

## **BD Mueller Hinton II Agar** **BD Mueller Hinton II Agar 150 mm** **BD Mueller Hinton II Agar, Square**

### **NAMJENA**

**BD Mueller Hinton II Agar** (Agar BD Mueller Hinton II), dostupan u nekoliko formata pločica, koristi se u standardiziranom disk difuzijskom postupku za utvrđivanje osjetljivosti brzorastućih aerobnih organizama na protumikrobnim agensima prema standardima Instituta za kliničke i laboratorijske studije (CLSI) i Europskog povjerenstva za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).<sup>1, 2</sup>

### **NAČELA I OBJAŠNJENJE POSTUPKA**

Mikrobiološka metoda.

Budući da su klinički mikrobiološki laboratoriji ranih 1960-ih godina koristili veliki broj različitih postupaka za određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike i kemoterapijske agense, Bauer, Kirby i suradnici razvili su standardizirani postupak u kojem je agar Mueller Hinton, podloga originalno namijenjena izolaciji gonokoka, odabrana kao podloga za ispitivanje.<sup>1-5</sup> Kasnija međunarodna zajednička studija potvrdila je vrijednost agara Mueller Hinton za ovu namjenu zbog relativno dobre reproduktivnosti podloge, jednostavnosti formule i velike količine eksperimentalnih podataka koji su prikupljeni korištenjem ove podloge.<sup>6</sup>

CLSI i EUCAST objavili su standarde učinkovitosti za Bauer-Kirbyjev postupak, pa pojedinih treba potražiti u tim dokumentima.<sup>7, 8</sup> Razvijeni su i drugi nacionalni standardi za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti u skladu s Bauer-Kirbyjevim postupkom. U tim se standardima gustoće inokuluma, metoda inokulacije, veličine dobivenih zona i način interpretacije mogu razlikovati od preporuka instituta CLSI i povjerenstva EUCAST.

Bauer-Kirbyjev postupak temelji se na difuziji antimikrobnih tvari impregniranih na papirnatim diskovima kroz agarozni gel.<sup>9</sup> Za razliku od ranijih metoda u kojima su se koristili diskovi visokih i niskih antimikrobnih koncentracija na kojima se za interpretaciju koristila prisutnost ili odsutnost inhibiranih zona, u ovoj metodi koriste se diskovi s jednom koncentracijom antimikrobnog agensa, a promjeri zona uspoređuju se s minimalno inhibiranim koncentracijama (MIC).<sup>1-3, 7-9</sup>

U postupku ispitivanja standardna suspenzija organizama štapićem se nanosi na čitavu površinu podloge. Papirnati diskovi impregnirani s točno određenim količinama antibiotika ili drugih antimikrobnih agensa stavljaju se na površinu podloge, pločica se inkubira i mjere se zone inhibicije oko svakog diska. Utvrđivanje je li organizam osjetljiv (S), umjereno osjetljiv (I) ili rezistentan (R) na agens vrši se usporedbom veličina dobivenih zona s onima koje su navedene u tablicama od 2A do 2D u CLSI dokumentu M100 (M2).<sup>10</sup> Utvrđivanje je li organizam osjetljiv (S) ili rezistentan (R) na agens vrši se usporedbom veličina dobivenih zona s onima koje su navedene u tablicama graničnih vrijednosti povjerenstva EUCAST.<sup>11</sup>

Otkriveno je da različiti faktori utječu na disk difuzijska ispitivanja osjetljivosti. Oni obuhvaćaju podlogu, višak površinske vlage na podlozi, dubinu agara, potentnost diska, koncentraciju inokuluma, pH i beta-laktamazu koju stvaraju organizmi za ispitivanje.<sup>6-9, 12</sup>

**BD Mueller Hinton II Agar** proizvodi se s niskim razinama timina i timidina, te kontroliranim razinama kalcija i magnezija.<sup>15-17</sup> Razine timina i timidina u sirovim materijalima određuju se pomoću postupka difuzije diska s diskovima trimetoprim-sulfametoksazola (SXT) i organizmom *Enterococcus faecalis* ATCC<sup>TM</sup> 29212. Razine kalcija i magnezija kontroliraju se ispitivanjem sirovih materijala i dodavanjem izvora kalcija i/ili magnezija u količini potrebnoj za stvaranje točnih promjera zona uz antibiotske aminoglikozide i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Dubina agara za sve formate pločica **BD Mueller Hinton II Agar** prilagođena je s preporukama instituta CLSI i povjerenstva EUCAST.<sup>7,8</sup>

## REAGENSI

### BD Mueller Hinton II Agar

Formula\* po litri pročišćene vode

goveđi ekstrakt	2,0 g
kiseli hidrolizat kazeina	17,5
škrob	1,5
agar	17,0

pH 7,3 +/- 0,2

\*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, promjene boje, sušenja, pucanja ili ostali znakovi pogoršanja kvalitete. Preveliko skupljanje podloge uslijed sušenja može dovesti do lažnih rezultata osjetljivosti.

Pogledajte dokument **OPĆE UPUTSTVO ZA UPORABU** 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 do 8 °C u originalnom pakiranju do trenutka upotrebe. Pazite da ne dođe do smrzavanja i pregrijavanja. Ploče 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 do 8 °C.

## KORISNIČKA KONTROLA KVALITETE

Za korisničku kontrolu kvalitete potrebno je pogledati odgovarajuće standarde instituta CLSI<sup>10</sup> i povjerenstva EUCAST<sup>18</sup> ili nacionalne standarde, ako su primjenjivi. Inokulirajte reprezentativne uzorke sa sljedećim sojevima na podlozi (detalje potražite u **Vrstama uzoraka** i **Postupku ispitivanja**). Inkubirajte pločice, po mogućnosti u okrenutom položaju, u skladu s dolje navedenom temperaturom, vremenom i atmosferskim uvjetima. Pločice **BD Mueller Hinton II Agar** i antimikrobne diskove treba ispitivati barem dva puta tjedno kako biste provjerili rade li ispravno.

**Tablica 1:** očekivani rezultati za raspone promjera zona inhibicije sojeva za kontrolu kvalitete u skladu s tijelima CLSI<sup>19</sup> i EUCAST<sup>20</sup>

Soj	Antimikrobni agens	Raspon (mm)	Inkubacija
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <sup>1</sup>	Ampicilin (10 µg)	15-22	CLSI: 16 – 18 h, 35 ±2 °C
	Imipenem (10 µg)	26-32	
	Gentamicin (10 µg)	19-26	
	Amikacin (30 µg)	19-26	EUCAST: 16 – 20 h, 35 ±1 °C
	Ciprofloksacin (5 µg)	30-40	
	Trimetoprim-sulfametoksazol SXT (1,25 µg – 23,75 µg)	23-29	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 <sup>1</sup>	Amoksisicilin-klavulanska kiselina (30 µg)	17-22	CLSI: 16 – 18 h, 35 ±2 °C
	Ampicilin-sulbaktam (30 µg)	13-19	EUCAST: 16 – 20 h, 35 ±1 °C
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 <sup>2</sup>	Trimetoprim-sulfametoksazol (1,25 µg – 23,75 µg)	26-34	CLSI: 16 – 18 h, 35 ±2 °C
	Ciprofloksacin (5 µg)	19-25	EUCAST: 16 – 20 h, 35 ±1 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <sup>3</sup>	Tetraciklin (30 µg)	24-30	CLSI: 16 – 18 h, 35 ±2 °C
	Gentamicin (10 µg)	19-27	
	Eritromicin (15 µg)	22-30	
	Klindamicin (2 µg)	24-30	EUCAST: 16 – 20 h, 35 ±1 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 <sup>2</sup>	Tetraciklin (30 µg)	23-31	CLSI: 16 – 18 h, 35 ±2 °C
	Gentamicin (10 µg)	19-25	
	Eritromicin (15 µg)	23-29	
	Klindamicin (2 µg)	23-29	EUCAST: 16 – 20 h, 35 ±1 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 <sup>1</sup>	Aztreonam (30 µg)	23-29	CLSI: 16 – 18 h, 35 ±2 °C
	Amikacin (30 µg)	18-26	
	Gentamicin (10 µg)	17-23	
	Imipenem (10 µg)	20-28	EUCAST: 16 – 20 h, 35 ±1 °C
neinokulirani	bezbojan do svijetložut		

<sup>1</sup>: rezultati za sojeve za kontrolu kvalitete u skladu s institutom CLSI i povjerenstvom EUCAST

<sup>2</sup>: rezultati za sojeve za kontrolu kvalitete u skladu s povjerenstvom EUCAST

<sup>3</sup>: rezultati za sojeve za kontrolu kvalitete u skladu s institutom CLSI

## POSTUPAK

### Priloženi materijal

**BD Mueller Hinton II Agar** (isporučuje se u više različitih formata pločica; pogledajte **Pakiranje/Dostupnost**). Mikrobiološki kontrolirano.

## Materijal koji nije priložen

1. Prema CLSI-ju: bujon za inokulum u epruveti, kao što je **BD Trypticase™ Soy Broth** (sojin bujon BD Trypticase) (bujon kao proizvod digestije sojinog kazeina) ili bujon Mueller Hinton II (s podešenim kationima) za pripremu standardnog inokuluma i sterilni bujon ili fiziološka otopina za razrjeđivanje inokuluma.<sup>7</sup>  
Prema EUCAST-u: 0,9-postotna fiziološka otopina (količine od 5 mL) za pripremu standardnog inokuluma.<sup>8</sup>
2. Standard usporedbe barijevog sulfata (od 0,5 mL sastojka 0,048 M BaCl<sub>2</sub> [1,175 % t/v BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O] do 99,5 mL sastojka 0,18 M [0,36 N] H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [1 % v/v]) ili
3. Fotometrički uređaj za podešavanje zamućenosti suspenzije inokuluma da odgovara McFarland standardu 0,5.
4. Kao alternativa gore navedenim materijalima (1 – 3), može se upotrijebiti inokulacijski sustav **BD Prompt™ Inoculation System** (volumetrijski uređaj za pripremu inokuluma).<sup>7, 8, 25</sup>
5. Kontrolne kulture prema CLSI-ju: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.<sup>10</sup>  
Kontrolne kulture prema EUCAST-u: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 i ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i ATCC 51299, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 i *Staphylococcus aureus* NCTC 12493.<sup>18</sup>
6. Papirnati diskovi impregnirani s točno određenim količinama antimikrobnih agensa,<sup>7, 8</sup> kao što su diskovi za ispitivanje **BD Sensi-Disc™**.
7. Uređaj za doziranje, kao što je dozator **BD Sensi-Disc** sa 6, 8 ili 12 mjesta. Pogodan dozator također je dostupan za četverokutne pločice agara Mueller Hinton II.
8. Ravnalo ili drugo pomagalo za mjerenje veličine zone u milimetrima.
9. Dodatne hranjive podloge, reagensi i laboratorijska oprema prema potrebi.

## Vrste uzoraka

Ovaj proizvod koristi se za ispitivanje osjetljivosti čistih kultura koje su izolirane iz kliničkih uzoraka (pogledajte i **KARAKTERISTIKE SVOJSTAVA I OGRANIČENJA POSTUPKA**). Predloženo je da se može izvoditi izravno ispitivanje antimikrobne osjetljivosti na krvnim i mokraćnim kulturama; međutim, ispitivanja treba ponoviti i potvrditi s čistim kulturama.<sup>21-24</sup>

## Postupak ispitivanja

Ova metodologija opisuje metodu izravne suspenzije kolonije u skladu s preporukama instituta CLSI<sup>7</sup> i povjerenstva EUCAST<sup>8</sup>:

1. Osigurajte čistu, svježju (tj. onu koja je odležala preko noći) kulturu iz neselektivne podloge poput krvnog agara.  
Prema CLSI-ju: za rutinska ispitivanja osjetljivosti inokulum se može pripremiti kao izravna suspenzija fiziološke ili bujonske otopine kolonija.  
Prema EUCAST-u: za rutinska ispitivanja osjetljivosti inokulum se može pripremiti kao izravna suspenzija fiziološke otopine nekoliko morfološki sličnih kolonija.
2. Suspenziju morate odmah podesiti na zamućenost od 0,5 McFarlandovih standarda barijevog sulfata bez inkubacije. Zamućenost standarda i inokuluma koji se ispituje treba usporediti držeći obje epruvete ispred bijele podloge s gusto iscrtanim crnim linijama ili možete koristiti fotometrički uređaj.
3. Alternativne metode pripreme inokuluma koje dopuštaju izravnu standardizaciju inokuluma bez podešavanja zamućenosti, kao što je inokulacijski sustav **BD Prompt Inoculation System**, smiju se koristiti za rutinska ispitivanja.<sup>25</sup>
4. Inokulum je najbolje upotrijebiti u roku od 15 minuta. Suspenzija se mora upotrijebiti u roku od 60 minuta nakon pripreme. Umočite sterilni štapić s vatom u pravilno razrijeđeni inokulum i okrenite ga nekoliko puta pritišćući ga o unutarnju stijenku epruvete da biste iscijedili višak tekućine i izbjegli pretjeranu inokulaciju.

5. Inokulirajte cijelu površinu pločice agara tri puta, zakrećući pločicu za 60° između razmazivanja kako biste postigli ravnomjernu inokulaciju.
6. Prema CLSI-ju: poklopac možete ostaviti otvoren 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 protumikrobnim agensom. Disk postavite pomoću dozatora protumikrobnih diskova uz aseptične mjere opreza. Diskove postavite tako da su im središta međusobno udaljena najmanje 24 mm.  
Prema EUCAST-u: diskove primijenite na posušenu ploču u roku od 15 minuta nakon inokulacije uz aseptične mjere opreza. Na ploču postavite najviše šest diskova.
7. Nakon što diskove postavite na agar, pritisnite ih sterilnom iglom ili pincetom radi potpunog kontakta s površinom podloge. Ovaj korak nije potreban ako se diskovi postavljaju pomoću dozatora **BD Sensi-Disc** sa samopopunjavanjem.
8. U roku od 15 minuta nakon postavljanja diskova okrenite pločice i stavite ih u inkubator. Pločice treba inkubirati pod povećanom koncentracijom ugljičnog dioksida. Preporučene uvjete inkubacije potražite u dokumentima CLSI-ja i EUCAST-a.<sup>7, 8, 10, 11</sup>

### Očitavanje rezultata

1. Nakon inkubacije morao bi biti vidljiv rast „polja” koje se slijeva u jednu točku. Ako rastu samo izolirane kolonije, inokulum je bio prelagan i treba ponoviti ispitivanje.
2. Prema CLSI-ju: 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 dnu okrenute pločice iznad crne nereflektirajuće pozadine, osvijetljeno s gornje strane.<sup>7</sup>  
Prema EUCAST-u: izmjerite promjer zona potpune inhibicije (kako je vidljivo golim okom), uključujući promjer diska, do najbližeg cijelog milimetra služeći se pomičnim kutnikom ili ravnalom. Pomagalo za mjerenje drži se na dnu okrenute pločice iznad crne nereflektirajuće pozadine, osvijetljeno reflektirajućim svjetlom. Pločicu držite oko 30 cm od očiju.<sup>8</sup>
3. 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.
4. Prema CLSI-ju: *Staphylococcus aureus* prilikom ispitivanja s diskovima oksacilina izuzetak je, kao i enterokoki kod ispitivanja s vankomicinom. U tim slučajevima transmisivska svjetlost treba se koristiti za otkrivanje zamagljenosti oko diska što je prikazano „potajno rezistentnim” MRSA sojevima ili vankomicin-rezistentnim enterokokima.<sup>7, 26</sup> Kod vrsta *Proteus*, ako je zona inhibicije dovoljno izražena za mjerenje, zanemarite bilo kakvo množenje unutar zone. S trimetoprimom i sulfonamidima antagonisti 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.  
Prema EUCAST-u: u slučaju dvostrukih zona potrebno je izmjeriti unutarnju zonu osim ako nije drugačije navedeno.<sup>8</sup>

### Računanje i interpretacija rezultata

#### Prema CLSI-ju:

promjeri zone koji se izmjere oko diskova trebaju se usporediti s onima u tablicama od 2A do 2D u CLSI dokumentu M100 (M2).<sup>10</sup> Rezultati sa specifičnim organizmima mogu biti prikazani kao rezistentni, umjereno osjetljivi ili osjetljivi.

#### Prema EUCAST-u:

promjere zona tumačite u odnosu na tablice graničnih vrijednosti.<sup>11</sup> Rezultati dobiveni sa specifičnim organizmima mogu se prikazati kao rezistentni ili osjetljivi. Za dodatne informacije o specifičnim obilježjima rasta, tumačenju i ostalim dokumentima s uputama pogledajte EUCAST.

## KARAKTERISTIKE SVOJSTAVA I OGRANIČENJA POSTUPKA

Agar Mueller Hinton standardna je podloga koja se koristi za ispitivanje osjetljivosti brzorastućih aerobnih ili fakultativno anaerobnih bakterija, kao što su stafilokoki, enterokoki, članovi skupine *Enterobacteriaceae* i aerobni gram-negativni štapići (npr. *Pseudomonas* spp). Dokumenti sa smjernicama za tumačenje osjetljivosti ažuriraju se svake godine, a za pravilno tumačenje dobivenih rezultata potrebno pogledati najnoviju verziju.<sup>10, 11</sup> Različiti postupci i ostale podloge i uvjeti razvijeni su za ispitivanje zahtjevnih vrsta, tj. *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp. i *Streptococcus pneumoniae* i streptokoka.

Standardizirani CLSI i EUCAST postupak ne primjenjuje se za ispitivanje obligatnih anaerobnih organizama, organizama koji pokazuju slab ili spori rast na agaru Mueller Hinton ili organizama koji pokazuju vidljive varijacije između sojeva u odnosu na rast.<sup>7, 8</sup> Zahtjevni organizmi (npr. *Haemophilus influenzae*) trebaju se ispitivati prema uputama tijela CLSI i EUCAST.<sup>7, 8</sup>

### Interna analiza učinkovitosti

Učinkovitost agara **BD Mueller Hinton II Agar** (svi formati pločica) interno je procijenjena preporučenim sojevima za kontrolu kvalitete uključujući one s okarakteriziranim mehanizmima rezistentnosti (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Staphylococcus aureus* NCTC 12493, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 s amoksicilin-klavulanskom kiselinom AMC-3).<sup>19, 20, 34</sup>

U tablici 2 sažeto su prikazani potvrđeni antimikrobni agensi za sojeve za kontrolu kvalitete i sojevi s okarakteriziranim mehanizmima rezistentnosti. Osim ako nije drugačije navedeno, utvrđeni promjeri zona inhibicije za potvrđene antimikrobne agense bili su u granicama promjera koje određuju CLSI i EUCAST.<sup>19, 20</sup>

Dodatna ispitivanja učinkovitosti pomoću izolata MRSA u kojima se nalazila vrsta rezistentna na *mecC* pokazala su da agar **BD Mueller Hinton II Agar** precizno otkriva *mecC*-pozitivne sojeve MRSA-e.<sup>34, 35</sup>

**Tablica 2:** pregled potvrđenih antimikrobnih agensa i sojeva za kontrolu kvalitete. Ako nije drugačije navedeno, promjeri zona inhibicije bili su u granicama koje određuje CLSI i/ili EUCAST.<sup>19,</sup>  
20

Antimikrobni agens	Sadržaj diska (µg)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 <sup>10, 18</sup>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 <sup>10, 18</sup>	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 <sup>10, 18</sup>	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 <sup>18</sup>	<i>E. coli</i> ATCC 35218 <sup>10, 18</sup>	<i>S. aureus</i> NCTC 12493 <sup>18</sup>	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 <sup>10, 18</sup>	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 <sup>18</sup>
Amikacin	AN-30	✓	✓		✓				
Amoksisilin-klavulanska kiselina	AMC-3				✓				
	AMC-30	✓				5			
Ampicilin	AM-2			3	✓				
	AM-10	✓							
Ampicilin-sulbaktam	SAM-20	✓				✓			
Aztreonam	ATM-30	✓	✓					✓	
Penicilin G	P-1				✓				
Cefadroksil	CFR-30	✓ <sup>1</sup>							
Cefaleksin	CN-30	✓ <sup>1</sup>							
Cefepim	FEP-30	✓	✓						
Cefiksim	CFM-5	✓							
Cefotaksim	CTX-5	✓ <sup>2</sup>						✓ <sup>2</sup>	
Cefoksitin	FOX-30	✓			✓		✓		
Cefpodoksim	CPD-10	✓						✓	
Ceftarolin	CPT-5	✓ <sup>2</sup>			✓				
Ceftazidim	CAZ-10	✓ <sup>2</sup>	✓ <sup>2</sup>					✓ <sup>2</sup>	
Ceftibuten	CFT-30	✓							
Ceftriakson	CRO-30	✓						✓	
Cefuroksim	CXM-30	✓							
Kloramfenikol	C-30	✓			✓				
Ciprofloksacin	CIP-5	✓	✓	✓	✓				
Klindamicin	CC-2				✓				
Doripenem	DOR-10	✓	✓						
Ertapenem	ETP-10	✓							
Eritromicin	E-15				✓				
Fusidinska kiselina	FA-10				✓				
Gentamicin	GM-10	✓	✓		✓				
	GM-30			✓					✓
Imipenem	IPM-10	✓	✓	✓					
Levofloksacin	LVX-5	✓	✓	✓	✓				
Linezolid	LZD-10			✓	✓				
Mecilinam	MEC-10	✓							
Meropenem	MEM-10	✓	✓						
Minociklin	MI-30				✓				
Moksifloksacin	MXF-5	✓			✓				
Mupirocin	MUP-200				✓				
Nalidiksična kiselina	NA-30	✓							

**Tablica 2:** nastavak.

Antimikrobni agens	Sadržaj diska (µg)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 <sup>10, 18</sup>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 <sup>10, 18</sup>	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 <sup>10, 18</sup>	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 <sup>18</sup>	<i>E. coli</i> ATCC 35218 <sup>10, 18</sup>	<i>S. aureus</i> NCTC 12493 <sup>18</sup>	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 <sup>10, 18</sup>	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 <sup>18</sup>
Netilmicin	NET-10	✓ <sup>2</sup>	✓ <sup>2</sup>		✓				
Nitrofurantoin	FM-100	✓ <sup>2</sup>		✓	✓				
Norfloksacin	NOR-10	✓		✓	✓				
Ofloksacin	OFX-5	✓			✓				
Pefloksacin	PEF-5	✓							
Piperacilin	PIP-30	✓ <sup>2</sup>							
Piperacilin-tazobaktam	PIP-30/TAZ-6	✓ <sup>2</sup>	✓ <sup>2</sup>			✓ <sup>2</sup>			
Kvinupristin-dalfopristin	SYN-15			✓	✓				
Rifampicin	RA-5				✓				
streptomycin	S-300			6					
Teikoplanin	TEC-30			✓					✓
Tetraciklin	TE-30				✓				
Tikarcilin	TIC-75	✓							
Tikarcilin-klavulanska kiselina	TIM-85	✓	✓			✓			
Tigeciklin	TGC-15	✓		✓	✓				
Tobramicin	NN-10	✓	✓		✓				
Trimetoprim	TMP-5	✓		✓	4				
Trimetoprim-sulfametoksazol	SXT1,25-23,75	✓		✓	✓				
Vankomicin	VA-5			✓					✓

✓ Navedene zone inhibicije nalaze se u granicama koje definiraju EUCAST i CLSI.

<sup>1</sup> CLSI ne preporučuje ispitivanje antimikrobnog agensa.

<sup>2</sup> CLSI i EUCAST ne preporučuju različite koncentracije antimikrobnog agensa. Primijenjene su preporuke EUCAST-a.

<sup>3</sup> Zona inhibicije antimikrobnog agensa nije u granicama koje preporučuje EUCAST (Mueller Hinton II Agar, 150 mm i četverokutni).

<sup>4</sup> Zona inhibicije antimikrobnog agensa nije u granicama koje preporučuje EUCAST (Mueller Hinton II Agar, 90 mm).

<sup>5</sup> Zona inhibicije antimikrobnog agensa nije u granicama koje preporučuju EUCAST i CLSI (Mueller Hinton II Agar, 90 mm).

<sup>6</sup> Zona inhibicije antimikrobnog agensa nije u granicama koje preporučuje CLSI (Mueller Hinton II Agar, 90 i 150 mm), ali je u granicama koje preporučuje EUCAST.

### Ograničenja postupka

Disk difuzijsko ispitivanje osjetljivosti namijenjeno je isključivo za upotrebu s čistim kulturama. Bojenje po Gramu i vjerojatna identifikacija izolata preporučuju se prije pripreme ispitivanja osjetljivosti.

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

Otkriveno je da različiti faktori utječu na disk difuzijsko ispitivanje osjetljivosti. Oni obuhvaćaju podlogu, dubinu agara, potentnost diska, koncentraciju inokuluma, starost inokuluma i pH vrijednost.<sup>31</sup>



Neprikladna koncentracija inokuluma može dovesti do netočnih rezultata. Zone inhibicije mogu biti premale ako je inokulum pretežak ili, ako je inokulum prelagan, mogu biti prevelike pa je mjerenje prekomplikirano. Stoga se preporučuje praćenje preporuka koje su izdali CLSI i EUCAST o rukovanju inokulumom i inokuliranim pločama radi smanjenja rizika od dobivanja netočnih rezultata uslijed nepravilnog postupanja. Nepravilno čuvanje antimikrobnih diskova može uzrokovati gubitak potentnosti i može dovesti do lažno osjetljivih rezultata. Preveliko skupljanje podloge uslijed nepravilnog čuvanja može dovesti do lažno osjetljivih rezultata. In vitro osjetljivost organizma na određeni antimikrobni agens ne znači nužno da je taj agens učinkovit in vivo. U odgovarajućim referencama potražite upute za tumačenje rezultata.<sup>10, 11, 32, 33</sup> Možda će se pojaviti bakterija za koju je potreban timin ili timidin.<sup>27, 28</sup> Takvi organizmi možda neće pokazati zadovoljavajući rast na agaru Mueller Hinton koji sadrži niske razine timina ili timidina.

Razvijeni su novi postupci koji koriste diskove s visokim udjelom gentamicina (120 mg) i streptomocina (300 mg) za otkrivanje visoke rezistentnosti na aminoglikozide kao indicaciju da enterokokni izolati neće biti sinergistički pod utjecajem kombinacije penicilina ili glikopeptida uz aminoglikozid.<sup>7, 28, 29</sup>

Za potpuno objašnjenje otkrivanja bakterije MRSA, rezistentnih enterokoka, gram-negativnih bacila proširenog spektra koji stvaraju beta-laktamazu i ostalih ograničenja ispitivanja pogledajte CLSI dokumente M2 i M7 te EUCAST.<sup>7, 8, 10, 11, 30</sup>

Agar Mueller Hinton II pokazao se kao pouzdan u otkrivanju MRSA koje stvaraju zamagljenu zonu inhibicije oko diskova s oksacilinom.<sup>26</sup> U slučaju nedoumice treba koristiti dodatnu metodu, primjerice **BD Oxacillin Screen Agar**.

Metoda inokulacije, interpretacija, preporuke i granice zona koji se navode u ovom dokumentu i koje preporučuju CLSI i EUCAST mogu se razlikovati od nacionalnih standarda.<sup>7, 8, 31</sup>

## REFERENCE

1. Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
2. Matuschek, E., D.F. Brown, and G. Kahlmeter. 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.
3. Ryan, K.J., F.D. Schoenknecht, and W.M.M. Kirby. 1970. Disc sensitivity testing. *Hospital Practice* 5:91-100.
4. Barry, A.L., F. Garcia, and L.D. Thrupp. 1970. An improved single-disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly-growing pathogens. *Am. J. Clin. Pathol.* 53:149-158.
5. Mueller, J.H., and J. Hinton. 1941. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 48:330-333.
6. Ericsson, H.M., and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B, Suppl.* 217.
7. CLSI. Approved standard: M02-A12 - Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA. *Search for latest version at [www.clsi.org](http://www.clsi.org).*
8. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Search for latest version at <http://www.eucast.org>.*
9. 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.C. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
10. CLSI - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. *Search for latest version at [www.clsi.org](http://www.clsi.org).*
11. 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>.*
12. Thornsberry, C., T.L. Gavan, and E.H. Gerlach. 1977. Cumitech 6, New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Coordinating ed., J.C. Sherris. American Society of Microbiology, Washington, DC.

13. Koch, A.E., and J.J. Burchall. 1971. Reversal of the antimicrobial activity of trimethoprim by thymidine in commercially prepared media. *Appl. Microbiol.* 22:812-817.
14. Ferone, R., S.R.M. Bushby, J.J. Burchall, W.D. Moore, and D. Smith. 1975. 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.* 7:91-98.
15. Reller, L.G., F.D. Schoenknecht, M.A. Kenny, and J.C. Sherris. 1974. Antibiotic susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*: selection of a control strain and criteria for magnesium and calcium content in media. *J. Infect. Dis.* 130:454-463.
16. Pollock, H.M., B.H. Minshew, M.A. Kenny, and F.D. Schoenknecht. 1978. Effect of different lots of Mueller-Hinton Agar on the interpretation of the gentamicin susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14:360-367.
17. D'Amato, R.F., and C. Thornsberry. 1979. Calcium and magnesium in Mueller-Hinton agar and their influence on disk diffusion susceptibility results. *Current Microbiol.* 2:135-138.
18. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. *Search for latest version at <http://www.eucast.org>.*
19. 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>.*
20. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26<sup>th</sup> ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
21. Wegner, D.L., C.R. Mathis, and T.R. Neblett. 1976. Direct method to determine the antibiotic susceptibility of rapidly growing blood pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9:861-862.
22. Johnson, J.E., and J.A. Washington II. 1976. Comparison of direct and standardized antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10:211-214.
23. Waterworth, P.M., and M. Del Piano. 1976. Dependability of sensitivity tests in primary culture. *J. Clin. Pathol.* 29:179-184.
24. Hollick, G.E., and J.A. Washington II. 1976. Comparison of direct and standardized disk diffusion susceptibility testing of urine cultures. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9:804-809.
25. 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.
26. Hindler, J.A., and C.B. Anderbied. 1985. Effect of the source of Mueller-Hinton agar and resistance frequency on the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 21:205-210.
27. Maskell, R., O.A. Okubadejo, R.H. Payne, and L. Pead. 1977. Human infections with thymine-requiring bacteria. *J. Med. Microbiol.* 11:33-45.
28. Haltiner, R.C., P.C. Migneault, and R.G. Robertson. 1980. Incidence of thymidine-dependent enterococci detected on Mueller-Hinton agar with low thymidine content. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18:365-368.
29. Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:46-65.
30. CLSI. Approved standard: M7. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI, Wayne, PA, USA. *Search for latest version at [www.clsi.org](http://www.clsi.org).*
31. Jorgensen, J.H., and J.D. Turnidge. 2003. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.*
32. Washington, J.A., and G.L. Woods. 1995. Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. P. 1327-1341. *In Muarry, P.R., Baron, E.J., Tenover, M.A., Tenover, F.C., and Tenover, R.H. (ed.), Manual of clinical microbiology, 6<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995.*

33. Neumann, M.A., D.F. Sahn, C. Thornsberry, J.E. McGowan, 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.
34. Data on file. Becton Dickinson.
35. Skov, R., A.R. Larsen, A. Kearns, M. Holmes, C. Teale, G. Edwards, and R. Hill. Phenotypic detection of *mecC*-MRSA: cefoxitin is more reliable than oxacillin. 2014. J. Antimicrob. Chemother. 69:133-135.

## **AMBALAŽA/DOSTUPNOST**

### **BD Mueller Hinton II Agar (Stacker 90 mm plates; (pločice) [Standardna veličina])**

Kat. br. 254032 pločaste podloge spremne za upotrebu, 20 pločica  
Kat. br. 254081 pločaste podloge spremne za upotrebu, 120 pločica

### **BD Mueller Hinton II Agar (150 mm)**

Kat. br. 254062 pločaste podloge spremne za upotrebu, 20 pločica

### **BD Mueller Hinton II Agar, Square (četverokutni) (120x120 mm)**

Kat. br. 254518 pločaste podloge spremne za upotrebu, 20 pločica

## **DODATNE INFORMACIJE**

Dodatne informacije zatražite od lokalnog predstavnika tvrtke BD.



### **Becton Dickinson GmbH**

Tullastrasse 8–12  
69126 Heidelberg/Germany  
Telefon: +49-62 21-30 50 Telefaks: +49-62 21-30 52 16  
Reception\_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>

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

Zaštitni znakovi vlasništvo su njihovih odgovarajućih vlasnika.

© 2017. BD. BD, logotip BD i svi drugi zaštitni znakovi u vlasništvu su tvrtke Becton, Dickinson and Company.