

# MUELLER HINTON II AGAR + 5% HORSE BLOOD + 20mg/l NAD (MH-F)

## INSTRUKCJA UŻYCIA GOTOWEGO PODŁOŻA NA PŁYTCE

### 1. Przeznaczenie

Podłoże Mueller Hinton II Agar + 5% Horse Blood + 20 mg/l NAD jest podłożem przeznaczonym do oznaczania lekowrażliwości oraz wykrywania mechanizmów oporności na antybiotyki metodą dyfuzyjno-krażkową u bakterii o wysokich wymaganiach odżywczych izolowanych z materiałów klinicznych pochodzących od człowieka lub innych próbek.

**Funkcją podłoża** Mueller Hinton II Agar + 5% Horse Blood + 20 mg/l NAD jest **wspomaganie diagnozy** poprzez określenie lekowrażliwości na leki przeciwbakteryjne patogenów wymagających izolowanych z próbek klinicznych pochodzących od człowieka.

Badanie lekowrażliwości drobnoustrojów patogennych izolowanych z próbek pochodzących od człowieka ma istotne znaczenie dla podjęcia właściwej terapii antybakteryjnej. Bakterie posiadają naturalną wrażliwość lub oporność na różne czynniki przeciwbakteryjne. Wraz z coraz powszechniejszym stosowaniem chemioterapeutyków i antybiotyków nabywają oporność na ich działanie. Informacja o profilu lekowrażliwości oraz wykrytych mechanizmach oporności wyhodowanego patogenu umożliwia lekarzowi podjęcie właściwej decyzji dotyczącej wyboru odpowiedniej terapii przeciwbakteryjnej.

Podłoże Mueller Hinton II Agar + 5% Horse Blood + 20 mg/l NAD wykorzystywane jest do badania lekowrażliwości bakterii o wysokich wymaganiach odżywczych zgodnie z procedurami EUCAST, tj. *Streptococcus* spp. (w tym *S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* oraz *Campylobacter coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* oraz *Campylobacter urinae*, a także *Kingella kingae*.

Nr kat.:	Rodzaj podłoża:	Opakowanie:
1370PD90	podłoże stałe na płytce, gotowe do użycia	1x10 szt (90 mm)

### 2. Zasada działania

W podłożu Mueller Hinton II Agar + 5% Horse Blood + 20 mg/l NAD ekstrakt wołowy i pepton kazeinowy dostarczają azotu, mineralów, witamin, węgla, aminokwasów i innych składników wspomagających wzrost bakterii. Skrobia kukurydziana absorbuje toksyczne czynniki powstające podczas wzrostu bakterii. Hydroliza skrobi kukurydzianej podczas sterylizacji dostarcza niewielkich ilości dekstrozy będącej źródłem energii. Agar jest czynnikiem zestalającym. Odwłókniona krew końska i NAD umożliwiają wzrost bakterii o wysokich wymaganiach odżywczych.

Pożywka Mueller Hinton II Agar + 5% Horse Blood + 20 mg/l NAD jest wykorzystywane do badania lekowrażliwości bakterii wymagających przy użyciu metody dyfuzyjno-krażkowej standaryzowanej przez EUCAST.

Metoda dyfuzyjno-krażkowa jest metodą wykorzystującą zjawisko powstawania w podłożu stałym gradientu stężeń leku przeciwbakteryjnego w wyniku jego dyfuzji z krażka. Wskutek tego, wokół krażka następuje zahamowanie wzrostu drobnoustrojów wysianych na podłoże. Zmierzoną średnicę strefy zahamowanego wzrostu wyrażoną w milimetrach, porównuje się z odpowiednią wartością graniczną określoną w rekomendacjach EUCAST. W wyniku tego porównania, klasyfikuje się drobnoustroj do odpowiedniej kategorii wrażliwości na określony lek przeciwbakteryjny. W celu określenia mechanizmu oporności na podłożu układa się krażki bibułowe zawierające odpowiednie antybiotyki o określonym stężeniu. Wielkość i kształt strefy zahamowania wzrostu wokół krażków pozwala na wykrycie odpowiedniego mechanizmu oporności.

### 3. Skład podłoża\*

w g/l wody destylowanej:	Suplementy/litr:
Pepton kazeinowy 17,5 g	krew końska 50 ml
Skrobia kukurydziana 1,5 g	NAD 0.02 g
Ekstarkt wołowy 2,0 g	
Agar 17,0 g	

\*Dostosowane i/lub uzupełnione zgodnie z wymaganiami, aby spełnić kryteria wydajności.

pH 7,3 ± 0,1 w temperaturze 25°C.

**Wygląd podłoża** - Podłoże jednorodne, czerwone

#### 4. Przygotowanie pożywki

Pożywka jest gotowa do użycia. Bezpośrednio przed użyciem pożywkę należy doprowadzić do temperatury pokojowej.

#### 5. Wyposażenie wymagane, nie dostarczone

Wyposażenie i odczynniki niezbędne do wykonania badania (np. sól fizjologiczna, wymazówki, krążki nasączone antybiotykami) oraz sprzęt mikrobiologiczny ogólnolaboratoryjny, w tym densytometr bakteriologiczny lub wzorzec gęstości, ciepłarka laboratoryjna z możliwością wzbogacenia atmosfery w CO<sub>2</sub> oraz linijka lub suwmiarka lub inne urządzenie do pomiaru wielkości stref zahamowania wzrostu.

#### 6. Środki ostrożności

- Produkt przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego.
- Produkt niezautomatyzowany.
- Podłoże zawiera składniki pochodzenia zwierzęcego, co może wiązać się z obecnością biologicznych czynników chorobotwórczych, dlatego z podłożem należy postępować zgodnie z zasadami pracy z materiałem biologicznym potencjalnie zakaźnym.
- Nie należy używać płytek, jeżeli na podłożu są widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia, pęknięcia lub inne oznaki pogorszenia jakości.
- Nie używać płytek uszkodzonych.
- Nie używać płytek zhemolizowanych.
- Nie używać płytek po terminie ważności.
- Nie dopuszcza się ponownej inkubacji wcześniej posianych płytek.
- W celu zapewnienia poprawnych wyników, należy postępować zgodnie z aktualnymi procedurami EUCAST.
- W przypadku, gdy postępowanie z pożywką podczas wykonywania badania będzie odbiegało od opisanego w niniejszej instrukcji, laboratorium jest zobowiązane do przeprowadzenia walidacji przyjętego postępowania.

#### 7. Przechowywanie

Płytki z podłożem należy przechowywać w temperaturze 2–12°C do upływu terminu ważności. Podłoża przechowywać w oryginalnym opakowaniu w pozycji odwróconej, z dala od bezpośredniego źródła światła. Aby uniknąć zamrożenia agarów, nie należy przechowywać płytek blisko ścian lodówki. Aby uniknąć pojawienia się większej ilości wody na wieczku płytki nie należy otwierać zbyt często lodówki i nie przechowywać podłoża w przepełnionej lodówce.

#### 8. Termin ważności

Podłoże przechowywane w temperaturze 2–12°C zachowuje swoje właściwości do 45 dni od daty produkcji.

#### 9. Materiał do badań

Materiałem do badań są czyste, świeże po całonocnej hodowli (ok. 16-24 godziny) hodowle szczepów bakterii wymagających wyizolowane z próbek klinicznych pochodzących od człowieka, lub innych próbek posianych na nioselektywne podłoża stałe.

#### 10. Sposób wykonania

##### Uwaga 1:

W celu zapewnienia poprawnych, wiarygodnych wyników badania lekowrażliwości bakterii, należy ściśle przestrzegać aktualnych procedur i wytycznych EUCAST dotyczących doboru środków przeciwbakteryjnych i wykonania badania lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krążkową.

##### Uwaga 2:

Kontrolę jakości metody dyfuzyjno-krążkowej należy wykonywać zgodnie z aktualnymi procedurami EUCAST.

10.1. Przed użyciem podłoże należy doprowadzić do temperatury pokojowej.

10.2 Przygotować zawiesinę badanego szczepu o gęstości 0,5 w skali McFarlanda, zawieszając kolonie szczepu w roztworze soli fizjologicznej. Kolonie pobrać sterylną eżą lub wymazówką z podłoża nioselektywnego, po 16-24 godzinnej hodowli. Należy wybrać kilka podobnych morfologicznie kolonii. Gęstość inokulum ustalić przy użyciu densytometru bakteriologicznego. Gęstość zawiesiny można także ustalić poprzez makroskopowe porównanie gęstości zawiesiny

szczepu badanego ze wzorcem gęstości o stężeniu 0,5 McFarlanda. W tym przypadku, zmętnienie zawiesiny szczepu badanego do wzorca gęstości należy porównywać na białym tle w czarne paski.

#### Uwaga!

Przygotowaną zawiesinę szczepu badanego należy użyć w ciągu 15 minut, jednak nie później niż w ciągu 60 minut od przygotowania.

10.3. Zanurzyć sterylną bawełnianą wymazówkę w przygotowanej zawieszynie szczepu badanego. W przypadku bakterii Gram-ujemnych, w celu uniknięcia nadmiernej inokulacji należy usunąć nadmiar zawiesiny z wymazówki przez odcisnięcie jej o wnętrze próbówki. W przypadku bakterii Gram-dodatnich nie ma potrzeby odciskania wymazówki o wnętrze próbówki. Podłoża mogą być inokulowane manualnie lub z użyciem automatycznego inokulatora. Zawiesinę rozprowadzić na całej powierzchni agaru równomiernie, upewniając się, że pomiędzy poszczególnymi pasmami nie ma przerw, co jest szczególnie ważne w przypadku bakterii Gram-dodatnich.

10.4. Nałożyć krążki z antybiotykami na powierzchnię agaru. Krążki należy nakładać na pożywkę w ciągu 15 minut od jej inokulacji. Krążki lekko docisnąć, gdyż powinny całkowicie przylegać do powierzchni agaru. Po nałożeniu, krążki nie mogą być przesuwane, ze względu na szybką dyfuzję antybiotyku z krążka do podłoża. Liczba krążków na płytce powinna być ograniczona, tak aby powstające strefy zahamowania wzrostu nie zachodziły na siebie, a poszczególne antybiotyki nie oddziaływały wzajemnie na siebie. Na płytkę o średnicy 90 mm nakłada się maksymalnie 6 krążków z antybiotykiem.

10.5. Posiane płytki inkubować zgodnie z wytycznymi EUCAST w zależności od badanego mikroorganizmu (czas, temperatura inkubacji oraz zawartość CO<sub>2</sub>). Płytki należy odwrócić podłożem do góry, upewniając się przy tym, że krążki nie spadły z powierzchni agaru. Inkubacja płytek powinna rozpocząć się w ciągu 15 minut od nałożenia krążków. Płytek nie należy inkubować dłużej niż jest to wymagane.

### 11. Odczyt i interpretacja wyników badania lekowrażliwości

Po zakończeniu wymaganego okresu inkubacji przy użyciu linijki, suwmiarki lub innego odpowiedniego urządzenia, dokonać pomiaru wielkości stref zahamowania wzrostu zgodnie z aktualnymi wytycznymi EUCAST. Zapisać zmierzone z dokładnością do pełnego milimetra strefy zahamowania wzrostu, a następnie otrzymane wyniki pomiaru wielkości stref zahamowania wzrostu interpretować w oparciu o aktualne wytyczne EUCAST do odpowiednich kategorii wrażliwości.

### 12. Kontrola jakości

Właściwości odżywcze podłoża należy kontrolować z użyciem szczepów odniesienia dających oczekiwane reakcje dodatnie. Badanie należy wykonywać używając czystych, świeżych hodowli szczepów odniesienia dających pożądane reakcje. Do przeprowadzenia kontroli jakości podłoża, należy użyć następujących szczepów odniesienia:

Szczep odniesienia:	Morfologia kolonii	Intensywność wzrostu:
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Drobne, całobrzegie, hemoliza typu $\alpha$	dobry wzrost
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766	Kolonie szare, małe całobrzegie, płaskie, brak hemolizy	dobry wzrost

Dopuszcza się stosowanie innych szczepów odniesienia zapewniających spójność pomiarową, zgodnie z procedurami i instrukcjami kontroli jakości obowiązującymi w laboratorium. Procedury kontroli jakości powinny spełniać wymagania obowiązujących przepisów oraz odpowiednich wytycznych/rekomendacji.

### 13. Ograniczenia metody

- Liczne czynniki mogą wpływać na poprawność wielkości stref zahamowania wzrostu i wyniki badania lekowrażliwości. Są to gęstość zawiesiny bakteryjnej, intensywność wzrostu, skład podłoża i jego pH, czas i środowisko inkubacji, zawartość leku w krążku i szybkość jego dyfuzji do agaru, sposób wykonania badania, sposób pomiaru strefy zahamowania wzrostu.
- Grubość agaru większa niż 4 mm może spowodować uzyskanie fałszywych wyników oporności.
- Grubość agaru mniejsza niż 4 mm może spowodować uzyskanie fałszywych wyników wrażliwości.
- Wartość pH poza zakresem  $7,3 \pm 0,1$  może niekorzystnie wpływać na wyniki testu wrażliwości. Jeśli pH jest zbyt niskie, aminoglikozydy i makrolidy mogą stracić swoje właściwości, zaś inne środki przeciwdrobnoustrojowe mogą wykazywać nadmierną aktywność. Jeśli pH jest zbyt wysokie, można zaobserwować odwrotne zjawisko.
- Badanie lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krążkową należy wykonywać wyłącznie przy użyciu świeżych, czystych hodowli bakteryjnych.

- Zbyt duża gęstość inokulum może powodować zmniejszenie strefy zahamowania wzrostu, a zbyt mała zwiększenie stref zahamowania wzrostu i trudności w ich pomiarze.
- Pozostawienie inokulowanych płytek przed nałożeniem krążków na dłużej w temperaturze pokojowej, może spowodować namnażanie się drobnoustrojów, czego skutkiem będzie zmniejszenie średnicy stref zahamowania wzrostu. Dlatego też, istotne jest przestrzeganie zasady 15-15-15: zawiesinę należy zużyć w ciągu 15 minut od przygotowania, krążki nałożyć w ciągu 15 minut od inokulacji płytki, a inkubację płytek rozpocząć w ciągu 15 minut od nałożenia krążków.
- Niewłaściwe przechowywanie krążków antybiotykowych może wpływać na stabilność antybiotyków w nich zawartych, co może powodować zmniejszenie średnicy stref zahamowania wzrostu i jest częstym źródłem błędów interpretacyjnych.
- Istotnym czynnikiem mającym wpływ na wynik badania jest układanie stosów płytek w cieplarni z powodu ich nierównomiernego ogrzewania. Zaleca się maksymalną liczbę płytek w stosie równą 5.
- Nadmierne obkurczenie się podłoża na skutek nieprawidłowe przechowywania może prowadzić do uzyskania fałszywych wyników wskazujących na występowanie wrażliwości.

#### 14. Charakterystyka metody

Standaryzację metody określania lekowrażliwości rozpoczęto w latach 60-tych XX wieku. Kirby i Bauer zaproponowali procedurę, w której wykorzystali podłoże Muller-Hinton. Na podłożu stosowano krążki o stałym określonym stężeniu antybiotyku, zaś wskaźnikiem oporności i wrażliwości na dany lek była wielkość strefy zahamowania wzrostu wokół krążków. Liczne badania przeprowadzone w kolejnych latach zarówno przez EUCAST wykazały przydatność tego podłoża do badania lekowrażliwości na podłożach stałych. Do standaryzacji badania przyczyniła się standaryzowana produkcja pożywek sypkich, w których zapewniona jest niska zawartość tyminy i tymidyny oraz kontrolowana.

W przypadku konieczności wykonania badania lekowrażliwości drobnoustrojów wymagających pożywka Muller-Hinton jest suplementowana mechanicznie odwłóknioną krwią końską (końcowe stężenie w pożywce 5%) oraz NAD (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, końcowe stężenie w pożywce 20mg/l) zgodnie z wymaganiami EUCAST. Ze względu na standaryzację sposobu wykonania, metoda dyfuzyjno-krążkowa jest najpowszechniej wykorzystywaną metodą określania wrażliwości bakterii na środki przeciwbakteryjne w medycznych laboratoriach diagnostycznych.

#### 15. Postępowanie ze zużytymi podłożami

Podłoża po badaniach oraz nieużyte podłoża należy utylizować zgodnie z aktualnie obowiązującymi przepisami dotyczącymi postępowania z odpadami medycznymi oraz procedurami laboratorium odnośnie utylizacji materiałów zakaźnych i potencjalnie zakaźnych.

#### 16. Zgłaszanie zdarzeń niepożądanych

Zgodnie z obowiązującymi przepisami, zdarzenia niepożądane i incydenty, które można bezpośrednio powiązać z opisywanym podłożem, należy zgłaszać producentowi oraz Prezesowi Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych na adres:

Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych  
Al. Jerozolimskie 181C, 02-222 Warszawa;  
Telefon: 48 22 492-11-00  
Fax: 48 22 492-11-09

#### 17. Piśmiennictwo

1. Matuschek, E., Brown, D.F. and Kahlmeter, G. 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. PA-257491.01 Page 8 of 8
2. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Search for latest version at <http://www.eucast.org>.
3. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 1966: 45:493-496.
4. 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>.
5. Koch, A.E. and Burchall, J.J. Reversal of the antimicrobial activity of trimethoprim by thymidine in commercially prepared media. Appl. Microbiol. 1971; 22:812-817.
6. Ferone, R., Bushby, S.R.M., Burchall, J.J., Moore, W.D., and Smith, D. 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. 1975; 7:91-98.
7. Reller, L.G., Schoenknecht, F.D., Kenny, M.A., and Sherris, J.C. Antibiotic susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*: selection of a control strain and criteria for magnesium and calcium content in media. J. Infect. Dis. 1974: 130:454-463.
  8. D'Amato, R.F., and Thornsberry, C. Calcium and magnesium in Mueller-Hinton agar and their influence on disk diffusion susceptibility results. Current Microbiol. 1979: 2:135-138.
  9. 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>.
  10. Baker, C.N., Thornsberry, C. and Hawkinson R.W. Inoculum standardization in antimicrobial susceptibility testing: evaluation of overnight agar cultures and the rapid inoculum standardization system. J. Clin. Microbiol. 1983: 17:450-457.
  11. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Reading guide. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Search for latest version at <http://www.eucast.org>.
  11. Washington, J.A., and Woods G.L. 1995. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. p. 1327-1341. In Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., and Tenover, R.H. (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995.
  12. Neumann, M.A., Sahm, D.F., Thornsberry, C., McGowan, J.E., 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.
  13. EUCAST Quality Control, <http://www.eucast.org>








#### Historia zmian dokumentu

Data zmiany	Sekcja	Opis zmiany
2023/06/29	Cały dokument	Dostosowanie do wymagań Rozporządzenia UE 2017/746

#### UWAGA

Historia zmian dokumentu nie uwzględnia zmian redakcyjnych.

SYMBOL	NAZWA SYMBOLU	OPIS	NR REF.
	Wytwórca	Oznacza wytwórcę wyrobu medycznego zgodnie z definicją zawartą w dyrektywach unijnych 90/385/EWG, 93/42/EWG oraz 98/79/WE.	5.1.1
	Data produkcji	Oznacza datę produkcji wyrobu medycznego.	5.1.3
	Numer katalogowy	Oznacza numer produktu w katalogu producenta pozwalający zidentyfikować wyrób medyczny.	5.1.6
	Numer serii / kod partii	Oznacza nadany przez producenta numer partii pozwalający zidentyfikować partię produktów, do której należy wyrób medyczny.	5.1.5
	Wyrób do diagnostyki in vitro	Oznacza wyrób medyczny przeznaczony do diagnostyki in vitro	5.5.1
	Nie używać powtórnie	Oznacza wyrób medyczny przeznaczony do jednokrotnego użytku lub do użytku podczas leczenia jednego pacjenta w ramach jednej procedury medycznej.	5.4.2
	Wystarczy na wykonanie <n> testów	Oznacza nadaną przez producenta wartość na ile testów wystarczy wyrób.	5.5.5

	Data przydatności do użycia	Oznacza datę, po której wyrób medyczny nie powinien być używany.	5.1.4
	Przestrzegać zakresu temperatury	Wskazuje maksymalną i minimalną wartość temperatury, w której należy przechowywać, transportować lub użytkować przedmiot.	5.3.7
	Symbol bezpieczeństwa (Zgodność z wymogami UE)	Oznaczenie CE na produkcie stanowi deklarację producenta potwierdzającą zgodność produktu z zasadniczymi wymogami odpowiednich przepisów Unii Europejskiej dotyczących zdrowia, bezpieczeństwa i ochrony środowiska.	nd.
	Sprawdź w instrukcji użycia	Oznacza konieczność zapoznania się z instrukcją użytkowania	5.4.3
	Sterylizowany aseptycznymi technikami przetwarzania	Wskazuje wyrób medyczny, który został wytworzony za pomocą zaakceptowanych technik aseptycznych.	5.2.2
	Nie używać w przypadku uszkodzonego opakowania	Oznacza wyrób medyczny, który nie powinien być używany, jeśli opakowanie zostało uszkodzone lub otwarte.	5.2.8
	Zawiera materiał biologiczny pochodzenia zwierzęcego	Oznacza wyrób medyczny zawierający materiał biologiczny tj. tkanki, komórki lub ich pochodne pochodzenia zwierzęcego.	5.4.8



Graso Zenon Sobiecki  
Krag 4A; 83-200 Starogard Gdański  
[www.grasobiotech.pl](http://www.grasobiotech.pl)  
tel. + 48 (58) 562 30 21

Oddział produkcyjny  
Leśna 1, Owidz  
83-211 Jabłowo

