



www.thermofisher.com

## Mueller-Hinton Agar with Horse Blood

REF PB1229A

### Intended Use

Mueller-Hinton Agar with Horse Blood is an antimicrobial susceptibility agar recommended for disc diffusion and MIC testing against fastidious microorganisms isolated from clinical samples.

The device is for professional use only, is not automated, nor is it a companion diagnostic.

### Summary and Explanation

Streptococci are Gram-positive cocci which inhabit a wide range of ecological niches, from non-pathogenic species used in the yoghurt making industry, to commensal members of the mammal oral microbiome, and invasive human pathogens<sup>1,2,3</sup> (Patterson 1996; Dion and Ashurst. 2020; Public Health England 2014a). Streptococci can be classified by serotyping based on cell-wall carbohydrate composition into the Lancefield groups A to S, and the non-Lancefield Streptococci<sup>1,2,3</sup> (Patterson 1996; Dion and Ashurst. 2020; Public Health England 2014a). Non-Lancefield Streptococci cannot be grouped by Lancefield serotyping, and include a broad range of non-pathogenic and pathogenic species with *S. pneumoniae* thought to be the most significant human pathogen<sup>1,2,3</sup> (Patterson 1996; Dion and Ashurst. 2020; Public Health England 2014a).

*S. pneumoniae* is thought to reside normally as part of human upper respiratory tract flora; but risk factors such as microbiome dysbiosis or immunosuppression allow *S. pneumoniae* to predominate and cause pneumococcal disease<sup>3,4</sup> (Public Health England 2014a; 2019). Pneumococcal disease covers a spectrum of conditions, from acute infections of the otitis media, to invasive diseases such as meningitis and pneumonia<sup>5,6,7,8</sup>. As such, there is considerable morbidity and mortality associated with *S. pneumoniae* infections<sup>1,2</sup>.

*H. influenzae* is a Gram-negative coccobacillus which can be categorised as either a non-typable unencapsulated isolate (NTHi), or as one of six antigenically distinct capsular types<sup>9,10</sup>. Prior to the implementation of the serotype B (Hib) vaccine, Hib was the most pathogenic *H. influenzae* serotype<sup>11</sup>. However, it is now thought that all *H. influenzae* serotypes, and non-typable isolates, can cause severe disease in humans<sup>9,10,11</sup>.

### Principle of Method

Mueller-Hinton Agar has been criticised because of variation in performance between manufacturers and batches of medium. These effects were shown as:

- (1) Minimum inhibitory concentration (MIC) variations with aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa* and tetracycline against *Staphylococci*. This may have been due to differing concentrations of the divalent cations of calcium and magnesium.
- (2) Variation in thymine and thymidine content, which affect sulphonamide and trimethoprim MIC values
- (3) Differences in the characteristics of the agar used in the medium, especially diffusion properties

In light of the criticisms the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (previously NCCLS) called interested manufacturers together to discuss the standardisation and stabilisation of Mueller-Hinton Agar. Control methods were established whereby critical antimicrobial/organism combinations had to yield consistent zones of inhibition within two mm of the specified diameters in the standard. The result of this cooperative effort is that Mueller-Hinton Agar is now a standard medium.

Unsupplemented Mueller-Hinton Agar is recommended both by CLSI and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) for testing non-fastidious strains. Supplements are added to make it suitable for more fastidious strains.

### Typical Formula

	g/L
Beef, dehydrated infusion from	300.0
Casein hydrolysate	17.5
Starch	1.5
Agar	17.0
Defibrinated Horse Blood	50.0ml
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	20.0mg

\* Adjusted as required to meet performance standards

### Physical Appearance

Colour	Red
Clarity	Opaque
Fill weight	26.0 ± 0.5g
pH	7.3 ± 0.1

### Materials Provided

PO1229A: 10 x 90mm Mueller-Hinton agar with horse blood plates

Each plate should only be used once.

### Materials Required but Not Supplied

- 1) Inoculating loops
- 2) Swabs
- 3) Collection containers
- 4) Incubator
- 5) Quality control organisms

### Storage

- Store product in its original packaging at 2-10°C until used.
- The product may be used until the expiry date stated on the label.
- Store away from light.
- Allow product to equilibrate to room temperature before use.
- Do not incubate prior to use.

### Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use only.
- For professional use only.
- Inspect the product packaging before first use
- Do not use the product if there is any visible damage to the packaging or plates.
- Do not use the product beyond the stated expiry date.
- Do not use the device if signs of contamination are present.
- Do not use the device if the colour has changed or there are other signs of deterioration.
- It is the responsibility of each laboratory to manage waste produced according to their nature and degree of hazard and to have them

treated or disposed of in accordance with any federal, state and local applicable regulations. Directions should be read and followed carefully. This includes the disposal of used or unused reagents as well as any other contaminated disposable material following procedures for infectious or potentially infectious products.

Refer to the Material Safety Data Sheet (MSDS) for safe handling and disposal of the product ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

### Serious Incidents

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the relevant regulatory authority in which the user and/or the patient is established.

### Specimen Collection, Handling and Storage

Specimens should be collected and handled following local recommended guidelines, such as the CLSI standard M100. These guidelines include references to the appropriate techniques for collection, collection containers, and the optimal transport and storage conditions to be used to avoid contamination.

### Procedure

Allow plates and antimicrobial susceptibility disks to equilibrate to room temperature before use. The agar surface should not have excess moisture prior to inoculation.

Inoculum may be prepared utilizing either the growth method or the direct colony method. Refer to appropriate DIN/CLSI documents for guidelines specific to each test organism.

#### CLSI Method:

1. Growth method:
  - a. Select at least 3-5 isolated colonies of the same morphology type from the agar culture. Touch the top of each colony with a loop and transfer to 4-5ml of a suitable broth medium such as Tryptic Soy Broth (TSB)
  - b. Incubate the broth culture at 35-37°C until the turbidity equals or exceeds that of a 0.5 McFarland or equivalent.
  - c. If necessary, adjust the turbidity of the suspension with sterile saline or broth to achieve a turbidity to achieve a turbidity to a 0.5 McFarland standard. This step may be performed visually or using a photometric device. If performed visually use adequate light to compare the suspension to the McFarland 0.5 against a card with a white background and contrasting black lines<sup>5</sup>.
2. Direct Colony Method: (Method of choice for streptococci and staphylococci).
  - a. Prepare a direct suspension of the test organism in saline or broth from an 18-24 hour culture on nonselective media.
  - b. Adjust the turbidity of the suspension as described under Growth method.
3. Inoculate Agar plates within 15 minutes of preparing organism suspension.
4. Immerse a sterile swab into the suspension. Rotate the swab against the side of the tube above the fluid level to remove excess fluid.
5. Inoculate the surface in three planes by rotating the plate approximately 60 degrees each time.
6. Replace the lid and allow the plate to rest on the bench at least 3 minutes but no longer than 15 minutes for

the inoculum to be absorbed before applying antimicrobial susceptibility disks.

7. Apply disks individually or by using an antimicrobial disk dispenser. Disk should not be closer than 24 mm from centre to centre and not placed too close to the edge of the plate. Because some drug diffuses almost instantaneously, do not relocate a disk once it has come in contact with the agar surface. Tap disks gently with sterile needle or forceps to ensure complete contact with the agar surface.
8. Invert the plate and place in the incubator within 15 minutes of disk application.
  - a. Incubate Mueller-Hinton Agar with Sheep Blood plates aerobically at 35-37°C for 16-18 hours.
 

**Note:** Staphylococci and enterococci require a full 24 hours incubation. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) may not be detected at incubation temperatures above 35°C.
  - b. Incubate *Streptococcus* spp. in 5-7% CO<sub>2</sub> at 35-37°C for 20-24 hours.
  - c. Refer to CLSI document M45 for incubation times, temperatures, and atmospheres for fastidious or infrequently isolated bacteria<sup>19</sup>.

### Interpretation

After 16-24 hours incubation at 35-37°C, *S. pneumoniae* typically exhibit 1-2 mm colonies and exhibit α-haemolysis on blood agar<sup>3</sup>. *S. pneumoniae* can also appear as draughtsman colonies with a depressed centre and elevated rim<sup>3</sup>.

After 24 hours incubation on chocolate agar, *H. influenzae* typically exhibit small, round and convex colonies which may be iridescent.

### Quality Control

It is the responsibility of the user to perform Quality Control testing taking into account the intended use of the medium, and in accordance with any local applicable regulations (frequency, number of strains, incubation temperature etc.).

The performance of this medium can be verified by testing the following reference strains.

Incubation Conditions: 16 – 20 h @ 35° ± 1°C in 4-6% carbon dioxide

Microorganism	Antibiotic	Zone of Inhibition Diameter (mm)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC®49619	Erythromycin (E15)	26-32
	Cefpodoxime (CPD10)	29-35
	Ertapenem (ETP 10)	28-34
	Moxifloxacin (MXF 5)	24-30
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC®49766	Erythromycin (E15)	10-16
	Cefpodoxime (CPD 10)	30-36
	Moxifloxacin (MXF 5)	30-36

### Limitations

Organisms with atypical enzyme patterns may give anomalous reactions on Mueller-Hinton Agar with Horse Blood.

## Performance Characteristics




Accuracy has been demonstrated through review of the QC data. Correct detection of fastidious microorganisms is confirmed by the inclusion of a well-characterised isolate in the QC processes performed as part of the manufacture of each batch of the device. The precision of Mueller-Hinton Agar with Horse Blood (PB1229A) was demonstrated by an overall pass rate of 95.84% obtained for the product over 12 years of testing (2011-2021; 892 batches).














The devices are tested in-house as part of the QC process. The inoculum is prepared from working cultures, diluted to obtain the specified inoculum levels and the test media is inoculated. Antibiotic discs are loaded in the same order and concentrations as they appear in the inspection plan for the medium. Following incubation at 34-36°C for 16-20 hours in 4-6% CO<sub>2</sub>, the zone of inhibition diameter of the test organisms is measured, and the results and conclusions can be created.

## Bibliography


1. Patterson, Maria Jevitz. 1996. "Streptococcus." In Medical Microbiology. 4th Edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
2. Dion, Christopher F., and John V. Ashurst. 2020. "Streptococcus Pneumoniae." In StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
3. Public Health England. 2014a. "Identification of Streptococcus Species, Enterococcus Species and Morphologically Similar Organisms." UK Standards for Microbiology Investigations.
4. Public Health England. 2019. "Statutory Notification by Registered Medical Practitioners of All Hazards: Infections, Chemicals & Radiation."
5. Public Health England. 2014b. "Investigation of Ear Infections and Associated Specimens." UK Standards for Microbiology Investigations.
6. National Institute for Health and Care Excellence. 2019b. "Fever in under 5s: Assessment and Initial Management."
7. National Institute for Health and Care Excellence. 2010. "Meningitis (Bacterial) and Meningococcal Septicaemia in under 16s: Recognition, Diagnosis and Management."
8. National Institute for Health and Care Excellence. 2016. "SepsiTest Assay for Rapidly Identifying Bloodstream Bacteria and Fungi."
9. Khattak, Zoia E., and Fatima Anjum. 2021. Haemophilus Influenzae. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
10. Musher, Daniel M. 1996. "Haemophilus Species." In Medical Microbiology. 4th Edition., edited by S Baron, 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
11. Public Health England. 2021. "Identification of Haemophilus Species and the HACEK Group of Organisms." UK Standards for Microbiology Investigations.

## Symbol Legend

Symbol/Label	Meaning
	Manufacturer
	In Vitro Diagnostic Medical Device
	Temperature limit

	Batch Code
	Keep away from sunlight
	Catalogue Number
	Do not re-use
	Consult instructions for use or consult electronic instructions for use
	Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date
	Do not use if package is damaged and Consult instructions for use
	Authorized representative in the European Community/ European Union
	Unique device identifier
	USA: Caution: Federal law restricts this device to sale by or on order of a Physician
	European Conformity Mark
	UK Conformity Mark

©2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. ATCC and ATCC catalogue marks are a trademark of American Type Culture Collection. CLSI is a trademark of the Clinical Laboratory and Standards Institute. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

 Oxoid Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, England



For technical assistance please contact your local distributor.

## Revision Information

Version	Modifications introduced
1.0	2022-11-02. New document



www.thermofisher.com

## Mueller-Hinton Agar with Horse Blood

REF PB1229A

### Sihtotstarve

Toode Mueller-Hinton Agar with Horse Blood on antimikroobse vastuvõtlikkusega agar, mida soovitatakse plaadi difusiooni ja MIC testimiseks kliinilistest proovidest eraldatud nõudlike mikroorganismide vastu.

Toode on mõeldud ainult professionaalseks kasutamiseks, ei ole automatiseeritud ega ole ette nähtud kasutamiseks diagnostilise abivahendina.

### Kokkuvõte ja selgitus

Streptokokid on grampositiivsed kokid, mis asuvad paljudes ökoloogilistes niššides, alates jogurtitööstuses kasutatavatest mittepatoogeensetest liikidest kuni imetajate suuõõne mikrobiomi kommensaalsete liikmete ja invasiivsete inimese patogeeniideni.<sup>1,2,3</sup> (Patterson 1996; Dion ja Ashurst. 2020; Public Health England 2014a). Streptokokid võib rakuseina süsivesikute koostise alusel klassifitseerida serotüpiseerimise teel Lancefieldi rühmadesse A kuni S ja mitte-Lancefieldi streptokokidesse.<sup>1,2,3</sup> (Patterson 1996; Dion and Ashurst. 2020; Public Health England 2014a). Mitte-Lancefieldi streptokokke ei saa rühmitada Lancefieldi serotüpiseerimise alusel ning need hõlmavad laias valikus mittepatoogeenseid ja patogeenseid liike, mille puhul arvatakse, et *S. pneumoniae* on kõige olulisem inimese patogeeni.<sup>1,2,3</sup> (Patterson 1996; Dion ja Ashurst. 2020; Public Health England 2014a).

Arvatakse, et *S. pneumoniae* elab tavaliselt inimese ülemiste hingamisteede floora osana; kuid riskifaktorid nagu mikrobiomi düsbioos või immunosupressioon võimaldavad *S. pneumoniae*'l domineerida ja põhjustada pneumokoki haigust<sup>3,4</sup> (Public Health England 2014a; 2019). Pneumokokkahaigus hõlmab mitmesuguseid haigusseisundeid, alates ägedast keskkõrvapõletikust kuni invasiivsete haigusteni, nagu meningiit ja kopsupõletik.<sup>5,6,7,8</sup> Sellisena on *S. pneumoniae* infektsioonidega seotud märkimisväärne haigestumus ja suremus<sup>1,2</sup>.

*H. influenzae* on gramnegatiivne coccobacillus, mida võib liigitada kas mittetüüpivaks kapseldamata isolaadiks (non-typable unencapsulated isolate, NTHi) või üheks kuuest antigeenselt erinevast kapslitüübist.<sup>9,10</sup> Enne serotüübi B (Hib) vaktsiini rakendamist oli Hib kõige patogeensem *H. influenzae* serotüüp<sup>11</sup>. Nüüd aga arvatakse, et kõik *H. influenzae*' serotüübid ja tüüpiseerimata isolaadid võivad inimestel põhjustada raskeid haigusi<sup>9,10,11</sup>

### Meetodi põhimõte

Mueller-Hinton agarit on kritiseeritud jõudluse erinevuste tõttu söötme tootjate ja partiide vahel. Neid mõjusid näidati järgmiselt:

- (1) Minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (minimum inhibitory concentration, MIC) varieerub aminoglükosiididega *Pseudomonas aeruginosa* suhtes ja tetratsükliin *Stafülokokkide* suhtes. See võis olla tingitud kaltsiumi ja magneesiumi kahevalentsete katioonide erinevatest kontsentratsioonidest.

- (2) Tümiini ja tümiidiini sisalduse kõikumine, mis mõjutab sulfoonamiidi ja trimetoprimi MIC-väärtusi
- (3) Keskkonnas kasutatava agari omaduste erinevused, eriti difusiooniomadused

Kriitika valguses kutsus kliiniliste ja laboratoorsete standardite instituut (Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI) (varem NCCLS) huvitatud tootjad kokku, et arutada Mueller-Hinton agari standardimist ja stabiliseerimist. Kehtestati kontrollimeetodid, mille kohaselt kriitilised antimikroobse/organismi kombinatsioonid pidid andma ühtlased inhibeerimistsoonid kahe mm täpsusega standardis määratud läbimõõdust. Selle koostöö tulemusena on Mueller-Hintoni agar nüüd standardne keskkond.

Täiendamata toodet Mueller-Hinton Agar soovitab nii CLSI kui ka Euroopa antimikroobse vastuvõtlikkuse testimise komitee (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) mittereeglilike tüvede testimiseks. Lisatakse toidulisandeid, et see sobiks nõudlikumate tüvede jaoks.

### Tüüpiline valem

	g/l
Veiseliha, veetustatud infusioon alates	300.0
Kaseiini hüdrolysaat	17.5
Tärklis	1.5
Agar	17.0
Defibrineeritud hobuseveri	50,0 ml
Nikotiinamiidadeniindinukleotiid (NAD)	20,0 mg

\* Reguleeritud vastavalt nõuetele, et see vastaks jõudlusstandarditele

### Füüsiline väljumus

Värv	Punane
Selgus	Läbipaistmatu
Täitekaal	26,0 ± 0,5 g
pH	7.3 ± 0.1

### Kaasasolevad materjalid

PO1229A: 10 × 90 mm Mueller-Hintoni agar hobuseveri plaatidega

Iga plaati tohib kasutada ainult üks kord.

### Vajaminevad materjalid, mis ei kuulu komplekti

- 1) Inokulatsioonisilmused
- 2) Tampoonid
- 3) Kogumismahutid
- 4) Inkubaator
- 5) Kvaliteedikontrolli organismid

### Säilitamine

- Hoida toodet kuni kasutamiseni originaalpakendis temperatuuril 2–10 °C.
- Toodet võib kasutada kuni etiketil märgitud kõlblikkusaja lõpuni.
- Hoidke valguse eest kaitstult.
- Enne kasutamist laske tootel toatemperatuurini soojeneda.
- Ärge inkubeerige enne kasutamist.

### Hoiatused ja ettevaatusabinõud

- Ainult *in vitro* diagnostiliseks kasutamiseks.
- Ainult professionaalseks kasutamiseks.
- Enne esmakordset kasutamist kontrollige toote pakendit
- Ärge kasutage toodet, kui pakendil või plaatidel on nähtavaid kahjustusi.

- 6) Ärge kasutage toodet pärast märgitud kõlblikkusaja lõppu.
- 7) Ärge kasutage toodet, kui sellel on saastumise märke.
- 8) Ärge kasutage toodet, kui värv on muutunud või esineb muid riknemise märke.
- 9) Iga labor vastutab tekkivate jäätmete käitlemise eest nende laadi ja ohuastme kohaselt ning nende töötlemise või kõrvaldamise eest kehtivate riigi või kohalike eeskirjade järgi. Juhised tuleb hoolikalt läbi lugeda ja neid järgida. See hõlmab kasutatud või kasutamata reaktiivide ning muude saastunud ühekordsete materjalide kõrvaldamist pärast protseduure nakkusohlike või potentsiaalselt nakkusohlike toodetega.

Toote ohutu käitlemise ja kõrvaldamise kohta vaadake materjali ohutuskarti (Material Safety Data Sheet, MSDS) veebiaadressil ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

### Tõsised juhtumid

Igast tootega seoses toimunud tõsisest vahejuhtumist teatatakse tootjale ja asjaomasele reguleerivale asutusele, kus kasutaja ja/või patsient on registreeritud.

### Proovide kogumine, käitlemine ja säilitamine

Proove tuleb koguda ja käsitseda kohalike soovitatud suuniste kohaselt, nt CLSI standard M100. Need juhised sisaldavad viiteid sobivatele kogumistehnikatele, kogumiskonteineritele ning optimaalsetele transpordi- ja ladustamistingimustele, mida tuleb kasutada saastumise vältimiseks.

### Protseuur

Laske plaatidel ja antimikroobse vastuvõtlikkuse plaatidel enne kasutamist toatemperatuurini tasakaalustuda. Agari pinnal ei tohi enne inokuleerimist olla liigset niiskust. Inokulaadi võib valmistada kas kasvumeetodi või koloonia otsekülvi meetodi abil. Iga katseorganismi jaoks spetsiifiliste juhiste saamiseks vaadake vastavaid DIN/CLSI dokumente.

### CLSI meetod:

1. Kasvumeetod:
  - a. Valige agarikultuurist vähemalt 3–5 sama morfoloogiatüübiga isoleeritud kolooniat. Puudutage iga koloonia ülaosa silmusega ja kandke 4–5 ml sobivasse puljongisöötmesse, nagu Tryptic Soy Broth (TSB)
  - b. Inkubeerige puljongikultuuri temperatuuril 35–37 °C, kuni hägusus on võrdne 0,5 McFarlandi või samaväärse hägususega või ületab seda.
  - c. Vajaduse korral reguleerige suspensiooni hägusust steriilse soolalahuse või puljongiga, et saavutada hägusus, mis vastab 0,5 McFarlandi standardile. Seda sammu saab teha visuaalselt või fotomeetrilise seadme abil. Kui seda tehakse visuaalselt, kasutage piisavalt valgust, et võrrelda McFarland 0,5-le vastavat suspensiooni valge tausta ja kontrastsete mustade joontega kaardiga<sup>5</sup>.
2. Koloonia otsekülvi meetod: (Valikmeetod streptokokkide ja stafülokokkide jaoks).
  - a. Valmistage testitava organismi otsekülvi suspensioon soolalahuses või puljongis 18–24-tunnisest kultuurist mitteselektiivses söötmes.
  - b. Reguleerige suspensiooni hägusust, nagu on kirjeldatud jaotises Kasvumeetod.

3. Inokuleerige agariplaadid 15 minuti jooksul pärast organismi suspensiooni valmistamist.
4. Kastke steriilne tampoon suspensiooni. Liigse vedeliku eemaldamiseks pöörake tampooni vastu katsuti külge vedelikutasemest kõrgemal.
5. Inokuleerige pind kolmes tasapinnas, pöörates plaati iga kord umbes 60 kraadi.
6. Asetage kaas tagasi ja laske plaadil enne antimikroobse vastuvõtlikkuse plaatide paigaldamist alusel seista vähemalt 3 minutit, kuid mitte kauem kui 15 minutit, et inokulaat imenduks.
7. Paigaldage plaadid eraldi või antimikroobse plaadijaoturi abil. Plaat ei tohi olla keskosast keskosani lähemal kui 24 mm ja seda ei tohi asetada plaadi servale liiga lähedale. Kuna mõni ravim hajub peaaegu silmapilkselt, ärge paigutage plaati ümber, kui see on agari pinnaga kokku puutunud. Koputage plaate õrnalt steriilse nõela või tangidega, et tagada täielik kokkupuude agari pinnaga.
8. Pöörake plaat ümber ja asetage inkubaatorisse 15 minuti jooksul pärast plaadi pealekandmist.
  - a. Inkubeerige tootega Mueller-Hinton Agar with Sheep Blood 16–18 tundi aeroobselt temperatuuril 35–37 °C.  
**Märkus.** Stafülokokkide ja enterokokkide puhul on vaja 24-tunnist inkubeerimist. Metitsilliiniresistentseid stafülokokke (MRS) ei pruugita tuvastada inkubatsioonitemperatuuril, mis on üle 35 °C.
  - b. Inkubeerige *Streptococcus* spp.'d 5–7% CO<sub>2</sub>-s 20–24 tundi temperatuuril 35–37 °C.
  - c. Nõudlike või harva isoleeritud bakterite inkubatsiooniajad, temperatuurid ja atmosfäärid leiate CLSI dokumendist M45<sup>19</sup>.

### Tõlgendamine

Pärast 16–24-tunnist inkubeerimist temperatuuril 35–37 °C näitab *S. pneumoniae* tavaliselt 1–2 mm kolooniaid ja α-hemolüüsi vereagaril<sup>3</sup>. *S. pneumoniae*'d võivad esineda ka joonestajakolooniatena, millel on allasurutud keskpunkt ja kõrgem serv<sup>3</sup>.

Pärast 24-tunnist inkubeerimist šokolaadiagaril on H. influenza' tavaliselt väikesed, ümarad ja kumerad kolooniad, mis võivad sillerdada.

### Kvaliteedikontroll

Kasutaja vastutab kvaliteedikontrolli raames testimise eest, võttes arvesse söötme kavandatud kasutust, ja kohalike kehtivate eeskirjade järgi (sagedus, tüvede arv, inkubatsioonitemperatuur jne).

Selle söötme toimivust saab kontrollida, katsetades järgmist võrdlustüvesid.

Inkubatsioonitingimused: 16–20 tundi temperatuuril 35 ± 1 °C 4–6% süsinikdioksiidis

Mikroorganism	Antibiootikum	Inhibeerimisala läbimõõt (mm)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC®49619	Erütromütsiin (E15)	26-32
	Tsefpodoksiim (CPD10)	29-35
	Ertapeneem (ETP 10)	28-34
	Moksifloksatsiin (MXF 5)	24-30
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC®49766	Erütromütsiin (E15)	10-16
	Tsefpodoksiim (CPD 10)	30-36
	Moksifloksatsiin (MXF 5)	30-36

## Piirangud

Ebatüüpiliste ensüümustritega organismid võivad tootel Mueller-Hinton Agar with Horse Blood anda anomaalseid reaktsioone.

## Toimivusomadused



Täpsust on tõestatud kvaliteedikontrolli andmete läbivaatamisega. Kiire kasvuga mikroorganismide õiget tuvastamist kinnitab hästi iseloomustatud isolaadi kaasamine kvaliteedikontrolli protsessidesse, mis tehakse osana toote iga partii valmistamisest. Toote Mueller-Hinton Agar with Horse Blood (PB1229A) täpsust näitas toote 95,84% üldine läbimismäär 12 aastat kestnud testimise jooksul (2011–2021; 892 partiid).

Tooteid testitakse osana kvaliteedikontrolli protsessist asutusesiseselt. Inokulaat valmistatakse töökultuuridest, lahjendatakse kindlaksmääratud inokulaaditaseme saavutamiseks ja testkeskkond inokuleeritakse. Antibiootikumide plaadid laaditakse samas järjekorras ja kontsentratsioonides, nagu need on keskkonna kontrolliplaanis. Pärast 16–20 tundi inkubeerimist temperatuuril 34–36 °C 4–6% CO<sub>2</sub>-s mõõdetakse testorganismide inhibeerimise tsooni läbimõõt ning saab luua tulemusi ja järeldusi.

## Bibliograafia

1. Patterson, Maria Jevitz. 1996. "Streptococcus." In Medical Microbiology. 4th Edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
2. Dion, Christopher F., and John V. Ashurst. 2020. "Streptococcus Pneumoniae." In StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
3. Public Health England. 2014a. "Identification of Streptococcus Species, Enterococcus Species and Morphologically Similar Organisms." UK Standards for Microbiology Investigations.
4. Public Health England. 2019. "Statutory Notification by Registered Medical Practitioners of All Hazards: Infections, Chemicals & Radiation."
5. Public Health England. 2014b. "Investigation of Ear Infections and Associated Specimens." UK Standards for Microbiology Investigations.
6. National Institute for Health and Care Excellence. 2019b. "Fever in under 5s: Assessment and Initial Management."
7. National Institute for Health and Care Excellence. 2010. "Meningitis (Bacterial) and Meningococcal Septicaemia in under 16s: Recognition, Diagnosis and Management."
8. National Institute for Health and Care Excellence. 2016. "SepsiTest Assay for Rapidly Identifying Bloodstream Bacteria and Fungi."
9. Khattak, Zoia E., and Fatima Anjum. 2021. Haemophilus Influenzae. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
10. Musher, Daniel M. 1996. "Haemophilus Species." In Medical Microbiology. 4th Edition., edited by S Baron, 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
11. Public Health England. 2021. "Identification of Haemophilus Species and the HACEK Group of Organisms." UK Standards for Microbiology Investigations.

## Sümbolite legend

Sümbol/märgis	Tähendus
	Tootja
	In vitro diagnostiline meditsiiniseade

	Temperatuuripiirang
	Partiikood
	Hoida eemal päikesevalgusest
	Katalooginumber
	Ei ole korduskasutatav
	Tutvuge kasutusjuhistega või elektrooniliste kasutusjuhistega
	Sisaldab piisavalt <n> katse jaoks
	Aegumiskuupäev
	Ärge kasutage, kui pakend on kahjustatud ja lugege kasutusjuhendit
	Volitatud esindaja Euroopa Ühenduses/Euroopa Liidus
	Unikaalne seadme identifikaator
	USA: Ettevaatust! Ameerika Ühendriikide föderaalseadus lubab müüa seda seadet ainult arstil või tema korraldusega
	Euroopa vastavusmärgis
	Ühendkuningriigi vastavusmärgis

© 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. Kõik õigused kaitstud. ATCC ja ATCC kataloogimärgid on organisatsiooni American Type Culture Collection kaubamärk. CLSI on Clinical Laboratory and Standards Institute'i kaubamärk. Kõik muud kaubamärgid on ettevõtte Thermo Fisher Scientific Inc. ja selle tütarettevõtete omand.



Oxoid Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, Inglismaa



Tehnilise abi saamiseks võtke ühendust kohaliku edasimüüjaga.

## Läbivaatamise teave

versioon	Tehtud muudatused
1.0	2022-11-02. Uus dokument



www.thermofisher.com

## Mueller-Hinton Agar with Horse Blood

REF PB1229A

### Paskirtis

Mueller-Hinton agaras su arklio krauju yra jautrumo antimikrobinėms medžiagoms agaras, rekomenduojamas diskelių difuzijos ir MIC tyrimui su lėpiais mikroorganizmais, izoliuotais iš klinikinių mėginių.

Priemonė skirta naudoti tik profesionalams, ji neautomatizuota ir tai nėra papildoma diagnostikos priemonė.

### Suvestinė ir paaiškinimas

Streptococci yra gramteigiami cocci, kurie gyvena įvairiose ekologinėse terpėse, pradedant nepatogeninėmis rūšimis jogurto pramonėje, baigiant žinduolių burnos mikrobiomo komensalais ir invaziniai žmogaus patogenais<sup>1,2,3</sup> (Patterson 1996; Dion ir Ashurst. 2020 m.; Public Health England 2014a). Streptococci galima klasifikuoti serotipuojant pagal ląstelių sienelių vandenilio sudėtį į Lancefield grupes nuo A iki S ir ne Lancefield Streptococci<sup>1,2,3</sup> (Patterson 1996; Dion ir Ashurst. 2020 m.; Public Health England 2014a). Ne Lancefield Streptococci negalima grupuoti Lancefield serotipavimu ir įtraukiant platų nepatogeninių ir patogeninių rūšių spektrą, kuriame *S. pneumoniae* laikomas žinomiausiu žmogaus patogenu<sup>1,2,3</sup> (Patterson 1996; Dion ir Ashurst. 2020 m.; Public Health England 2014a).

*Manoma, kad S. pneumoniae* paprastai gyvena žmogaus viršutinių kvėpavimo takų floroje, bet tokie rizikos faktoriai kaip mikrobiomo disbiozė arba imuniteto slopinimas suteikia *S. pneumoniae* galimybę uždominoti ir sukelti pneumokokinę ligą<sup>3,4</sup> (Public Health England 2014a; 2019). Pneumokokinė liga aprėpia visą spektrą sąlygų, pradedant ūmiomis ausies uždegimo infekcijomis, baigiant tokiomis invazinėmis ligomis kaip meningitas ir plaučių uždegimas<sup>5,6,7,8</sup>. *S. pneumoniae* infekcijos pasižymi dideliu užkrečiamumu ir mirtinumu<sup>1,2</sup>.

*H. influenzae* yra gramneigiama coccobacillus, kuri skirstoma į netipizuojamą neinkapsuliuotą izoliatą (NTHi) arba į vieną iš šešių antigeniškaai skirtingų kapsuliarių tipų<sup>9,10</sup>. Kol nebus pradėtas skiepijimas B (Hib) vakcina, Hib buvo patogeniškiausias *H. influenzae* serotipas<sup>11</sup>. Tačiau dabar manoma, kad visi *H. influenzae* serotipai ir netipizuojami izoliatai gali sukelti sunkias žmonių ligas<sup>9,10,11</sup>.

### Metodo principas

Mueller-Hinton agaras susilaukė kritikos dėl nepastovių rezultatų, kurie skiriasi atsižvelgiant į gamintoją ir terpės partiją. Šis poveikis demonstruojamas kaip:

- (1) Minimalios slopinimo koncentracijos (MIC) skirtumai aminoglikozidams reaguojant su *Pseudomonas aeruginosa* ir tetraciklinui reaguojant su *Staphylococci*. Tai gali lemti skirtingos divalentinių kalcio ir magnio katijonų koncentracijos.
- (2) Timino ir timidino kiekio skirtumai, kurie turi įtakos sulfonamido ir trimetoprimo MIC vertėms
- (3) Terpėje naudojamo agaro skirtumai, ypač jo difuzijos savybės

Pasigirdus kritikai, Klinikinių laboratorinių standartų institutas (CLSI) (anksčiau vadintas NCCLS) pakvietė gamintojus susitarti dėl Mueller-Hinton Agaro standartizavimo ir stabilizavimo. Buvo nustatyti kontrolės metodai, kurie turėjo užtikrinti, kad kritiniai antimikrobinų medžiagų / organizmų deriniai pasižymėtų vienodomis slopinimo zonomis dviejų mm paklaida nuo standarte nurodyto skersmens. Dėl šių bendrų pastangų Mueller-Hinton agaras tapo standartine terpe.

Mueller-Hinton agarą be papildų rekomenduoja tiek CLSI, tiek Europos jautrumo antimikrobinėms medžiagoms tyrimo komitetas (EUCAST) nelepioms padermėms tirti. Papildiniai naudojami pritaikant terpę lepesnėms padermėms.

### Tipinė sudėtis

	g/L
Jautiena, dehidratuota infuzija iš	300,0
Kazeino hidrolizatas	17,5
Kraskmolos	1,5
Agaras	17,0
Defibrinuotas arklio kraujas	50,0 ml
Nikotinamido adenino dinukleotidas (NAD)	20,0 mg

\*Pritaikyta, kad atitiktų našumo standartus

### Fizinė išvaizda

Spalva	Raudona
Skaidrumas	nepermatomas
Užpildymo svoris	26,0 ± 0,5 g
pH	7,3 ± 0,1

### Pateikiamos medžiagos

PO1229A: 10 x 90 mm Mueller-Hinton agaro su arklio krauju lėkštelės..... ▽ 10

Lėkštelės yra vienkartinės.

### Reikalingos, bet nepateikiamos medžiagos

- 1) Sėjimo kilpelės
- 2) Tamponėliai
- 3) Surinkimo talpyklės
- 4) Inkubatorius
- 5) Kokybės kontrolės organizmai

### Laikymas

- Kol nenaudojate, laikykite gaminį originalioje pakuotėje 2–10 °C temperatūroje.
- Gaminį galima naudoti iki ant etiketės nurodytos galiojimo pabaigos datos.
- Laikykite tamsioje vietoje.
- Prieš naudodami gaminį, palikite sušilti iki kambario temperatūros.
- Neinkubuokite prieš naudojimą.

### Įspėjimai ir atsargumo priemonės

- Tik *in vitro* diagnostikai.
- Tik profesionaliam naudojimui.
- Prieš naudodami pirmą kartą patikrinkite gaminio pakuotę.
- Nenaudokite gaminio, jeigu yra matomų pakuotės ar lėkštelės pažeidimų.
- Nenaudokite gaminio po nurodytos galiojimo pabaigos datos.
- Nenaudokite priemonės, jeigu yra užteršimo požymių.
- Nenaudokite priemonės, jeigu pakitusi spalva arba yra kitų sugedimo požymių.
- Kiekviena laboratorija yra atsakinga už susidariusių atliekų tvarkymą, atsižvelgiant į jų

pobūdį ir pavojingumo laipsnį, ir jų apdorojimą ar išmetimą laikantis visų taikomų federalinių, valstijos ir vietinių taisyklių. Būtina perskaityti ir atidžiai laikytis nurodymų. Tai apima panaudotų ar nepanaudotų reagentų, taip pat bet kokių kitų užterštų vienkartinį medžiagų po procedūrų su infekciniais ar potencialiai infekciniais gaminiiais, šalinimą.

Kaip saugiai naudoti ir šalinti gaminį, žr. medžiagos saugos duomenų lapę (MSDS) ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

### Rimti incidentai

Apie visus su šia priemone susijusius incidentus privaloma pranešti gamintojui ir atitinkamai priežiūros institucijai šalies, kurioje yra naudotojas ir (arba) pacientas.

### Mėginių paėmimas, naudojimas ir laikymas

Mėginius reikia imti ir naudoti pagal rekomenduojamas vietines gaires, pvz., CLSI standartą M100. Šiose gairėse pateikiamos nuorodos į atitinkamus rinkimo metodus, surinkimo talpyklas ir optimalias transportavimo ir laikymo sąlygas, kurios turi būti taikomos siekiant išvengti užteršimo.

### Procedūra

Prieš naudodami lėkšteles ir jautrumo antimikrobinėms medžiagoms diskelius, palikite sušilti iki kambario temperatūros. Prieš inokuliaciją agarų paviršiuje negali būti drėgmės pertekliaus.

Inokuliaciją galima paruošti naudojant augimo metodą arba tiesioginės kolonijos metodą. Kiekvienam tiriamam organizmui skirtas gaires rasite atitinkamuose DIN/CLSI dokumentuose.

### CLSI metodas:

- Auginimo metodas:
  - Pasirinkite mažiausiai 3–5 izoliuotas to paties morfologinio tipo kolonijas iš agarų kultūros. Palieskite kiekvienos kolonijos viršų kilpele ir perkeltite į 4–5 ml tinkamos sultinio terpės, pvz., „Tryptic Soy Broth (TSB)“
  - Inkubuokite sultinio kultūrą 35–37 °C, kol drumstumas pasieks arba viršys 0,5 McFarland arba analogišką.
  - Jei reikia, pakoreguokite suspensijos drumstumą sterilius druskos tirpalu arba sultiniu, kad pasiektumėte 0,5 McFarland standarto drumstumą. Šį veiksmą galima atlikti plika akimi arba naudojant fotometrinių prietaisų. Stebėdami plika akimi, pasirūpinkite pakankamu apšvietimu, kad palygintumėte suspensiją su McFarland 0,5 prie baltos kortelės su kontrastingomis juodomis linijomis<sup>5</sup>.
- Tiesioginės kolonijos metodas: (Dažniausiai su streptococci ir staphylococci naudojamas metodas).
  - Paruoškite tiesioginę tiriamojo organizmo suspensiją druskos tirpale arba sultinyje iš 18–24 valandų kultūros neselektyvioje terpėje.
  - Pakoreguokite suspensijos drumstumą kaip nurodyta augimo metode.
- Inokuliuokite agarų plokšteles per 15 minučių nuo organizmo suspensijos paruošimo.
- Įmerkite į suspensiją sterilių tamponėlių. Apveskite tamponėlių aplink mėgintuvėlio kraštą virš skysčio lygio, kad sugertumėte skysčio perteklių.
- Inokuliuokite paviršių trijose srityse, kaskart pasukdami lėkštelę maždaug 60 laipsnių.
- Uždėkite dangtelį ir palikite lėkštelę ant stalo 3 minutėms, bet ne ilgiau nei 15 minučių, kad

inokuliatas susigertų, prieš patepant jautrumo antimikrobinėms medžiagoms diskelius.

- Diskelius tepkite atskirai arba naudodami antimikrobinų diskelių dozatorių. Tarp diskelių centrų turėtų būti ne mažesnis nei 24 mm atstumas ir nedėkite jų per arti lėkštelės krašto. Kadangi kai kurie vaistai prasismelkia beveik iš karto, neperkelkite diskelio, kai jis susilies su agarų paviršiumi. Švelniai palieskite diskelius sterilia adata arba pincetu, kad jis visiškai susiliestų su agarų paviršiumi.
- Apverskite lėkštelę ir padėkite į inkubatorių per 15 minučių nuo diskelio uždėjimo.
  - Inkubuokite Mueller-Hinton agarą su avies krauju lėkšteles aerobinėmis sąlygomis 35–37 °C temperatūroje 16–18 val.  
**Pastaba:** Staphylococci ir enterococci reikia inkubuoti visas 24 val. Meticilinui atsparaus staphylococci (MRS) nepavyks aptikti inkubuoiant aukštesnėje kaip 35 °C temperatūroje.
  - Inkubuokite *Streptococcus* spp. 5–7 % CO<sub>2</sub> 35–37 °C temperatūroje 20–24 val.
  - Lepių ir rečiau izoliuojamų bakterijų inkubavimo laiką, temperatūrą ir atmosferą rasite CLSI dokumente M45<sup>19</sup>.

### Interpretavimas

Po 16–24 val. inkubavimo 35–37 °C temperatūroje *S. pneumoniae* paprastai sudaro 1–2 mm kolonijas ir krauju agarė pasirodo α hemolizė<sup>3</sup>. *S. pneumoniae* taip pat gali sudaryti šaškės figūrėlės formos kolonijas su duobute centre ir iškiliais kraštais<sup>3</sup>.

Po 24 val. inkubavimo šokolado agarė *H. influenzae* paprastai sudaro mažas apskritas ir iškilias kolonijas, kurios gali būti vaivorykštės spalvų.

### Kokybės kontrolė

Naudotojas privalo atlikti kokybės kontrolės tyrimus atsižvelgiant į numatomą terpės naudojimą ir laikydamasis visų taikomų vietos taisyklių (dažnumo, padermių skaičiaus, inkubacijos temperatūros ir kt.).

Šios terpės veiksmingumą galima patikrinti tiriant toliau nurodytas etalonines padermes.

Inkubavimo sąlygos: 16–20 val. 35° ± 1 °C temperatūroje 4–6 % anglies dvideginyje

Mikroorganizmas	Antibiotikas	Slopinimo zonos skersmuo (mm)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	Eritromicinas (E15)	26-32
	Cefpodoxime (CPD10)	29-35
	Ertapenem (ETP 10)	28-34
	Moxifloxacin (MXF 5)	24-30
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	Eritromicinas (E15)	10-16
	Cefpodoxime (CPD 10)	30-36
	Moxifloxacin (MXF 5)	30-36

### Apribojimai

Tiriant organizmus su atipine fermentų struktūra Mueller-Hinton agarė su arklio krauju, galima gauti anomalinius rezultatus.



## Veiksmingumo savybės




Tikslumas parodomas peržiūrint KK duomenis. Tinkamas lepių mikroorganizmų aptikimas patvirtinamas įtraukiant tinkamai apibūdintą izoliatą į kokybės kontrolės procesus, vykdomus kaip kiekvienos priemonės partijos gamybos dalį. Mueller-Hinton agaru su arkljo krauju (PB1229A) tikslumą įrodo bendras 95.84 % gaminio teigiamų rezultatų rodiklis, gautas per 12 testavimo metus (2011– 2021 m. gegužės mėn.; 892 partijos).


Priemonių testavimas laboratorijoje yra kokybės kontrolės proceso dalis. Inokuliatas paruošiamas iš darbinių kultūrų, paskiestų iki reikiamo inokulianto lygio, ir bandomoji terpė inokuliuojama. Antibiotikų diskeliai įkeliami tokia pat tvarka ir koncentracija kaip ir terpės patikros plane. Inkubavus 34–36 °C temperatūroje 16–20 valandų 4–6 % CO<sub>2</sub>, matuojama tiriamojo organizmo slopinimo zona ir galima daryti rezultatus bei išvadas.

## Literatūra

1. Patterson, Maria Jevitz. 1996. "Streptococcus." In Medical Microbiology. 4th Edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
2. Dion, Christopher F., and John V. Ashurst. 2020. "Streptococcus Pneumoniae." In StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
3. Public Health England. 2014a. "Identification of Streptococcus Species, Enterococcus Species and Morphologically Similar Organisms." UK Standards for Microbiology Investigations.
4. Public Health England. 2019. "Statutory Notification by Registered Medical Practitioners of All Hazards: Infections, Chemicals & Radiation."
5. Public Health England. 2014b. "Investigation of Ear Infections and Associated Specimens." UK Standards for Microbiology Investigations.
6. National Institute for Health and Care Excellence. 2019b. "Fever in under 5s: Assessment and Initial Management."
7. National Institute for Health and Care Excellence. 2010. "Meningitis (Bacterial) and Meningococcal Septicaemia in under 16s: Recognition, Diagnosis and Management."
8. National Institute for Health and Care Excellence. 2016. "SepsiTest Assay for Rapidly Identifying Bloodstream Bacteria and Fungi."
9. Khattak, Zoia E., and Fatima Anjum. 2021. Haemophilus Influenzae. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
10. Musher, Daniel M. 1996. "Haemophilus Species." In Medical Microbiology. 4th Edition., edited by S Baron, 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
11. Public Health England. 2021. "Identification of Haemophilus Species and the HACEK Group of Organisms." UK Standards for Microbiology Investigations.

## Simbolių paaiškinimas

Simbolis / etiketė	Reikšmė
	Gamintojas
	In Vitro diagnostikos medicinos priemonė
	Temperatūros riba
	Partijos kodas

	Saugoti nuo saulės spindulių
	Katalogo numeris
	Nenaudoti pakartotinai
	Vadovaukitės naudojimo instrukcijomis arba elektroninėmis naudojimo instrukcijomis
	Pakanka <n> bandymų
	Galiojimo pabaigos data
	Nenaudokite, jei pažeista pakuotė, ir Vadovaukitės naudojimo instrukcijomis
	Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Europos Sąjungoje
	Unikalus priemonės identifikatorius
	JAV: Dėmesio Federaliniai įstatymai leidžia šią priemonę įsigyti tik gydytojams arba su gydytojo leidimu
	Europos atitikties ženklas
	JK atitikties ženklas

© 2022 m. „Thermo Fisher Scientific Inc.“ Visos teisės saugomos.

ATCC ir ATCC katalogo ženklai yra „American Type Culture Collection“ prekių ženklas.

CLSI yra Klinikinių ir laboratorinių standartų instituto prekės ženklas.

Visi kiti prekių ženklai yra „Thermo Fisher Scientific Inc.“ ir jos patronuojamųjų įmonių nuosavybė.



Oxoid Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, Anglija



Dėl techninės pagalbos kreipkitės į vietos platintoją.

## Versijos informacija

Versija	Įvesti pakeitimai
1.0	2022-11-02. Naujas dokumentas