

**ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ**

Ένα μέσο για την αντιμικροβιακή δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά με τη μέθοδο διάχυσης του αντιβιοτικού από περιοχή μεγαλύτερης πυκνότητας σε περιοχή μικρότερης πυκνότητας (ζώνη αναστολής ανάπτυξης του μικροβίου).

**ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Αυτό το μέσο, που χρησιμοποιείται στην τεχνική Kirby - Bauer και έχει υιοθετηθεί από την εθνική επιτροπή για τα κλινικά εργαστηριακά πρότυπα (NCCLS) στις ΗΠΑ ως οριστική μέθοδος για τη δοκιμή ευαισθησίας. Εφαρμόζεται με τα πρότυπα: CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), BSAC, DIN, κ.α.

Το μέσο έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε θυμίνη ή θυμιδίνη, επίσης έχει περίσσεια δισθενών κατιόντων Ca, Mg για να μειώνει τις ζώνες αναστολής σε αμινογλυκοσίδες σε στελέχη *P. aeruginosa* και τη ζώνη αναστολής στην Daptomycin.

ΣΥΝΘΕΣΗ	g/litre
Beef Extract	2.0
Acid Hydrolysed Casein	17.5
Starch	1.5
Agar No. 1	17.0
Calcium ions	50-100mg/litre
Magnesium ions	20-35mg/litre

Εμφάνιση: Μπεζ διαυγές.

Τελικό pH 7.3 ± 0.2.

**ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ**

Το MUELLER HINTON AGAR είναι in vitro εργαστηριακό διαγνωστικό υλικό και πρέπει να χειρίζεται μόνο από εξειδικευμένα άτομα του εργαστηρίου.

Το υλικό αυτό περιέχει πεπτόνες και εκχυλίσματα ζωικής προέλευσης. Τα πιστοποιητικά για την προέλευση και την υγειονομική κατάσταση των ζώων δεν εγγυόνται πλήρως την απουσία μεταδιδόμενων παθογόνων παραγόντων. Γι' αυτό συνιστάται αυτά τα υλικά να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά και με τήρηση των συνήθων μέτρων ασφαλείας (να μη λαμβάνονται από την πεπτική ή την αναπνευστική οδό).

Ο χειρισμός των τρυβλίων να γίνεται πάντα με γάντια και μέσα σε Laminar flow Class II, για να αποφεύγονται επιμολύνσεις κυρίως από σαπροφυτικούς μύκητες.

Εάν το τρυβλίο είναι ραγισμένο ή το σακουλάκι τρύπιο, μη το χρησιμοποιήσετε.

Μη χρησιμοποιείτε τα τρυβλία εάν παρουσιάζουν ενδείξεις μικροβιακής μόλυνσης.

Το πάχος του άγαρ πρέπει να είναι 4 - 5 mm και το υλικό χωρίς ρωγμές, ξηρότητα ή άλλα σημεία αλλοίωσης.

Μετά την ημερομηνία λήξεως το υλικό είναι ακατάλληλο για χρήση.

Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα πλύνουμε αμέσως με άφθονο νερό και σαπούνι.

Τα θετικά δείγματα πρέπει να καταστρέφονται σύμφωνα με τους κανόνες υγιεινής που προβλέπονται για τη διαχείριση μολυσματικών δειγμάτων.

**ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ**

Τα τρυβλία πρέπει να φυλάσσονται στους 2 – 8 °C μέσα στη συσκευασία τους μέχρι τη στιγμή της χρήσης τους.

Παρατεταμένη φύλαξη σε θερμοκρασία κάτω των 2 °C δημιουργεί αρκετή υγρασία μέσα στο υλικό με κίνδυνο επιμόλυνσης. Η κατάψυξη ακόμα και στιγμιαία, καταστρέφει το υλικό. Επίσης αποφεύγεται την υπερβολική θέρμανση.

Τα τρυβλία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Εάν ανοίξετε την αεροστεγή συσκευασία του τρυβλίου κατά λάθος, μπορείτε να το φυλάξετε στο ψυγείο για 5 – 7 μέρες αφού το σφραγίσετε με παραφίλμ η με σακουλάκι.

Για την μεταφορά οι μελέτες σταθερότητας μας έδειξαν ότι τα τρυβλία μπορούν να παραμείνουν στους 18 - 25 °C για 5 ημέρες ή στους 30 - 40 °C για 24 ώρες, χωρίς να επηρεαστεί η απόδοση του προϊόντος.

**ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ**

Φτιάξτε εναιώρημα σε 3ml ζωμό Mueller Hinton παίρνοντας μεμονωμένη αποικία. Η θολερότητα του ζωμού πρέπει να είναι ίση με 0,5 του δείκτη McFarland ( $\leq 10^8$  cfu/ml). Γυρίστε και αναδεύστε τον στυλεό αρκετές φορές μέχρι να διαλυθεί καλά η αποικία. Επιστρέψτε σε τρεις διευθύνσεις με περιστροφή του τρυβλίου κάθε φορά κατά 60°. Περιμένετε για 10 λεπτά, έτσι ώστε να στεγνώσει το τρυβλίο πριν τοποθετηθούν οι δίσκοι των αντιβιοτικών.

Τοποθετήστε τα δίσκα με διανεμητή ή με αποστειρωμένη λαβίδα σε απόσταση 24mm κέντρο με κέντρο. Επώστε τα τρυβλία ανεστραμμένα.

Μη απαιτητικά βακτήρια: αερόβια στους 35 – 37 °C για 16-18 ώρες.

Απαιτητικά βακτήρια: 5-10% CO<sub>2</sub> στους 35 – 37 °C για 16-18 ώρες και για 20-24 ώρες (*Streptococcus spp*, *N. meningitis*, *N. gonorrhoeae*).

Επίωση 24h στους 35 – 37 °C: έλεγχος οξυακτινίου σε Σταφυλόκοκκο, βανκομυκίνης σε Σταφυλόκοκκο και Εντερόκοκκο. *P. aeruginosa* σε ασθενείς με ινοκυστική νόσο.

**ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Εξετάστε τα τρυβλία στις 16-18 ώρες σε ειδικό φωτισμό μετρώντας τις ζώνες αναστολής.

Όριο ζώνης αναστολής είναι το σημείο όπου δεν παρατηρείται μικροβιακή ανάπτυξη με γυμνό μάτι.

Μετρήστε τις ζώνες αναστολής με χάρακα ή ειδικά όργανα με τη βοήθεια προσπίπτοντα ή διελαύνοντα φωτισμό.

#### ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο ερπυσμός του Πρωτέα μέσα στις ζώνες αναστολής αγνοείται. Επίσης αγνοείται η λεπτή ανάπτυξη μέχρι 20% ή και λιγότερο μέσα στη ζώνη αναστολής στις σουλφοναμίδες, τριμεθοπρίμη και το συνδυασμό τους.

Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα: η πυκνότητα του ενοφθαλμίσματος, η σύνθεση και το pH του υλικού, το περιβάλλον, ο χρόνος επώασης και η ποσότητα των δισκίων αντιβιοτικών (μέχρι 6 δίσκοι στο τρυβλίο των 9cm, μέχρι 16 δίσκοι στο τετράγωνο τρυβλίο 120 x 120cm και μέχρι 12 δίσκοι στο τρυβλίο των 150cm). Τα δισκία πρέπει να έχουν 24mm απόσταση μεταξύ τους.

Το υλικό δεν θα πρέπει να έχει πάχος μεγαλύτερο από 4 χιλιοστά αλλά ούτε και μικρότερο γιατί τα αποτελέσματα δεν θα είναι απολύτως αξιόπιστα.

#### ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Μικρόβιο	ATCC	Αντίδραση
<i>Escherichia coli</i>	25922	Αναπτύσσεται. Διάμετρος ζώνης όπως αναφέρεται στον πίνακα.
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Αναπτύσσεται. Διάμετρος ζώνης όπως αναφέρεται στον πίνακα



*Escherichia coli*



*Staphylococcus aureus*

#### ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

##### ΟΠΩΣ ΠΕΡΙΓΡΑΦΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ NCCLS

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ	ΔΙΣΚΙΟ	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Amikacin	30 µg	20-26	19-26
Ampicillin	10 µg	27-35	16-22
Carbenicillin	100 µg	--	23-29
Cefamandole	30 µg	26-34	24-30
Cefoperazone	75 µg	24-33	38-34
Cefotaxime	30 µg	25-31	29-35
Cefoxitin	30 µg	23-29	23-29
Cephalothin	30 µg	29-37	17-21
Cloramphenicol	30 µg	19-26	21-27
Clydamycin	2 µg	24-30	--
Colistin	10 µg	--	11-15
Doxycycline	30 µg	23-29	18-24
Erythromycin	15 µg	22-30	--
Gentamicin	10 µg	19-27	19-26
Kanamycin	30 µg	19-26	17-25
Methicillin	5 µg	17-22	--
Mezlocillin	75 µg	--	23-29
Minocycline	30 µg	25-30	19-25
Moxalactam	30 µg	18-24	28-35
Nafcillin	1 µg	16-22	--
Nadilixic acid	30µg	--	22-28
Neomicin	30µg	18-26	17-23
Netilmicin	30 µg	22-31	22-30
Nitrofurantoin	300 µg	--	21-26
Oxacillin	1 µg	18-24	--
Penicillin G	10 unidades	26-37	--
Piperacillin	100 µg	--	24-30
Streptomycin	10 µg	14-22	12-20
Sulfisoxazole	250 or 300 µg	24-34	18-26
Tetracycline	30 µg	19-28	18-25
Ticarcillin	75 µg	--	24-30
Tobramycin	10 µg	19-29	18-26
Trimethoprim	5 µg	21-28	21-28
Trimethoprim Sulfametoxazole	1.25/23.75 µg	24-32	24-32
Vancomycin	30 µg	15-19	--

## ΑΠΟΡΡΙΨΗ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Τα υλικά που δεν παρουσιάζουν καμία ανάπτυξη μπορεί να θεωρηθούν ως μη επικίνδυνα απόβλητα και να απορρίπτονται ανάλογα.

Τα υλικά που παρουσιάζουν ανάπτυξη αποικιών πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις οδηγίες για μολυσματικά ή δυνητικούς μολυσματικά απόβλητα.

Το εργαστήριο είναι υπεύθυνο για τη σωστή διαχείριση των μολυσματικών αποβλήτων σύμφωνα με τη φύση και το βαθμό επικινδυνότητάς τους και πρέπει να τα διαχειρίζεται και να τα απορρίπτει (ή να αναθέτει τη διαχείριση και απόρριψή τους) σύμφωνα με τους εκάστοτε ισχύοντες κανονισμούς.

## ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

MUELLER HINTON AGAR - **CE**

ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
Τρυβλίο 9cm 20ml – 4mm	010075	10 τεμάχια	2 – 8 °C	4 μήνες
Τρυβλίο 120cm 50ml – 4mm	090075	5 τεμάχια	2 – 8 °C	4 μήνες
Τρυβλίο 140cm 55ml – 4mm	120075	5 τεμάχια	2 – 8 °C	4 μήνες
Φιαλίδιο 100ml	060075	50 τεμάχια	2 – 25 °C	12 μήνες

Παράγεται στην Ελλάδα από την εταιρεία Bioprepare σύμφωνα με τις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής οδηγίας 2017/746.

ΒΑΣΙΚΟ UDI-DI: 5212037714140104035E. EDMA: (14 01 04 03) Susceptibility Test Media (Plates).

Η εταιρεία Bioprepare έχει πιστοποιηθεί σύμφωνα με τα πρότυπα: EN ISO 9001:2015 / ΕΛΟΤ EN ISO 13485:2016 ΔΥ86/1348/2004.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Mueller, J.H. and Hinton, J. (1941). Protein-free medium for primary isolation of gonococcus and meningococcus. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 48: 330-333.

Goodale, W.I., Gould, G. and Schwab, L. (1943). Laboratory Identification of sulphonamide resistant gonococcal infection. J.Am. Med. Ass., 123: 547-549.

American Public Health Association. (1950). Diagnostic Procedures and Reagents. 3rd edn., A.P.H.A., New York.

NCCLS. (1986). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – second informational supplement.

Ελένη Βαγιάκου: Μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ. Μέθοδοι ελέγχου μικροβιακής αντοχής.

## ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ IN VITRO



### Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ & ΣΙΑ Ε.Ε.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Ποταμού 5 ΒΙΟ ΠΑ ΚΕΡΑΤΕΑΣ - ΑΤΤΙΚΗ ΤΚ 19001

Τ.Θ. 4893 - Τηλ.: 2299 0 66113 Φαξ: 2299 0 66112.

E-mail: [bioprep1@otenet.gr](mailto:bioprep1@otenet.gr) [www.bioprepare.gr](http://www.bioprepare.gr)