

BD Haemophilus Test Medium Agar (HTM)

NAMJENA

BD Haemophilus Test Medium Agar (Agar s testnim medijem Haemophilus) (HTM) koristi se u postupku protumikrobnog disk difuzijskog ispitivanja osjetljivosti za kliničke izolate vrste *Haemophilus* kao što je opisano u odobrenom standardu M2 koji je objavio Institut za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI).¹

NAČELA I OBJAŠNJENJE POSTUPKA

Mikrobiološka metoda.

Agar Mueller Hinton s dodatkom 1% hemoglobina i obogaćenja 1% IsoVitaleX (čokoladni agar Mueller Hinton) podloga je koja se ranije preporučivala za *Haemophilus influenzae*.² U opsežnoj studiji koju su proveli Jorgensen i kolege razvijen je agar s testnim medijem Haemophilus (Haemophilus Test Medium HTM).^{3,4} Ta podloga je agar Mueller Hinton s faktorom (hemin ili hematin), faktorom V (nikotinamid adenin dinukleotid, NAD) i ekstraktom kvasca.

Najveća prednost agara HTM u usporedbi s čokoladnim agarom Mueller Hinton optička je čistoća koja omogućuje mjerenja promjera zona s dna posudice kakav i je standardni postupak ispitivanja za nezahtjevne organizme na agaru Mueller Hinton. Osim toga, agar HTM sadrži nisku razinu timidina i zbog toga je prikladan za ispitivanje trimetoprima/sulfametoksazola.

Kriteriji za interpretaciju protumikrobnog ispitivanja osjetljivosti navedeni su u CLSI-jevom dokumentu M100 (M2) koji je uključen u CLSI-jev dokument M2.¹ Taj dokument treba konzultirati za dodatne pojedinosti.

BD Haemophilus Test Medium Agar (Haemophilus Test Medium) sastoji se od agara Mueller Hinton u koji je dodan faktor X (hemin ili hematin), faktor V (nikotinamid adenin dinukleotid, NAD) i ekstrakt kvasca.

REAGENSI

BD Haemophilus Test Medium Agar (HTM)

Formula* po litri pročišćene vode

Goveđi ekstrakt	2,0 g
Kiseli hidrolizat kazeina	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0
Ekstrakt kvasca	5,0
Hematin	0,015
Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD)	0,015

pH 7,3 ± 0,1

*Prilagođeno i/ili dodano prema potrebi kako bi se udovoljilo kriterijima učinkovitosti.

MJERE OPREZA

IVD . Samo za profesionalnu primjenu. 

Ne upotrebljavajte pločice ako su vidljivi znakovi kontaminacije mikrobima, promjena boje, sušenje, pucanje ili ostali znakovi pogoršanja kvalitete. Preveliko skupljanje podloge uslijed sušenja može dovesti do lažnih rezultata osjetljivosti.

Pogledajte dokument **OPĆE UPUTE ZA UPOTREBU** o postupcima aseptičnog rukovanja, biološkim opasnostima i odlaganju iskorištenog proizvoda.

ČUVANJE I ROK VALJANOSTI

Po primitku pohranite pločice na tamnom mjestu pri temperaturi od 2 – 8 °C u originalnom pakiranju do trenutka upotrebe. Pazite da ne dođe do smrzavanja i pregrijavanja. Pločice se mogu inokulirati do datuma isteka valjanosti (pogledajte naljepnicu na pakiranju) te inkubirati tijekom preporučenih rokova inkubacije.

Pločice iz otvorenih pakiranja po 10 pločica mogu se koristiti tjedan dana ako se čuvaju na čistom mjestu pri temperaturi od 2 – 8 °C.

KORISNIČKA KONTROLA KVALITETE

Za korisničku kontrolu kvalitete potrebno je pogledati standarde CLSI-ja¹ ili nacionalne standarde, ako su primjenjivi. Prije svega treba napraviti dolje opisani **Postupak ispitivanja**, koristeći referentne sojeve navedene u **Materijalu koji nije priložen**.

Pločice **BD Haemophilus Test Medium Agar** (HTM) i protumikrobne diskove treba testirati barem dva puta tjedno kako biste provjerili rade li ispravno.

Izgleđ neinokulirane podloge: svijetložuta.

POSTUPAK

Priloženi materijal

BD Haemophilus Test Medium Agar (pločice **Stacker** od 90 mm). Mikrobiološki kontrolirano.

Materijal koji nije priložen

1. Bujon za inokulum u epruveti, kao što je **BD Trypticase Soy Broth** (bujon kao proizvod digestije sojinog kazeina) ili bujon Mueller Hinton II (s podešenim kationima), u epruveti zapremnine 5 mL za pripremu standardnog inokuluma i sterilni bujon ili fiziološka otopina za razrjeđivanje inokuluma.
2. Standard usporedbe barijevog sulfata (0,5 mL 0.048 M BaCl₂ [1,175% w/v BaCl₂·2H₂O] s 99,5 mL 0.18 M [0.36 N] H₂SO₄ [1% v/v]).
3. Fotometrički uređaj za podešavanje zamućenosti suspenzije inokuluma da odgovara McFarland standardu 0,5.
4. Kao alternativa gore navedenim materijalima (1 – 3), može se koristiti **BD Prompt Inoculation System** (volumetrički uređaj za pripremu inokuluma).^{5,6}
5. Kontrolne kulture - *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, ATCC 49766 i ATCC 10211.
6. Papirnati diskovi impregnirani s točno određenim količinama protumikrobnih agensa, kao što su diskovi za ispitivanje osjetljivosti **BD Sensi-Disc**.
7. Uređaj za doziranje diskova, kao što dozator sa samopopunjavanjem **BD Sensi-Disc** sa 6 mjesta.
8. Ravnalo ili drugo pomagalo za mjerenje veličine zone u milimetrima.
9. Inkubator koji stvara atmosferu s 5% CO₂ ili drugi uređaj koji stvara sličnu aerobnu atmosferu obogaćenu CO₂.
10. Reagens za izvođenje brzog testa β-laktamaze kao što su diskovi **BD Cefinase**.
11. Podloge za dodatne kulture, reagensi i laboratorijska oprema prema potrebi.

Vrste uzoraka

Ovaj proizvod koristi se za ispitivanje osjetljivosti čistih kultura vrste *Haemophilus* izoliranih iz kliničkih uzoraka (pogledajte također Karakteristike svojstava i ograničenja postupka).

Postupak ispitivanja

1. Pripremite bojenje po Gramu prije početka ispitivanja osjetljivosti kako biste potvrdili čistoću kulture i pokušaj identifikacije bakterije *Haemophilus*.
2. Upotrijebite nekoliko dobro izoliranih kolonija direktno iz pločice čokoladnog agara koji je odležao preko noći (po mogućnosti 20 – 24 h) kao izvor inokuluma.
3. Brzi test β-laktamaze treba koristiti za brzo otkrivanje sojeva koji su rezistentni na penicilin, ampicilin ili amoksisicilin.
4. Pripremite suspenziju ispitnog organizma u bujonu Mueller Hinton, bujonu Mueller Hinton II ili 0,9% sterilne fiziološke otopine. Suspenzija se mora podesiti na zamućenost McFarland standarda 0,5 pomoću fotometričkog uređaja. Ta suspenzija će sadržavati približno 1 – 4 x 10⁸ CFU/mL. Suspenzija se mora pažljivo pripremati jer veće

- koncentracije inokuluma mogu dovesti do lažno pozitivnih rezultata s nekim β -laktamskim antibioticima, osobito kada se ispituju sojevi *H. influenzae* koji proizvode beta-laktamaze.¹
- Alternativne metode pripreme inokuluma koje podrazumijevaju uređaje s direktnom standardizacijom inokuluma bez podešavanja zamućenosti, kao što je **BD Prompt Inoculation System**, mogu se koristiti za rutinska ispitivanja, uključujući ispitivanje *H. influenzae*.^{5,6}
 - U roku od 15 min od podešavanja zamućenosti inokuluma umočite sterilni štapić u ispravno razrijeđeni inokulum i okrenite ga nekoliko puta čvrsto prema gornjoj unutrašnjoj stjenci epruvete kako biste iscijedili višak tekućine.
 - Inokulirajte cijelu površinu pločice **BD Haemophilus Test Medium Agar** tri puta, zakrećući pločicu za 60° između razmazivanja kako biste postigli ravnomjernu inokulaciju.
 - Poklopac možete ostaviti poluotvoren 3 - 5 min i pločicu držati na sobnoj temperaturi, ali ne dulje od 15 min, kako biste omogućili apsorpciju vlage s površine prije nanošenja diskova impregniranih s lijekom.
 - Diskove postavite pomoću dozatora protumikrobnih diskova uz aseptične mjere opreza. Većina protumikrobnih agensa stvaraju veće zone inhibicije kada se ispituju na *Haemophilus* u usporedbi s drugim organizmima. Zbog toga se na jednu pločicu od 100 mm smije staviti najviše četiri protumikrobna diska i najviše šest od sljedećih diskova: treća generacija cefalosporina (npr. cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson, ceftizoksim), aztreonam, imipenem ili ciprofloksacin. Nakon što diskove postavite na agar, pritisnite ih sterilnom iglom ili pincetom radi potpunog kontakta s površinom podloge.
 - Unutar 15 minuta nakon postavljanja diskova, okrenite pločice i inkubirajte ih u aerobnoj atmosferi obogaćenoj s 5% ugljikovog dioksida tijekom 16 – 18 h na 35°C.
 - Razmažite pločicu **BD Haemophilus Test Medium Agar** s *H. influenzae* ATCC 10211 i inkubirajte zajedno s pločicama za ispitivanje osjetljivosti kako biste odredili potiče li podloga odgovarajući rast.

Rezultati

- Pregledajte pločice nakon 16 – 18 h inkubacije. Trebalo bi se dobiti „polje“ rasta koji se slijeva u jednu točku. Ako rastu samo izolirane kolonije, inokulum je bio prelagan i treba ponoviti ispitivanje.
- Izmjerite promjer zona potpune inhibicije (kako je vidljivo golim okom), uključujući promjer diska, do najbližeg cijelog milimetra, pomoću pomičnog kutnika, ravnala ili šablone pripremljene za tu namjenu. Pomagalo za mjerenje drži se na stražnjoj strani pločice koja se drži preko crne nereflektirajuće površine, a osvijetljena je odozgora.
- Za krajnju točku treba smatrati područje koje ne pokazuje očit rast vidljiv golim okom. Zanimarite slabi rast sitnih kolonija koje se teško mogu otkriti uz rub očite zone inhibicije. S trimetoprimom i sulfonamidima, tragovi antagonista u podlozi mogu omogućiti slabi rast, zbog toga zanemarite slabi rast (20 ili manje u polju rasta) i izmjerite vidljiviji rub kako biste odredili promjer zone.

Računanje i interpretacija rezultata

Pogledajte CLSI-jev dokument M100 (M2) za interpretaciju rezultata dobivenih s kliničkim izolatima bakterije *Haemophilus*.¹ Rezultati mogu biti prijavljeni kao rezistentni, umjereno osjetljivi i osjetljivi ovisno o dobivenim promjerima zona.

Organizme koji su pozitivni na stvaranje beta-laktamaza treba smatrati kao rezistentne na ampicilin bez obzira na dobivene promjere zona. Treba napomenuti da sojevi *H. influenzae* rezistentni na ampicilin koji su opisani ne prikazuju aktivnost β -laktamaza.⁷ Zbog toga, ako promjer zone prikazuje rezistentnost na ampicilin, izolat treba prijaviti kao rezistentan na taj lijek, čak i ako je test β -laktamaza negativan.

Kontrolne kulture treba uključiti svaki put prilikom izvođenja ispitivanja osjetljivosti ili tjedno ako se može zabilježiti zadovoljavajući rad u skladu s CLSI-jevim standardom M2 u kojem se nalaze Tabele (M100) s točnim promjerima zona.¹

Napomena: Povremeno se objavljuju informativni dodaci CLSI-jevom dokumentu M2 ili revidirane verzije koje sadrže revidirane tabele protumikrobnih diskova i standardi za interpretaciju. Za trenutačne preporuke pogledajte posljednje tabele. Sve standarde i informativne dodatke možete dobiti od Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute),

RADNA SVOJSTVA I OGRANIČENJA POSTUPKA

A. Studija reproduktivnosti⁸

Tri serije proizvoda **BD Haemophilus Test Medium Agar** procijenjene su postupkom protumikrobnog ispitivanja osjetljivosti diska (M2-A4) koji je preporučio NCCLS u to vrijeme.⁹ U studiji je korišteno ukupno 12 protumikrobnih agensa (amokscilin/klavulanat, ampicilin, ampicilin/sulbaktam, cefaklor, cefonicid, ceftriakson, cefuroksim, kloramfenikol, ciprofloksacin, rifampin, tetraciklin, trimetoprim/sulfameto-ksazol) i 14 sojeva *H. influenzae*. Od tih 14 sojeva, sedam su sojevi centra American Type Culture Collection (ATCC), a ostalih sedam koncentrirane su kulture koje uključuju šest kliničkih izolata i jednu kulturu za kontrolu industrijske kvalitete. Promjeri zone dobivene sa svakom od tri serije uspoređeni su s kriterijima interpretacije (Tabela 2A) u M2-A4.⁹ U samo šest slučajeva zone dobivene s jednom serijom dale su različitu kategoriju za interpretaciju u usporedbi s druge dvije serije. Od tih šest odstupanja, četiri ih je bilo s tetraciklinom, jedno s cefaklorom i jedno s cefuroksimom. U slučaju tetraciklina rezultat je bila ili osjetljiva ili umjereno osjetljiva kategorija interpretacije (manja pogreška). S cefaklorom i cefuroksimom 1 mm razlike koji se pojavio također rezultira ili umjereno osjetljivom ili rezistentnom kategorijom, što je također manja pogreška.

U ovoj je studiji bilo pet sojeva *H. influenzae* koji su stvarali beta-laktamaze. Sa svakim od ovih sojeva, svaka serija HTM-a stvorila je promjere zona s ampicilinom koje se mogu interpretirati kao rezistentne. Dva od pet sojeva također su stvorili i kloramfenikol acetiltransferaze (CAT). Zone kloramfenikola dobivene s ova dva soja u skladu su s rezistentnošću na kloramfenikol.^{10,11}

B. Usporedba s čokoladnim agarom Mueller Hinton (Mueller Hinton Chocolate Agar)⁸

NCCLS-ov postupak s diskom napravljen je na 213 kliničkih izolata *H. influenzae* na agaru HTM i čokoladnom agaru Mueller Hinton.^{9,12} Ispitani protumikrobni agensi bili su ampicilin, ampicilin/sulbaktam, amokscilin/klavulanat i kloramfenikol. To su bili jedini protumikrobni agensi za koje je kriterij interpretacije promjera zone bio određen za čokoladni agar Mueller Hinton.^{13,14} Dobiveni su sljedeći rezultati.

BD Haemophilus Test Medium Agar				
		S	I	R
Čokoladni agar	S	808	1	2
Mueller Hinton	I	0	0	0
	R	0	0	41

Slaganje: 99.6% S = Osjetljiv I = Umjereno osjetljiv R = Rezistentan

S ampicilinom su se pojavile dvije veće i jedna manja pogreška. U obje veće pogreške **BD Haemophilus Test Medium Agar** dao je rezistentan rezultat, dok je čokoladni agar Mueller Hinton dao osjetljiv rezultat. Oba od ovih izolata su bili beta-laktamaze pozitivni. Zbog toga je rezistentan rezultat točan. Jedna manja pogreška bila je s izolatom koji je dao umjereno osjetljiv rezultat na agaru HTM i osjetljiv rezultat na čokoladnom agaru Mueller Hinton.

C. Ograničenja postupka

S nekim kombinacijama organizama-protumikrobnih agensa zona inhibicije možda neće imati jasno izražene rubove što može dovesti do nepravilne interpretacije.

Neispravna koncentracija inokuluma može dovesti do netočnih rezultata. Zone inhibicije mogu biti premale ako je inokulum pretežak i, ako je inokulum prelagan, mogu biti prevelike pa je mjerenje prekomplikirano.

Nepravilno čuvanje protumikrobnih diskova može uzrokovati gubitak potentnosti i može dovesti do lažno rezistentnih rezultata.

In vitro osjetljivost organizma na određeni protumikrobni agens ne znači nužno da je taj agens učinkovit in vivo. U odgovarajućim tekstovima potražite upute za interpretaciju rezultata.^{2,15}

REFERENCE

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Approved standard: M2. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA. Search for latest version at www.clsi.org
2. Thornsberry, C., T.L. Gavan, E.H. Gerlach. 1977. Cumitech 6, New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Coordinating ed., J.C. Sherris. American Society for Microbiology, Washington, D.C
3. Jorgensen, J.H., J.S. Redding, L.A. Maher, and A.W. Howell. 1987. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol. 25:2105-2113.
4. Jorgensen, J.H., A.W. Howell, and L.A. Maher. 1990. Antimicrobial susceptibility testing of less commonly isolated *Haemophilus* species using *Haemophilus* test medium. J. Clin. Microbiol. 28:985-988.
5. 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.
6. Marsik, F., G. Evans, J. Fowler, and L. Thompson. 1989. Comparison of the BBL Prompt system, Abbott A-Just, and visual method for the preparation of *Haemophilus influenzae* inoculum for the Bauer-Kirby procedure, abstr. C-67, p. 404. Abstr. 89th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1989.
7. Doern, G.V., J.H. Jorgensen, C. Thornsberry, D.A. Preston, T.A. Tubert, J.S. Redding, and L.A. Maher. 1988. A national collaborative study of the prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 32:180-185.
8. Službeni podaci. BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, SAD.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1990. Approved standard: M2-A4. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 4th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
10. Azemun, P., T. Stull, M. Roberts, and A.L. Smith. 1981. Rapid detection of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 20:168-170.
11. Doern, G.V., G.S. Daum, and T.A. Tubert. 1987. In vitro chloramphenicol susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*: disk diffusion procedures and assays for chloramphenicol acetyltransferase. J. Clin. Microbiol. 25:1453-1455.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1984. Approved standard: M2-A3. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 3rd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1987. Second Informational Supplement: M100-S2. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
14. Doern, G.V. and R.N. Jones. 1988. Antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, and *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob. Agents Chemother. 32:1747-1753.
15. 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.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. USA.

PAKIRANJE/DOSTUPNOST

BD testni medij *Haemophilus*

Kat. br. 254058

Pločaste podloge spremne za upotrebu, cpu 20

DODATNE INFORMACIJE

Dodatne informacije zatražite od lokalnog predstavnika tvrtke BD.



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>

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

Prompt is a trademark of 3M

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2013 BD