

MUELLER-HINTON

REF 56137 - 63824 - 63901 - 64884 - 64888

MUELLER-HINTON + BLOOD

REF 63825 - 63902

MUELLER-HINTON + HORSE BLOOD + β -NAD

REF 63524 - 63525

MEDIU DE IZOLARE PENTRU TESTAREA SUSCEPTIBILITĂȚII ANTIMICROBIENE

2016/12

1- SCOPUL UTILIZĂRII

Agarul Mueller-Hinton este un mediu standardizat solid recomandat pentru testarea susceptibilității antimicrobiene prin difuzie de agar sau prin diluție de agar.

2- PRINCIPIU

Compoziția mediului Mueller-Hinton trebuie să fie standardizată pentru a obține rezultate fiabile cu privire la susceptibilitatea microbiană, cu concentrații definite de CaCl_2 , MgCl_2 și ZnCl_2 , întrucât se știe că variațiile de concentrație ale cationilor de Mg^{2+} și Ca^{2+} afectează rezultatele obținute (diametrul sau concentrația minimă de inhibare sau MIC) pentru *Pseudomonas aeruginosa* cu aminoglicozide și pentru *Staphylococci* cu tetraciclină^(3, 4, 5, 6).

Concentrația scăzută de timidina scade, de asemenea, fenomenele de regenerare din jurul discurilor de trimetoprim-sulfonamide și trimetoprim.

3- MOD DE PREZENTARE

- Mediu gata de utilizare:
 - cutie de 20 de vase Petri rotunde (90 mm) (MH) cod 63824
 - cutie de 20 de vase Petri pătrate (120 mm) (MH) cod 63901
- Mediu gata de utilizare (to be dispensed):
 - flacoane de 6 x 200 ml (MH) cod 56137
- Mediu dehidratat:
 - flacon de 500 g cod 64884
 - bidon de 5 kg cod 64888
- Mediu sânge de oaie gata de utilizare:
 - cutie de 20 de vase Petri rotunde (90 mm) (MHB) cod 63825
 - cutie de 20 de vase Petri pătrate (120 mm) (MHB) cod 63902
- Mediu sânge de cal gata de utilizare suplimentat cu β -NAD:
 - cutie de 20 de vase Petri rotunde (90 mm) (MHF) cod 63524
 - cutie de 20 de vase Petri pătrate (120 mm) (MHF) cod 63525

4- COMPOZIȚIE TEORETICĂ (g/l de apă distilată)*

Mueller-Hinton, cu sau fără adăugire de sânge de oaie sau de cal, este preparat conform formulei descrise de W.H.O. ^(1, 2)

Peptone	3,0
Hidrolizat de cazeină	17,5
Agar	15
Ca^{2+}	20-25 mg/L
Mg^{2+}	10-12,5 mg/L
Ph final	7,4 $\pm$ 0,2
Suplimente: + 5% sânge de oaie (pentru mediul MHB) sau 5% sânge de cal (pentru mediul MHF)	
β -NAD (pentru mediul MHF)	20 mg/L

β -NAD: β -Nicotinamid Adenin Dinucleotid

* formulă adaptată pentru a asigura cele mai bune performanțe ale mediului.

Prepararea mediului:

Omogenizați pudra din flacon.

Adăugați **35 grame** de mediu dehidratat la 1 litru de apă proaspăt distilată. Încălziți până la fierbere și până la dizolvarea completă. Sterilizați în autoclavă la 121°C timp de 15 de minute apoi distribuiți în eprubete sterile sau în flacoane

La momentul utilizării, topiți mediul în baia de apă fadusă la fierbere și distribuiți întregul conținut al flaconului sau al eprubetei în vase Petri rotunde. Stratul de agar trebuie să fie gros de 4 mm. Uscați vasele Petri timp de 30 de minute la 37°C. Volumul mediului Mueller-Hinton necesar pentru a produce un strat de agar de exact 4 mm grosime este de 25 ml pentru un vas Petri de 90 mm, 60 ml pentru un vas Petri pătrat de 120 mm, 70 ml pentru un vas Petri rotund de 150 mm.



Înainte de distribuire, mediul poate fi suplimentat cu:

- 5% sânge de oaie sau de cal pentru Mueller-Hinton + mediu sânge,
- 5% clorură de sodiu (NaCl) pentru Mueller-Hinton + 5% mediu NaCl.

Mediu gata de utilizare

5- DEPOZITARE

- Mediu gata de utilizare: la +2-20°C
- Mediu gata de utilizare (pentru distribuire): la +2-25°C
- Mediu sânge gata de utilizare: la +2-8°C
- Mediu dehidratat: flacon bine închis, într-un loc uscat la +15-25°C.

Data de expirare și numărul de lot sunt indicate pe ambalaj.

6- INSTRUCȚIUNI

Materiale:

Material furnizat: mediu Mueller-Hinton cu sau fără adăugire de sânge de oaie sau de cal.

Materiale specifice nefurnizate:

- Standard opacitate echivalent cu standardul Mac Farland 0.5.
- Echipamentul de laborator necesar pentru testarea susceptibilității antimicrobiene prin metoda difuziei de agar.

Precauțiuni de utilizare: Respectați instrucțiunile orientărilor curente (CLSI ^{7,8}, CA-SFM ⁹, EUCAST ^{10,11,12}). Respectați întotdeauna tehnicile și precauțiunile curente cu privire la protecția împotriva pericolelor microbiologice.

Inoculare:

Dintr-o cultură pură, proaspătă, crescută pe mediu agar, preparați o suspensie cu opacitate echivalentă cu standardul Mac Farland 0.5. Protocolul de standardizare a inoculului este descris în diversele orientări publicate de CLSI, CA-SFM sau EUCAST pentru metoda difuziei de agar și pentru metoda diluției de agar.

Dacă mediu este depozitat la 4°C, permiteți mediului să ajungă la temperatura camerei (18-30°C).

Dacă este observată o umiditate excesivă pe suprafață, uscați vasele timp de 10 până la 30 minute în incubator la 35°C înainte de utilizare.

METODĂ DE DIFUZIE

Inoculare prin inundație (metodă recomandată de CA-SFM):

Din inoculul standardizat, urmăriți procedura indicată de CA-SFM cu privire la diluția suspensiei inițiale în funcție de speciile de bacterii testate.

Inundați întreaga placă cu suspensia obținută, apoi eliminați excesul de suspensie.

Inoculare prin striere (metoda Kirby-Bauer recomandată de CLSI, CA-SFM și EUCAST):

Din inoculul standardizat, urmăriți orientările CLSI, CA-SFM, EUCAST cu privire la inocularea vasului:

- Cufundați în suspensie un băț cu un tampon steril, netoxic.
- Îndepărtați surplusul de suspensie atingând ușor tamponul de pereții eprubetei printr-o mișcare de rotație.
- Inoculați placa cu tamponul pentru a obține o cultură de colonii confluențe.

Aplicați discurile cu ajutorul unui dispenser sau forceps, apăsând ușor.

METODĂ DILUȚIE AGAR

Procedurile de inoculare și testare sunt descrise în orientările CLSI and CA-SFM.

Incubare:

Respectați orientările curente ale CLSI, CA-SFM și EUCAST.

Condițiile de incubare variază în funcție de speciile de bacterii testate.

7- INTERPRETAREA REZULTATELOR

Interpretarea testului de susceptibilitate microbiană utilizând metoda difuziei discurilor sau metoda diluției de agar este descrisă în actualizările orientărilor CA-SFM, CLSI și EUCAST.

8- PERFORMANȚĂ/CONTROL DE CALITATE A TESTULUI

- Aspectul mediului Mueller-Hinton gata de utilizare: agar limpede până la opalescență, **culoarea chihlimbarului**.
- Aspectul mediului Mueller-Hinton dehidratat: pudră **bej**.
- Aspectul mediului Mueller-Hinton gata de utilizare + mediu sânge: agar **roșu**.

Performanțele de creștere ale mediului Mueller Hinton cu sau fără adăugire de sânge de oaie sau de cal sunt verificate cu următoarele tulpini:

TULPINI	REZULTAT CULTURĂ DUPĂ 24 ore la 37°C
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Creștere satisfăcătoare
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Creștere satisfăcătoare
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Creștere satisfăcătoare
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Creștere satisfăcătoare
<i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8468	Creștere satisfăcătoare
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560	Creștere satisfăcătoare

Compoziția mediului MH este verificată cu următoarele tulpini sau discuri (listă non-exhaustivă):

TULPINI	TESTARE SUSCEPTIBILITATE ANTIMICROBIANĂ
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 - Amikacin 30 µg - Cephalothin 30 µg - Tetracycline 30 µg	Corespunzător specificațiilor curente cu privire la diametrul de inhibare conform (CLSI și/sau CA-SFM și/sau EUCAST) ^(8, 9, 12) .
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 - Amikacin 30 µg - Cephalothin 30 µg - Tetracycline 30 µg	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 - Amikacin 30 µg - Cefotaxime 30 µg - Ciprofloxacin 5 µg	

Compoziția mediului MHB este verificată cu următoarele tulpini sau discuri (listă non-exhaustivă):

TULPINI	TESTARE SUSCEPTIBILITATE ANTIMICROBIANĂ
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619 - Erythromycin 15 µg - Penicillin 10 UI - Tetracycline 30 µg	Corespunzător specificațiilor curente cu privire la diametrul de inhibare conform CLSI ⁽⁸⁾ .
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 - Amikacin 30 µg - Cefotaxime 30 µg - Ciprofloxacin 5 µg	

Compoziția mediului MHF medium este verificată cu următoarele tulpini sau discuri (listă non-exhaustivă):

TULPINI	TESTARE SUSCEPTIBILITATE ANTIMICROBIANĂ
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619 - Erythromycin 15 µg - Norfloxacin 10 µg - Rifampin 5 µg - Tetracycline 30 µg	Corespunzător specificațiilor curente cu privire la diametrul de inhibare conform EUCAST ⁽¹²⁾ .
<i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8468 - Penicillin 1 µg - Cefaclor 30 µg - Tetracycline 30 µg	
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 - Erythromycin 15 µg - Ciprofloxacin 5 µg - Tetracycline 30 µg	

9- CONTROL CALITATE PRODUCĂTOR

Toți reactivii fabricați sunt preparați în conformitate cu Sistemul nostru de calitate, de la recepția materiei prime până la comercializarea finală a produsului. Fiecare lot este supus unor evaluări de control al calității și este eliberat pe piață numai după ce sunt îndeplinite criteriile de acceptare predefinite. Documentele cu privire la producerea și controlul fiecărui lot în parte sunt păstrate de Bio-Rad.

10- LIMITE DE UTILIZARE

Vor fi utilizate întotdeauna culturi pure, proaspete pentru a fi obținute rezultate interpretabile.

Este posibil ca unele tulpini să nu crească în acest mediu ca urmare a nevoilor nutriționale ale acestora. Un mediu adecvat va trebui folosit în acest caz: HTM pentru *Haemophilus*, Mueller-Hinton plus 5% sânge de oaie *Streptococcus pneumoniae* și β streptococi hemolitici, agar GC pentru *Neisseria gonorrhoeae*.

Există câțiva factori ce ar putea afecta rezultatele (dimensiunea inoculului, durata și atmosfera de incubare, etc.). În consecință, este esențială respectarea protocolului descris în orientările curente (CLSI, CA-SFM.).

Mediul Mueller-Hinton sânge proaspăt nu este recomandat pentru testarea susceptibilității *S. pneumoniae* la cotrimoxazol ⁽⁷⁾.

11- REFERINȚE

- 1- World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. 1981. Technical report series 673 (Révision 1981). W.H.O., Geneva – p156-192.
- 2- World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. 1992. Technical report series 822. W.H.O., Geneva.
- 3- Casillas, E., Kenny, M.A., Minshew B.H., Schoenknecht, F. 1981. Effect of ionized calcium and soluble magnesium on the predictability of the performance of Mueller-Hinton agar susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* with Gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19:987-992.
- 4- Murray, P.R., Tenover J. C. 1983. Evaluation of Mueller-Hinton agar for disk diffusion susceptibility tests. *J. Clin. Microbiol.* 18: 1269-1271
- 5- D'Amato, R.F., Thornsberry C., Baker C.N., Kirven, L.A. 1976. Effect of calcium and magnesium ions on the susceptibility of *Pseudomonas* species to Tetracycline, Gentamicin Polymyxin B, and Carbenicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 596-600.
- 6- D'Amato, R.F., Thornsberry C. 1979. Calcium and Magnesium in Mueller-Hinton agar and their influence on disk diffusion susceptibility results. *Current Microbiol.* 2:135-138
- 7- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Approved standard M2-A11. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests, 11st ed. CLSI, Wayne, Pa.
- 8- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. CLSI document M100-S23. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 23rd informational supplement, Wayne, Pa.
- 9- Comité de l'antibiogramme. 2013. French Society of Microbiology.
- 10- European Committee on Antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). 2013. Media preparation for disc diffusion testing V3.0.
- 11- European Committee on Antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). 2013. EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method summary – V3.0.
- 12- European Committee on Antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). 2013. EUCAST QC Tables V3.1.



Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France
Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax: +33 (0) 1 47 41 91 33
www.bio-rad.com



2016/12

