporności. Jeżeli nie zaznaczono inaczej, określone rozmiary stref zahamowania dla zwalidowanych środków przeciwdrobnoustrojowych były w określonych przez CLSI i EUCAST zakresach średnicy stref zahamowania.^{19,20}

Dodatkowe badania wydajności przy użyciu klinicznych izolatów MRSA z opornością typu *mecC* wskazywały, że podłoże **BD Mueller Hinton II Agar** umożliwia precyzyjne wykrywanie szczepów MRSA *mecC*-dodatnich.^{34,35}

Tabela 2: Przegląd walidowanego środka przeciwdrobnoustrojowego i szczepów kontroli jakości. Jeżeli nie zaznaczono inaczej, średnice stref zahamowania mieściły się w odpowiednich zakresach CLSI i (lub) EUCAST.^{19,20}

Środek przeciwdrobnoustrojowy	Zawartość krążka (µg)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 ^{10,18}	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ^{10,18}	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 ^{10,18}	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ¹⁸	<i>E. coli</i> ATCC 35218 ^{10,18}	<i>S. aureus</i> NCTC 12493 ¹⁸	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 ^{10,18}	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 ¹⁸
Amikacyna	AN-30	✓	✓		✓				
Amoksycylina-kwas klawulanowy	AMC-3				✓				
	AMC-30	✓				5			
Ampicylina	AM-2			3	✓				
	AM-10	✓							
Ampicylina-sulbaktam	SAM-20	✓				✓			
Aztreonam	ATM-30	✓	✓					✓	
Benzylopenicylina	P-1				✓				
Cefadroksyl	CFR-30	✓ ¹							
Cefaleksyna	CN-30	✓ ¹							
Cefepim	FEP-30	✓	✓						
Cefeksym	CFM-5	✓							
Cefotaksym	CTX-5	✓ ²						✓ ²	
Cefoksytyna	FOX-30	✓			✓		✓		
Cefpodoksym	CPD-10	✓						✓	
Ceftarolina	CPT-5	✓ ²			✓				
Ceftazydym	CAZ-10	✓ ²	✓ ²					✓ ²	
Ceftibuten	CFT-30	✓							
Ceftriakson	CRO-30	✓						✓	
Cefuroksym	CXM-30	✓							
Chloramfenikol	C-30	✓			✓				
Ciprofloksacyna	CIP-5	✓	✓	✓	✓				
Klindamycyna	CC-2				✓				
Doripenem	DOR-10	✓	✓						
Ertapenem	ETP-10	✓							
Erytromycyna	E-15				✓				
Kwas fusydowy	FA-10				✓				
Gentamycyna	GM-10	✓	✓		✓				
	GM-30			✓					✓
Imipenem	IPM-10	✓	✓	✓					
Lewofloksacyna	LVX-5	✓	✓	✓	✓				
Linezolid	LZD-10			✓	✓				
Mecylinam	MEC-10	✓							
Meropenem	MEM-10	✓	✓						
Minocyklina	MI-30				✓				
Moksyfloksacyna	MXF-5	✓			✓				
Mupirocyna	MUP-200				✓				
Kwas naldyksowy	NA-30	✓							

Tabela 2: Ciąg dalszy.

Środek przeciwdrobnoustrojowy	Zawartość krążka (µg)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 ^{10,18}	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ^{10,18}	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 ^{10,18}	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ¹⁸	<i>E. coli</i> ATCC 35218 ^{10,18}	<i>S. aureus</i> NCTC 12493 ¹⁸	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 ^{10,18}	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 ¹⁸
Netilmycyna	NET-10	✓ ²	✓ ²		✓				
Nitrofurantoina	FM-100	✓ ²		✓	✓				
Norfloksacyna	NOR-10	✓		✓	✓				
Ofloksacyna	OFX-5	✓			✓				
Pefloksacyna	PEF-5	✓							
Piperacylina	PIP-30	✓ ²							
Piperacylina-tazobaktam	PIP-30/TAZ-6	✓ ²	✓ ²			✓ ²			
Chinuprystyna-dalfoprystyna	SYN-15			✓	✓				
Rifampicyna	RA-5				✓				
Streptomycyna	S-300			6					
Teikoplanina	TEC-30			✓					✓
Tetracyklina	TE-30				✓				
Tikarcylina	TIC-75	✓							
Tikarcylina-kwas klawulanowy	TIM-85	✓	✓			✓			
Tigecyklina	TGC-15	✓		✓	✓				
Tobramycyna	NN-10	✓	✓		✓				
Trimetoprim	TMP-5	✓		✓	4				
Trimetoprym-sulfametoksazol	SXT1,25-23,75	✓		✓	✓				
Wankomycyna	VA-5			✓					✓

✓ Wszelkie strefy zahamowania są w zakresie EUCAST i CLSI.

¹ CLSI nie zaleca badania środka przeciwdrobnoustrojowego.

² CLSI i EUCAST zalecają różne stężenia środka przeciwdrobnoustrojowego. Przestrzegano zaleceń EUCAST.

³ Strefa zahamowania środka przeciwdrobnoustrojowego nie mieściła się z zakresie zalecanym przez EUCAST (Mueller Hinton II Agar, 150 mm i kwadrat).

⁴ Strefa zahamowania środka przeciwdrobnoustrojowego nie mieściła się z zakresie zalecanym przez EUCAST (Mueller Hinton II Agar, 90 mm).

⁵ Strefa zahamowania środka przeciwdrobnoustrojowego nie mieściła się z zakresie zalecanym przez EUCAST i CLSI (Mueller Hinton II Agar, 90 mm).

⁶ Strefa zahamowania środka przeciwdrobnoustrojowego nie mieściła się z zakresie zalecanym przez CLSI (Mueller Hinton II Agar, 90 i 150 mm), ale była w zakresie zalecanym przez EUCAST.

Ograniczenia procedury

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

W przypadku pewnych połączeń drobnoustroj-antybiotyków strefa zahamowania może nie mieć wyraźnej granicy, co może prowadzić do nieprawidłowych interpretacji.

Zidentyfikowano różne czynniki, które mają wpływ na wyniki dyfuzyjnego krążkowego badania wrażliwości. Należą do nich rodzaj podłoża, głębokość agaru, moc krążka, stężenie inokulum, czas od przygotowania inokulum oraz pH.³¹

Niewłaściwe stężenie inokulum może prowadzić do uzyskania nieprawidłowych wyników. Jeśli stężenie inokulum jest zbyt duże, strefy zahamowania mogą być zbyt małe, a jeśli stężenie inokulum jest zbyt małe, strefy mogą być za duże i trudne do zmierzenia. Dlatego zdecydowanie zaleca się przestrzeganie zaleceń CLSI i EUCAST dotyczących postępowania z inokulum oraz inokulowanymi płytkami w celu minimalizacji potencjalnego ryzyka uzyskania nieprawidłowych wyników z powodu nieprawidłowego postępowania. Niewłaściwe przechowywanie krążków z antybiotykami może spowodować utratę ich mocy i fałszywe wyniki wskazujące na występowanie wrażliwości. Nadmierne obkurczenie się opisywanego podłoża na skutek nieprawidłowego przechowywania może prowadzić do uzyskania fałszywych wyników wskazujących na występowanie wrażliwości.

Wrażliwość drobnoustroju *in vitro* na określony antybiotyk nie zawsze oznacza, że lek ten będzie skuteczny *in vivo*. Wskazówki dotyczące interpretacji wyników przedstawiono w odpowiednich publikacjach.^{10,11,32,33}

Czasem napotyka się bakterie wymagające tyminy lub tymidyny.^{27,28} W przypadku tych drobnoustrojów czasem nie obserwuje się wystarczającego wzrostu na podłożu Mueller Hinton Agar, które zawiera małe ilości tyminy lub tymidyny.

Opracowane zostały nowe procedury z zastosowaniem krążków o dużej zawartości gentamicyny (120 mg) i streptomycyny (300 mg), przeznaczonych do badania w kierunku dużego stopnia oporności na aminoglikozydy, która wskazuje na to, że wyizolowany szczep paciorkowców jelitowych nie jest wrażliwy na leczenie skojarzone z zastosowaniem penicyliny lub glikopeptydu plus aminoglikozydu.^{7,28,29}

Pełne omówienie metod wykrywania MRSA, opornych paciorkowców jelitowych, rozszerzonego spektrum, laseczek Gram-ujemnych wytwarzających β -laktamazę i innych ograniczeń badania przedstawiono w dokumentach M2 i M7 CLSI oraz EUCAST.^{7,8,10,11,30}

Podłoże Mueller Hinton II Agar okazało się przydatne do wykrywania MRSA tworzących strefy zahamowania wokół krążków nasyconych oksacyliną.²⁶ W razie wątpliwości należy użyć innej metody, takiej jak **BD Oxacillin Screen Agar**.

Metoda zaszczepiania, interpretacja, zalecenia oraz granice rozmiarów stref przedstawione w niniejszym dokumencie oraz normie zalecanej przez CLSI i EUCAST mogą różnić się od norm krajowych.^{7,8,31}

PIŚMIENNICTWO

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. Matuschek, E., D.F. Brown, and G. Kahlmeter. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20 (4): 255-66.
3. Ryan, K.J., F.D. Schoenknecht, and W.M.M. Kirby. 1970. Disc sensitivity testing. *Hospital Practice* 5:91-100.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. CLSI. Approved standard: M02-A12 - Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA. *Search for latest version at www.clsi.org.*
8. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Search for latest version at <http://www.eucast.org>.*
9. 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. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
10. CLSI - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. *Search for latest version at www.clsi.org.*

11. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *Search for latest version at <http://www.eucast.org>*.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. *Search for latest version at <http://www.eucast.org>*.
19. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>.
20. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
21. 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.
22. 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.
23. Waterworth, P.M., and M. Del Piano. 1976. Dependability of sensitivity tests in primary culture. *J. Clin. Pathol.* 29:179-184.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Maskell, R., O.A. Okubadejo, R.H. Payne, and L. Pead. 1977. Human infections with thymine-requiring bacteria. *J. Med. Microbiol.* 11:33-45.
28. 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.
29. Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:46-65.
30. CLSI. 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*.

31. 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. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
32. Washington, J.A., and G.L. Woods. 1995. Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. P. 1327-1341. *In* Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., and Tenover, R.H. (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995.
33. Neumann, M.A., D.F. Sahn, C. Thornsberry, J.E. McGowan, Jr. 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.1991.
34. Data on file. Becton Dickinson.
35. Skov, R., A.R. Larsen, A. Kearns, M. Holmes, C. Teale, G. Edwards, and R. Hill. Phenotypic detection of *mecC*-MRSA: cefoxitin is more reliable than oxacillin. 2014. J. Antimicrob. Chemother. 69:133-135.

OPAKOWANIE/DOSTĘPNOŚĆ

Podłoże **BD Mueller Hinton II Agar (płytki Stacker o śr. 90 mm; [Rozmiar standardowy])**

Nr kat. 254032 Gotowe podłoża na płytkach hodowlanych,
20 płytek

Nr kat. 254081 Gotowe podłoża na płytkach hodowlanych,
120 płytek

BD Mueller Hinton II Agar (150 mm)

Nr kat. 254062 Gotowe podłoża na płytkach hodowlanych,
20 płytek

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

Nr kat. 254518 Gotowe podłoża na płytkach hodowlanych,
20 płytek

DODATKOWE INFORMACJE

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



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8-12

69126 Heidelberg/Niemcy

Telefon: +49-62 21-30 50 Faks: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>

<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

Znaki handlowe należą do ich właścicieli.

© 2017 BD. BD, logo BD oraz wszystkie inne znaki handlowe stanowią własność firmy Becton, Dickinson and Company.