



Mueller Hinton II Agar

Medium for antimicrobial susceptibility testing
by the disc diffusion technique, according to CLSI and EUCAST.

DESCRIPTION

Mueller Hinton II Agar is a medium recommended for antimicrobial susceptibility testing of common, rapidly growing aerobic microorganisms by the disc diffusion technique (Kirby-Bauer method), as standardized by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

TYPICAL FORMULA

	(g/l)
Beef Extract	2.0
Acid Hydrolysate of Casein	17.5
Starch	1.5
Agar	17.0

Final pH 7.3 ± 0.2 at 25°C

METHOD PRINCIPLE

Acid hydrolysate of casein and beef extract supply amino acids, nitrogen, minerals, vitamins, carbon and other nutrients which support the growth of microorganisms. Starch acts as a protective colloid against toxic molecules which can be present in the medium. Hydrolysis of starch during autoclaving supplies a little amount of glucose, which is a source of energy. Agar is the solidifying agent.

The Kirby-Bauer method is based on the diffusion, through the agar, of the antimicrobial substance which soaks the paper disc. Each disc has a single concentration of the antimicrobial agent that inhibits the microorganism growth showing an halo around the disc. The diameter of the inhibiting halo is correlated with the Minimal Inhibitory Concentration (MIC).

Mueller Hinton II Agar is manufactured to contain low levels of thymine and thymidine and controlled levels of calcium and magnesium ions.

PREPARATION

Dehydrated medium Suspend 38 g of the powder in 1 liter of distilled or deionized water. Mix well. Heat until completely dissolved. Sterilize in autoclave at 121°C for 15 minutes. Cool to 45-50°C. Aseptically dispense in Petri dishes.

Medium in tubes/bottles Melt the content of the tube/bottle in a water bath at 100°C (loosing the cap partially removed) until completely dissolved. Then screw the cap and check the homogeneity of the dissolved medium, if it is the case turning the tube/bottle upside down. Cool at 45-50°C, mix well avoiding foam formation and aseptically distribute into Petri dishes.

TEST PROCEDURE

1. Prepare a standardized suspension of the test organism using either the direct colony suspension or growth method.
2. Dip a sterile cotton swab into the adjusted suspension.
3. Inoculate the surface of the plate by streaking the swab over the entire agar surface.
4. Apply the antimicrobial discs onto the surface of the inoculated agar plate.
5. Incubate aerobically at 35 ± 2°C for 16-18 hours.

INTERPRETING RESULTS

After incubation measure the diameter of the zone of complete inhibition including the diameter of the disc. Interpret zone sizes by referring to the current CLSI or EUCAST procedures and standards. Report the organism as susceptible, intermediate or resistant to the agents that have been tested.

APPEARANCE

Dehydrated medium: fine, dry, homogeneous, free of extraneous material, beige.

Prepared medium: slightly opalescent, amber.

STORAGE

The powder is very hygroscopic, store the powder at 10-30°C, in a dry environment, in its original container tightly closed. Store tubes, bottles and prepared plates at 10-25°C away from light. Do not use the product beyond its expiry date on the label or if product shows any evidence of contamination or any sign of deterioration.

SHELF LIFE

Dehydrated medium: 4 years.

Medium in tube/bottle: 2 years.

Ready-to-use plates: 6 months.

QUALITY CONTROL

The plates are controlled by performing antimicrobial susceptibility tests as defined by CLSI and EUCAST with the microbial strains indicated in the QC table.

Thymine and thymidine levels of raw materials are determined using the disc diffusion procedure with trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) discs and *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212. Calcium and magnesium levels are controlled by testing raw materials and supplementing with sources of calcium and/or magnesium as required to produce correct zone diameters with aminoglycoside antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

QC Table.

Microorganism		Specification
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923	Zone sizes within current CLSI and EUCAST acceptable QC ranges
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 29213	Zone sizes within current EUCAST acceptable QC ranges
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	Zone sizes within current CLSI and EUCAST acceptable QC ranges
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 27853	Zone sizes within current CLSI and EUCAST acceptable QC ranges
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 29212	Zone sizes within current CLSI and EUCAST acceptable QC ranges

WARNING AND PRECAUTIONS

The product does not contain hazardous substances in concentrations exceeding the limits set by current legislation and therefore is not classified as dangerous. It is nevertheless recommended to consult the safety data sheet for its correct use. The product is intended for *In vitro* diagnostic use and must be used only by properly trained operators.

DISPOSAL OF WASTE









Disposal of waste must be carried out according to national and local regulations in force.

BIBLIOGRAPHY

1. CLSI M02-A12 (2015) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Twelfth Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
2. EUCAST (2015). Antimicrobial susceptibility testing - Disk diffusion method. Version 5.0.
3. CLSI M31-A3 (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - Third Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
4. CLSI M6-A2 (2006) Protocols for Evaluating Dehydrated Mueller-Hinton Agar; Approved Standard - Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
5. D'Amato and Thornsberry (1979) Current Microbiol. 2:135.
6. Pollock, Minshew, Kenny and Schoenknecht (1978) Antimicrob. Agents Chemother. 14:360.
7. Thornsberry, Gavan and Gerlach (1977) Cumitech 6, New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Coord. ed., Sherris. American Society for Microbiology, Washington, DC.
8. Ferone, Bushby, Burchall, Moore and Smith (1975) Antimicrob. Agents Chemother. 7:91.
9. Reller, Schoenknecht, Kenny and Sherris (1974) J. Infect. Dis. 130:454.
10. Koch and Burchall (1971) Appl. Microbiol. 22:812.
11. Barry, Garcia and Thrupp (1970) Am. J. Clin. Pathol. 53:149.
12. Ryan, Schoenknecht and Kirby (1970) Hospital Practice 5:91.
13. Bauer, Kirby, Sherris and Turck (1966) Am. J. Clin. Pathol. 45:493.

PRESENTATION		Contents	Ref.
Mueller Hinton II Agar	90 mm ready-to-use plates	20 plates	10031
Mueller Hinton II Agar	90 mm ready-to-use plates	100 plates	10031*
Mueller Hinton II Agar	140 mm ready-to-use plates	10 plates	10231
Mueller Hinton II Agar	120 mm square ready-to-use plates	5 plates	12031
Mueller Hinton II Agar	Tubes	10 x 22 ml tubes	34075
Mueller Hinton II Agar	Bottles	6 x 100 ml bottles	402250
Mueller Hinton II Agar	Bottles	6 x 200 ml bottles	412250
Mueller Hinton II Agar	Bottles	6 x 500 ml bottles	470070
Mueller Hinton II Agar	Dehydrated medium	500 g of powder	610627
Mueller Hinton II Agar	Dehydrated medium	100 g of powder	620627
Mueller Hinton II Agar	Dehydrated medium	5 kg of powder	6106275

TABLE OF SYMBOLS

LOT Batch code	IVD <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device	 Manufacturer	 Use by	 Fragile, handle with care	 Keep away from sunlight
REF Catalogue number	 Temperature limitation	 Contains sufficient for <n> tests	 Caution, consult Instruction For Use	 Do not reuse	



LIOFILCHEM® s.r.l.

Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330 www.liofilchem.net liofilchem@liofilchem.net





Mueller Hinton II Agar

Terreno per il test di sensibilità agli antimicrobici mediante la tecnica di diffusione in agar secondo CLSI ed EUCAST.

DESCRIZIONE

Mueller Hinton II Agar è un terreno raccomandato per il test di sensibilità agli antimicrobici dei comuni microorganismi aerobi a crescita rapida, mediante la tecnica di diffusione su dischetto (metodo Kirby-Bauer), come standardizzato dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e dal European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

FORMULA TIPICA

	(g/l)
Estratto di Carne Bovina	2.0
Idrolizzato Acido di Caseina	17.5
Amido	1.5
Agar	17.0
pH Finale 7.3 ± 0.2 a 25°C	

PRINCIPIO DEL METODO

L'idrolizzato acido di caseina e l'estratto di carne bovina forniscono aminoacidi, azoto, carbonio, vitamine e minerali per la crescita degli organismi. L'amido agisce come un agente colloidale protettivo nei confronti di molecole tossiche eventualmente presenti nel terreno. L'idrolisi dell'amido durante la sterilizzazione in autoclave fornisce una piccola quantità di glucosio che è una fonte di energia. L'agar è l'agente solidificante.

Il metodo di Kirby-Bauer si basa sulla diffusione, attraverso l'agar, delle sostanze antimicrobiche di cui sono imbevuti dei dischetti di carta. Ciascun disco ha una definita concentrazione dell'agente antimicrobico che nell'inibire la crescita del microorganismo forma un alone attorno al disco stesso. Il diametro dell'alone di inibizione è correlato con la Concentrazione Minima Inibente (MIC).

Mueller Hinton II Agar contiene una bassa concentrazione di timina e timidina ed un livello controllato di ioni calcio e magnesio.

PREPARAZIONE

<u>Terreno disidratato</u>	Sospendere 38 g di polvere in 1 litro di acqua distillata o deionizzata sterile. Mescolare bene. Riscaldare agitando di frequente e bollire fino a completa dissoluzione. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.
<u>Terreno in provette/flaconi</u>	Sciogliere il contenuto di una provetta/flacone in bagnomaria a 100°C (con i tappi leggermente svitati) fino a completa dissoluzione del terreno. Verificare, una volta fuso, la buona omogeneità del terreno capovolgendo la provetta/flacone dopo averne avvitato il tappo. Raffreddare a 45-50°C, mescolare bene senza formazione di bolle. Versare in piastre Petri in condizioni di asepsi.

PROCEDURA DEL TEST

1. Preparare una sospensione standardizzata del microorganismo da testare utilizzando il metodo diretto di sospensione della colonia o il metodo di crescita batterica.
2. Immergere un tampone sterile nella sospensione con torbidità corretta.
3. Inoculare il terreno strisciando il tampone sull'intera superficie dell'agar.
4. Applicare i dischi antimicrobici sulla piastra inoculata
5. Incubare a 35 ± 2°C per 16-18 ore in atmosfera aerobica.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione misurare il diametro delle zone di completa inibizione, includendo il diametro del disco. Interpretare la dimensione degli aloni facendo riferimento alle norme ed alle procedure aggiornate CLSI o EUCAST. Riportare il microorganismo come sensibile, intermedio o resistente agli agenti testati.

ASPETTO

Terreno disidratato: omogeneo, fine granulometria, beige.
Terreno preparato: ambrato, leggermente opalescente.

CONSERVAZIONE

La polvere è fortemente igroscopica, conservare a 10-30°C, in ambiente asciutto, nel suo contenitore originale chiuso ermeticamente. Conservare i flaconi, le provette e le piastre pronte a 10-25°C al riparo dalla luce. Non usare il prodotto dopo la sua data di scadenza indicata sull'etichetta o se il prodotto mostra segni di contaminazione o deterioramento.

DURATA

Terreno disidratato: 4 anni.
Terreno in provette/flaconi: 2 anni.
Piastre pronte all'uso: 6 mesi.

CONTROLLO DI QUALITÀ

le piastre vengono controllate eseguendo i test di sensibilità agli antimicrobici come definito da CLSI ed EUCAST con i ceppi microbici indicati nella tabella CQ.

I livelli di timina e timidina nei materiali non trattati sono misurati con la tecnica di diffusione su dischetto imbevuto di trimethoprim-sulfametossazolo saggiato su *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212. Le concentrazioni di calcio e magnesio sono controllate analizzando i materiali non trattati e, all'occorrenza aggiungendo fonti di calcio e/o magnesio per regolare il diametro delle zone con aminoglicosidi e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

Tabella CQ.

Microrganismo	Specifiche
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Diametri di inibizione all'interno dei range CQ accettati da CLSI ed EUCAST
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	Diametri di inibizione all'interno dei range CQ accettati da EUCAST
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Diametri di inibizione all'interno dei range CQ accettati da CLSI ed EUCAST
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	Diametri di inibizione all'interno dei range CQ accettati da CLSI ed EUCAST
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	Diametri di inibizione all'interno dei range CQ accettati da CLSI ed EUCAST

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Il prodotto non contiene sostanza nocive in concentrazioni superiori ai limiti fissati dall'attuale legislazione e perciò non è classificato come pericoloso. Ciononostante si raccomanda di consultare la scheda di sicurezza per il suo corretto uso. Il prodotto è da intendersi per uso diagnostico in vitro e deve essere utilizzato esclusivamente da operatori adeguatamente addestrati.

SMALTIMENTO DEI RIFIUTI









Lo smaltimento dei rifiuti deve essere effettuato in conformità alle normative nazionali e locali in vigore.

BIBLIOGRAFIA

1. CLSI M02-A12 (2015) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Twelfth Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
2. EUCAST (2015). Antimicrobial susceptibility testing - Disk diffusion method. Version 5.0.
3. CLSI M31-A3 (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - Third Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
4. CLSI M6-A2 (2006) Protocols for Evaluating Dehydrated Mueller-Hinton Agar; Approved Standard - Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
5. D'Amato and Thornsberry (1979) Current Microbiol. 2:135.
6. Pollock, Minshew, Kenny and Schoenknecht (1978) Antimicrob. Agents Chemother. 14:360.
7. Thornsberry, Gavan and Gerlach (1977) Cumitech 6, New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Coord. ed., Sherris. American Society for Microbiology, Washington, DC.
8. Ferone, Bushby, Burchall, Moore and Smith (1975) Antimicrob. Agents Chemother. 7:91.
9. Reller, Schoenknecht, Kenny and Sherris (1974) J. Infect. Dis. 130:454.
10. Koch and Burchall (1971) Appl. Microbiol. 22:812.
11. Barry, Garcia and Thrupp (1970) Am. J. Clin. Pathol. 53:149.
12. Ryan, Schoenknecht and Kirby (1970) Hospital Practice 5:91.
13. Bauer, Kirby, Sherris and Turck (1966) Am. J. Clin. Pathol. 45:493.

PRESENTAZIONE	Contenuto	Ref.
Mueller Hinton II Agar Piastre (90 mm) pronte all'uso	20 piastre	10031
Mueller Hinton II Agar Piastre (90 mm) pronte all'uso	100 piastre	10031*
Mueller Hinton II Agar Piastre (140 mm) pronte all'uso	10 piastre	10231
Mueller Hinton II Agar Piastre quadrate (120 mm) pronte all'uso	5 piastre	12031
Mueller Hinton II Agar Provette	Provette 10 x 22 ml	34075
Mueller Hinton II Agar Flaconi	Flaconi 6 x 100 ml	402250
Mueller Hinton II Agar Flaconi	Flaconi 6 x 200 ml	412250
Mueller Hinton II Agar Flaconi	Flaconi 6 x 500 ml	470070
Mueller Hinton II Agar Terreno disidratato	500 g di polvere	610627
Mueller Hinton II Agar Terreno disidratato	100 g di polvere	620627
Mueller Hinton II Agar Terreno disidratato	5 kg di polvere	6106275

TABELLA DEI SIMBOLI

LOT Codice del lotto	IVD Dispositivo Medico Diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro	 Fragile, maneggiare con cura	 Tenere al riparo dalla luce
REF Numero di catalogo	 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Attenzione, Consultare le istruzioni per l'uso	 Non riutilizzare	



LIOFILCHEM® s.r.l.

Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330 www.liofilchem.net liofilchem@liofilchem.net