

Mueller-Hinton agar

Σ 20

REF 63824

Σ 100

REF 63829

Σ 10

REF 63901

Σ 500 g

REF 64884

Σ 5 Kg

REF 64888

Mueller-Hinton agar + Sheep Blood

Σ 20

REF 63825

Σ 10

REF 63902

Mueller-Hinton-F agar

Σ 20

REF 63524

Σ 10

REF 63525

Medii de izolare pentru testarea susceptibilității antimicrobiene



0001076 - 2021/01

Instrucțiuni de utilizare conforme cu Reglementarea (UE) 2017/746.

Modificările aduse versiunii anterioare sunt evidențiate cu gri.



Cuprins

1.	DESTINAȚIA DE UTILIZARE	3
2.	PRINCIPIILE TESTULUI	3
3.	REACTIVI.....	3
4.	AVERTISMENT ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE.....	4
5.	PROCEDURĂ.....	4
6.	PERFORMANȚA/CONTROLUL CALITĂȚII TESTULUI	5
7.	CONTROLUL CALITĂȚII PRODUCĂTORULUI.....	6
8.	LIMITĂRILE TESTULUI.....	6
9.	REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	7

1. DESTINAȚIA DE UTILIZARE

Mueller-Hinton agar este un mediu neselectiv utilizat pentru testarea susceptibilității antimicrobiene, standardizat prin metodele Institutului pentru Standarde Clinice și de Laborator (CLSI) și ale Comitetului European pentru Testarea Susceptibilității Antimicrobiene (EUCAST) [1-3]. Mueller-Hinton agar este recomandat pentru determinarea susceptibilității antimicrobiene a bacteriilor aerobe care se dezvoltă rapid, iar compozițiile suplimentate sunt recomandate pentru bacteriile fastidioase.

2. PRINCIPIILE TESTULUI

Compoziția Mueller-Hinton agar este standardizată cu timidină și concentrații ale cationilor de calciu, magneziu, mangan și zinc pentru a obține rezultate fiabile ale testelor de susceptibilitate antimicrobiană [4]. Se cunoaște faptul că respectivii cationi de magneziu și calciu afectează rezultatele obținute (diametre și concentrații minime inhibitorii sau MIC) pentru *Pseudomonas aeruginosa* cu aminoglicozide și pentru *Staphylococcus* spp. cu tetraciclină [5-8]. Excesul de mangan și zinc duce la rezultate interpretate ca fiind fals-rezistente cu glicilciclina și carbapeneme. În cele din urmă, concentrația scăzută de timidină reduce fenomenele de reluare a creșterii în jurul discurilor de trimetoprim-sulfametoxazol și trimetoprim.

Testarea bacteriilor fastidioase necesită adăugarea unor suplimente pentru creștere:

- 5 % sânge de oaie: Mueller-Hinton agar + Sheep Blood (MHB) este utilizat de CLSI pentru testarea susceptibilității antimicrobiene a *Streptococcus* spp. (inclusiv *S. pneumoniae*), *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli*, *Neisseria meningitidis* și *Pasteurella* spp. [1].
- 5 % sânge de cal defibrinat mecanic și 20 mg/l β-NAD: Mueller-Hinton-F agar (MHF) este utilizat de EUCAST și CA-SFM/EUCAST pentru testarea susceptibilității antimicrobiene a *Streptococcus* spp. (inclusiv *S. pneumoniae*), *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus* spp. și *Kingella* spp. [3, 9].

Mediile Mueller-Hinton agar din plăci trebuie să aibă o grosime de 4 +/- 0,5 mm în conformitate cu ISO 16782 [4] și cu criteriile de control al calității publicate în orientările actuale [1-3].

3. REACTIVI

3.1. Descriere

Identificare pe etichetă	Informații imprimare pe fiecare placă	Nr. catalog	Prezentare
Mueller-Hinton agar	MH	63824	20 plăci x 90 mm
	MH	63829	100 plăci x 90 mm
	MH	63901	10 cutii Petri pătrate x 120 mm
	-	64884	Flacon de 500 g
	-	64888	Bidon de 5 kg
Mueller-Hinton agar + Sheep Blood	MHB	63825	20 plăci x 90 mm
	MHB	63902	10 cutii Petri pătrate x 120 mm
Mueller-Hinton-F agar	MHF	63524	20 plăci x 90 mm
	MHF	63525	10 cutii Petri pătrate x 120 mm

Compoziție aproximativă a mediului* (g/l)

Mueller-Hinton agar, cu sau fără adăugarea sângelui de oaie sau de cal, este preparat conform formulei descrise de OMS. [10]:

Peptone	3,0
Hidrolizat de cazeină	17,5
Agent gelifiant	15
Ca ²⁺	20-25 mg/l
Mg ²⁺	10-12,5 mg/l
pH final	7,4 ± 0,2
Suplimente:	
pentru mediul MHB: sânge de oaie	5 %
pentru mediul MHF: sânge de cal	5 %
doar pentru mediul MHF: β-NAD	20 mg/l

β-NAD: β-nicotinamidă adenină dinucleotidă

* Formulă optimizată pentru performanță optimă.

3.2. Cerințe de depozitare și manipulare

Plăcile și mediile deshidratate pot fi utilizate până la data de expirare menționată pe ambalaj și imprimată pe plăci.

Prezentare	Conservare
Plăci de agar	Între +2 și 20 °C, preferabil în ambalajul original. După deschiderea pungii, stabilitatea a fost validată pe o perioadă de 4 săptămâni în condiții de rutină. Închideți ambalajul plăcilor după fiecare extragere a unei plăci.
Plăci de agar sânge	Între +2 și 8 °C, preferabil în ambalajul original. După deschiderea pungii, stabilitatea a fost validată pe o perioadă de 4 săptămâni în condiții de rutină. Închideți ambalajul plăcilor după fiecare extragere a unei plăci.
Mediu deshidratat	Între +15 și 25 °C într-un loc uscat, în ambalajul original până la utilizare. După deschidere, păstrați într-un loc uscat flaconul/bidonul sigilat cu atenție după fiecare utilizare. Stabilitatea a fost validată pe o perioadă de douăsprezece luni în condiții de rutină.

4. AVERTISMENT ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

- Pentru uz diagnostic *in vitro*.
- Dispozitiv destinat utilizării de către personal calificat, exclusiv într-un mediu de laborator.
- În atenția pacienților/utilizatorilor/terților din Uniunea Europeană și din țări cu un regim de reglementare identic (Regulamentul 2017/746/UE privind dispozitivele medicale pentru diagnostic *in vitro*): vă rugăm să raportați producătorului și autorității naționale competente orice incident grav survenit în timpul utilizării dispozitivului sau ca urmare a utilizării acestuia.

4.1. Precauții de sănătate și siguranță

- Acest kit de testare trebuie manipulat doar de către personal calificat, instruit în proceduri de laborator și familiarizat cu potențialele pericole ale acestora. Purtați îmbrăcăminte de protecție, mănuși și protecție pentru ochi/față corespunzătoare și manipulați în mod corect, conform bunelor practici de laborator.
- Deversări de produse biologice: deversările de materiale provenite din surse umane trebuie tratate ca fiind potențial infecțioase.
Deversările care nu conțin acid trebuie decontaminate imediat, incluzând zona deversării, materialele și orice suprafețe sau echipamente contaminate, cu un dezinfectant chimic adecvat care este eficient pentru potențialele pericole biologice (în mod normal, o soluție cu o diluție de 1:10 de înălbitor de uz casnic, 70-80 % etanol sau izopropanol, un iodoform, precum Wescodyne Plus 0,5 % etc.) și apoi șterse.
Deversările care conțin acid trebuie absorbite (șterse) sau neutralizate în mod corespunzător, zona trebuie spălată cu apă și ștearsă până când se usucă. Materialele utilizate pentru absorbirea produsului vărsat pot necesita eliminarea la deșeurile bio-periculoase. Zona trebuie decontaminată cu un dezinfectant chimic.
- Eliminați toate probele și materialele utilizate pentru efectuarea testului ca și cum ar conține un agent infecțios. Deșeurile de laborator, chimice sau bio-periculoase trebuie manipulate și eliminate în conformitate cu toate reglementările locale, regionale și naționale.
- Pentru recomandări privind pericolele și precauțiile asociate anumitor componente chimice din acest mediu, vă rugăm să consultați codurile H și P menționate pe etichete și informațiile furnizate la finalul instrucțiunilor de utilizare. Fișa cu date de securitate este disponibilă la www.bio-rad.com.

4.2. Precauții asociate procedurii

Respectați instrucțiunile din orientările actuale (CLSI, EUCAST, CA-SFM/EUCAST) [1-3].

4.2.1. Pregătire

- Nu utilizați plăcile dacă prezintă orice semne de contaminare, uscare, crăpare sau orice altă urmă de deteriorare.
- Nu utilizați plăci cu medii de cultură expirate sau un mediu deshidratat.
- Înainte de utilizare, așteptați 10 minute până când plăcile ajung la temperatura camerei (18-30 °C), într-un loc ferit de lumină, preferabil în ambalajul original.

4.2.2. Procesare

- Respectarea instrucțiunilor de utilizare este obligatorie pentru asigurarea funcționării corespunzătoare a acestui produs.
- Efectuați testul la temperatura camerei (18-30 °C).
- Respectați tehnicile aseptice în timpul utilizării plăcilor.
- Suprafața agarului trebuie să fie netedă și umedă. Dacă observați umezeală în exces pe suprafața agarului, uscați plăcile cu capacul deschis timp de 15 minute la 35 °C sau peste noapte la 20-25 °C [3].

5. PROCEDURĂ

5.1. Materiale necesare

5.1.1. Materiale furnizate

- Mueller-Hinton agar
- Agar Mueller-Hinton + Sheep Blood
- Mueller-Hinton-F agar

5.1.2. Materiale necesare, dar nefurnizate

- Standard de opacitate echivalent cu standardul Mac Farland 0,5
- Echipament de laborator necesar pentru testarea susceptibilității antimicrobiene prin metoda difuziei de agar
- Incubator
- Apă distilată sterilă
- Apă fiziologică sterilă
- Cutii Petri sterile: rotunde, de 90 mm sau 150 mm sau pătrate, de 120 mm
- Autoclavă
- Baie de apă
- Microorganisme de referință pentru controlul calității
- Recipient pentru deșeuri

5.1.3. Prepararea reactivilor

- Omogenizați pulberea înainte de utilizare. Adăugați 35 g într-un litru de apă distilată, amestecând continuu până la obținerea unei suspensii omogene (aproximativ 10 minute). Dați în clocot, amestecând frecvent, până la dizolvarea optimă a agarului. Distribuți în flacoane sterile. Sterilizați prin autoclavare la 121 °C timp de 15 minute.
- În momentul utilizării, topiți mediul într-o baie de apă clocotită și turnați în cutii Petri de 90 mm (aproximativ 25 ml/cutie) sau în cutii Petri pătrate de 120 mm (aproximativ 60 ml/cutie) sau în cutii Petri rotunde de 150 mm (aproximativ 70 ml/cutie). Stratul de agar trebuie să fie gros de 4 +/- 0,5 mm.
- Înainte de a fi turnat în cutii, mediul poate fi suplimentat cu:
 - 5 % sânge de oaie sau de cal pentru a pregăti mediile Mueller-Hinton + agar sânge,
 - 20 mg/l β-NAD pentru a pregăti mediul Mueller-Hinton-F agar,
 - 25 mg/l glucozo-6-fosfat (G6P) pentru a pregăti mediul agar Mueller-Hinton G6P în vederea testării fosfomicinei în diluție de agar.
- Uscați plăcile cu capacul deschis timp de 15 minute la 35 °C sau peste noapte la 20-25 °C [3].

5.2. Procedură de testare

Procedura de testare descrisă în cele ce urmează este destinată metodelor de difuzie a discurilor și de diluție de agar. Pentru a utiliza alte metode (de exemplu, bandă de testare a gradientului), consultați procedura corespunzătoare.

5.2.1. Inoculare

Testele trebuie efectuate cu un inocul standardizat conform descrierii din orientările actuale (CLSI, EUCAST, CA-SFM/EUCAST) [1-3, 9].

5.2.2. Incubare

Respectați orientările actuale ale CLSI, EUCAST și CA-SFM/EUCAST [1-3, 9]. Condițiile de incubare variază în funcție de speciile de bacterii testate.

5.2.3. Interpretarea rezultatelor

Interpretarea testului de susceptibilitate antimicrobiană utilizând metoda de difuzie a discurilor sau metoda de diluție de agar este descrisă în actualizările orientărilor CLSI, EUCAST și CA-SFM/EUCAST [11-13, 9].

6. PERFORMANȚA/CONTROLUL CALITĂȚII TESTULUI

- Aspectul mediului Mueller-Hinton agar gata de utilizare: agar limpede până la opalescent, de culoarea chihlimbarului.
- Aspectul mediului Mueller-Hinton agar deshidratat: pulbere bej.
- Aspectul Mueller-Hinton agar gata de utilizare + mediu sânge: agar roșu.

Performanța Mueller-Hinton agar deshidratat este testată conform ISO 16782 și îndeplinește criteriile de control al calității menționate în standardul ISO 16782 [4].

Calitatea materialului AST este evaluată în mod regulat de EUCAST; s-a demonstrat că mediul Bio-Rad Mueller-Hinton agar deshidratat are o performanță excelentă: 100 % din citirile diametrului zonei se încadrează în limitele de control al calității (CC), iar 86 % au atins ținta ±1 mm [14].

a) Controlul calității privind performanța de creștere

Performanța de creștere a Mueller-Hinton agar este verificată cu următoarele tulpini:

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560

b) Controlul calității testului de susceptibilitate

Fiecare lot de Mueller-Hinton agar este testat utilizând metoda de difuzie a discurilor, respectând combinațiile de tulpini CC/agenți antimicrobieni recomandate (listă neexhaustivă) și criteriile de acceptare specificate în orientările CLSI și/sau EUCAST [9, 11, 12, 15].

Mueller-Hinton agar

Tulpini	Testarea susceptibilității antimicrobiene
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 - Cefotaxim 5 µg - Ciprofloxacină 5 µg - Tigeciclină 15 µg	Diametrul zonei este conform cu standardele de performanță EUCAST [15].
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 - Cefoxitin 30 µg - Gentamicină 10 µg - Tetraciclină 30 µg	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 - Trimetoprim-sulfametoxazol 1,25/23,75 µg	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 - Gentamicină 10 µg - Imipenem 10 µg	

Mueller-Hinton agar + Sheep Blood

Tulpini	Testarea susceptibilității antimicrobiene
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619 - Tetraciclină 30 µg - Eritromicină 15 µg - Trimetoprim-sulfametoxazol 1,25/23,75 µg	Diametrul zonei este conform cu standardul de performanță CLSI [11].

Mueller-Hinton-F agar

Tulpini	Testarea susceptibilității antimicrobiene
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766 - Ampicilină 2 µg - Cefotaxim 5 µg - Meropenem 10 µg - Tetraciclină 30 µg	Diametrul zonei este conform cu standardele de performanță EUCAST [15].
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619 - Tetraciclină 30 µg - Eritromicină 15 µg - Trimetoprim + sulfametoxazol 1,25/23,75 µg - Norfloxacină 10 µg	
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560 - Ciprofloxacină 5 µg - Eritromicină 15 µg - Tetraciclină 30 µg	

7. CONTROLUL CALITĂȚII PRODUCĂTORULUI

Toți reactivii produși sunt pregătiți în conformitate cu sistemul nostru de calitate, începând cu recepția materiei prime până la comercializarea finală a produsului. Fiecare lot este supus evaluării de control al calității și este introdus pe piață numai dacă respectă criteriile de acceptare predefinite. Documentele cu privire la producția și controlul fiecărui lot în parte sunt păstrate de Bio-Rad.

8. LIMITĂRILE TESTULUI

- Trebuie utilizate întotdeauna culturi proaspete, pure pentru a obține rezultate interpretabile.
- Există câțiva factori ce ar putea afecta rezultatele: dimensiunea inoculului, timpul de incubare, atmosfera de incubare etc. În consecință, este esențială respectarea protocolului descris în orientările curente (CLSI, EUCAST, CA-SFM/EUCAST) [1-3].
- Este posibil ca unele tulpini bacteriene să nu crească în Mueller-Hinton agar ca urmare a nevoilor nutriționale ale acestora. Trebuie utilizat un mediu adecvat în acest caz: consultați orientările actuale (CLSI, EUCAST, CA-SFM/EUCAST) [1-3].
- Este posibil ca unele tulpini de *Streptococcus uberis* să aibă o creștere slabă în Mueller-Hinton agar.
- Unele cazuri de combinații de tulpini bacteriene/agenți antimicrobieni pot necesita respectarea orientărilor pentru citirile lor [9,16,17].

9. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
2. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 13th ed. CLSI standard M02. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
3. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 9.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; January 2021.
4. ISO/TS 16782:2016. Clinical laboratory testing - Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller-Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing. First edition 2016-10-15.
5. Casillas, E., Kenny, M.A., Minshew B.H., Schoenknecht, F. 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. 1981
6. Murray, P.R., Tenover, J. R. Evaluation of Mueller-Hinton agar for disk diffusion susceptibility tests. J. Clin. Microbiol. 18: 1269-1271. 1983.
7. D'Amato, R.F., Thornsberry C., Baker C.N., Kirven, L.A. 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. 1976.
8. D'Amato, R.F., Thornsberry C. Calcium and Magnesium in Mueller-Hinton agar and their influence on disk diffusion susceptibility results. Current Microbiol. 2:135-138. 1979.
9. CA-SFM/EUCAST: Comité de l'antibiogramme. French Society of Microbiology/European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. V1.0, 2021.
10. World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. Technical report series 673 (Revision 1981). W.H.O., Geneva – p156-192. 1981.
11. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI supplement M100, 31st Edition. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2021.
12. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI guideline M45, 3rd Edition. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. August 2016.
13. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. <http://www.eucast.org>.
14. Ahman, J.; Matuschek, E.; Wallgren, A.-K. and Kahlmeter, G. EUCAST evaluation of 21 Mueller Hinton powders for disk diffusion testing-wide differences detected. EUCAST. Poster, ECCMID P2272, April 2019.
15. The European Committee on Antimicrobial susceptibility testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 11.0, 2021. <http://www.eucast.org>.
16. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reading Guide. M02QG, 1st edition, 2018.
17. The European Committee on Antimicrobial susceptibility testing. Reading Guide. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Version 7.0, January 2020.

BIO-RAD este o marcă comercială a Bio-Rad Laboratories, Inc.

Toate mărcile comerciale utilizate în prezentul document sunt proprietatea respectivilor deținători.



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



2021/01
0001076