

**BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood •  
BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (150 mm) •  
BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood, Square**

**VERWENDUNGSZWECK**

**BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood** (Mueller-Hinton-Agar mit 5 % Schafblut) ist in mehreren Plattenformaten und Packungsgrößen erhältlich und wird für die Empfindlichkeitsprüfung von *Streptococcus pneumoniae* und anderer Streptokokken mit der Blättchen-Diffusionsmethode empfohlen, wie sie vom Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standardisiert wurde.<sup>1</sup>

**GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS**

Mikrobiologische Methode.

Das Bauer-Kirby-Verfahren basiert auf der Diffusion von antimikrobiellen Substanzen, mit welchen Papierblättchen imprägniert wurden, durch ein Agargel.<sup>2</sup> Im Testverfahren wird eine standardisierte Suspension aus dem Organismus über die gesamte Oberfläche des Mediums ausgestrichen. Papierblättchen mit einer Imprägnierung aus spezifischen Mengen Antibiotika oder anderen antimikrobiellen Agenzien werden dann auf der Oberfläche des Mediums platziert. Die Platten werden inkubiert und die Hemmzonen um jedes Blättchen ausgemessen. Das CLSI hat einen Leistungsstandard für das Bauer-Kirby-Verfahren verfasst, welcher für die Details hinzugezogen werden sollte.<sup>1</sup> Es wurden auch andere, nationale Richtlinien für die antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung nach der Bauer-Kirby-Methode entwickelt. In diesen Richtlinien können sich die Inokulumdichte, die Inokulierungsmethode, die resultierenden Zonengrößen und die Art und Weise der Interpretation von jenen des CLSI Standards unterscheiden. Während keine gemeinsamen europäischen Richtlinien zur Empfindlichkeitsprüfung bestehen, sollten die örtlich geltenden, nationalen Richtlinien beachtet werden, falls die CLSI Richtlinien nicht anwendbar sind.

Obwohl angemessen für die Empfindlichkeitsprüfung von schnell wachsenden, aeroben Pathogenen, ist nicht ergänzter Mueller-Hinton-Agar für anspruchsvollere Organismen, wie z.B. *Streptococcus pneumoniae*, nicht ausreichend. Das CLSI-Dokument M2 empfiehlt mit 5 % defibriniertem Schafblut ergänzter Mueller-Hinton-Agar und beschreibt ausführlich die Verfahren zur Qualitätskontrolle und die Interpretationskriterien für die Anwendung mit *S. pneumoniae* und anderen Streptokokken.<sup>1</sup>

**REAGENZIEN****BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood**

Zusammensetzung\* pro Liter destilliertem Wasser


Rindfleischextrakt	2,0 g
Säurehydrolysat von Casein	17,5
Stärke	1,5
Agar	17,0 g
Schafblut, defibriniert	5 %

pH 7,3 ± 0,2

\*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

**VORSICHTSMASSNAHMEN**

Zur In-vitro-Diagnostik

**IVD**. Nur für den professionellen Gebrauch. 

Agarplatten bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung, Rissen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden. Übermäßige Schrumpfung

dieses Mediums auf Grund von Austrocknung kann zu falschen Empfindlichkeitsergebnissen führen.

Hinweise zur aseptischen Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des Produkts sind der **ALLGEMEINEN GEBRAUCHSANLEITUNG** zu entnehmen.

## **AUFBEWAHRUNG UND HALTBARKEIT**

Nach Erhalt Platten bis unmittelbar vor dem Gebrauch im Dunkeln bei 2 – 8 °C in der Originalverpackung lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Die Platten können bis zum Verfallsdatum (s. Kennzeichnung auf der Verpackung) inokuliert und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden.

Platten aus bereits geöffneten Stapeln mit jeweils 10 Platten können bei Lagerung in einem sauberen Bereich bei 2 – 8 °C bis zu einer Woche verwendet werden.

## **QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER**

Für die Qualitätssicherung durch den Anwender sind der geeignete CLSI-Standard<sup>1</sup> oder, falls anwendbar, nationale Richtlinien hinzuzuziehen. Grundsätzlich sollten die unter **Testverfahren** beschriebenen Verfahren befolgt werden, einschließlich der *S. pneumoniae* ATCC 49619 Kontrollstämme, und die üblicherweise im Labor verwendeten antimikrobiellen Blättchen sollten zweimal wöchentlich auf korrekte Leistung überprüft werden.

Die korrekten Zonendurchmesser sind in Tabelle 3A des CLSI-Dokumentes M100 zu finden, welches im CLSI-Dokument M2 enthalten ist.<sup>1</sup>

Aussehen des nicht inokulierten Mediums: Rot (blutfarben), opak.

## **VERFAHREN**

### **Mitgeliefertes Arbeitsmaterial**

**BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood** (erhältlich in verschiedenen Plattenformaten; siehe **Verpackung/Lieferbare Produkte**). Mikrobiologisch kontrolliert.

### **Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial**

1. Inokulum-Bouillon in Mengen von 5 mL, wie z.B. Mueller-Hinton II-Bouillon (BBL Best.-Nr. 4397701, 16 x 102 mm Röhrchen) oder 0,9 %-ige Salzlösung für die Zubereitung eines Standardinokulums.
2. Bariumsulfat-Vergleichsstandard (0,5 mL 0,048 M BaCl<sub>2</sub> [1,175 % Gew./Vol BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O] bis 99,5 mL von 0,18 M [0,36 N] H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [1 % Vol./Vol.]).
3. Ein photometrisches Gerät zur Einstellung der Trübung der Inokulum suspension zur Übereinstimmung mit dem 0,5 McFarland Standard.
4. Als Alternative zu den obigen Materialien (1-3) kann auch das **BD Prompt Inoculation System** (volumetrisches Gerät zur Inokulumzubereitung) verwendet werden.<sup>1,3</sup>
5. Kontrollkultur – *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
6. Mit spezifischen Mengen antimikrobieller Agenzien imprägnierte Papierblättchen, z.B. **BD Sensi-Disc** Empfindlichkeitstestblättchen.
7. Blättchen-Dispensiergerät, z.B. das **BD Sensi-Disc** 6-, 8- oder 12-Platz selbstandrückende Dispensiergerät.
8. Zirkel oder Lineal zur Messung oder Interpretation der Zonendurchmesser.
9. Ein Inkubator, der eine 5 %-ige CO<sub>2</sub>-Atmosphäre erzeugt oder ein anderes Gerät, das eine ähnliche CO<sub>2</sub>-angereicherte Atmosphäre produziert.
10. Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

### **Probenarten**

Dieses Produkt wird nur für die Empfindlichkeitsprüfung von Reinkulturen verwendet und ist nicht zur direkten Verwendung mit klinischen Proben bestimmt (siehe auch

## **LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN).**

### **Testverfahren**

Für die Prüfung von *S. pneumoniae* sollte das direkte Koloniesuspensionsverfahren angewendet werden.<sup>1</sup> Aseptische Techniken müssen eingehalten werden.

1. Eine reine, frische (=über Nacht angelegte) Kultur eines nicht selektiven Blutagar-Mediums muss vorhanden sein.
2. Wachstum in Bouillon, z.B. Mueller-Hinton II-Bouillon oder sterile 0,9 %-ige Salzlösung, suspendieren. Trübung anpassen, so dass sie mit dem Bariumsulfatstandard (0,5 McFarland Standard) übereinstimmt. Die Trübung des Standards und des Testinokulums vergleichen, in dem beide Röhrchen vor einen weißen Hintergrund mit feinen schwarzen Linien gehalten werden. Als Alternative kann ein photometrisches Gerät verwendet werden.
3. Alternative Methoden der Inokulumzubereitung mit Geräten, welche die direkte Standardisierung der Inokula ohne Anpassung der Trübung erlauben, wie z.B. das **BD Prompt Inoculation System**, wurden für routinemäßige Testzwecke als annehmbar befunden.<sup>1,3</sup>
4. Innerhalb von 15 min nach Anpassung der Trübung einen sterilen Wattetupfer in das korrekt verdünnte Inokulum tauchen und gegen die obere Innenwand des Röhrchens mehrmals fest hin und her drehen, um überschüssige Flüssigkeit auszudrücken.
5. **BD Mueller Hinton Agar with 5 % Sheep Blood** durch dreimaliges Ausstreichen der gesamten Agaroberfläche inokulieren und dabei zwischen den einzelnen Ausstrichen die Platte jeweils um 60° drehen, um eine gleichmäßige Inokulierung zu erreichen.
6. Deckel auf die Platte zurücksetzen und die Platte bei Raumtemperatur mindestens 3 Minuten, aber nicht länger als 15 Minuten stehen lassen, damit eventuelle oberflächliche Feuchtigkeit vor dem Aufbringen der Testblättchen absorbiert wird. Nicht mehr als 9 Blättchen pro 150 mm Platte oder vier Blättchen pro 90 und 100 mm Platte verwenden. Zur Penicillinprüfung von *S. pneumoniae* ein 1µg Oxacillinblättchen verwenden.<sup>4</sup>
7. Platten 20 – 24 Stunden bei 35 °C in einer mit 5 % CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre inkubieren.

### Ergebnisse

Nach der Inkubation sollte ein konfluierendes Wachstum sichtbar sein. Sind nur einzeln stehende Kolonien gewachsen, so war das Inokulum zu dünn, und der Test muss wiederholt werden.

Nach der Inkubation wird der Durchmesser der Zonen mit kompletter Hemmung (nach Bewertung mit dem bloßem Auge) von oben mit abgenommenen Plattendeckel auf den nächsten vollen Millimeter mit einem Zirkel oder Lineal gemessen.<sup>5</sup> Der Endpunkt sollte als der Bereich betrachtet werden, in dem mit dem bloßen Auge kein offensichtliches Wachstum festzustellen ist. Schwaches Wachstum winziger Kolonien, welche nur mit Schwierigkeiten in der Nähe des Randes der offensichtlichen Hemmzone ausgemacht werden können, können unberücksichtigt gelassen werden.

Beim **BD Mueller Hinton Agar with 5 % Sheep Blood** sollte die Zone mit gehemmttem Wachstum gemessen werden, nicht die Zone mit gehemmter Hämolyse.

### Berechnung und Interpretation der Ergebnisse

Die Zonendurchmesser sollten mit jenen in Tabelle 2G für *S. pneumoniae* und Tabelle 2H für andere Streptokokken im CLSI-Dokument M100 (M2) verglichen werden, welches die Interpretationskriterien enthält.<sup>1</sup> Als Ergebnis wird dann entweder „resistent“, „intermediär“ oder „empfindlich“ berichtet. Die in diesem Standard beschriebenen besonderen Interpretationskriterien für Isolate von *S. pneumoniae* mit Oxacillin-Zonendurchmessern von ≤ 19 mm müssen beachtet werden (siehe auch **LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN**).

Hinweis: Ergänzende Informationen zum CLSI-Dokument M7 oder revidierte Versionen mit revidierten Tabellen für antimikrobielle Blättchen und Interpretationsrichtlinien werden regelmäßig veröffentlicht. Für die aktuellen Empfehlungen wird auf die neuesten Tabellen verwiesen. Das vollständige Normenwerk und ergänzende Informationen sind erhältlich beim Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA. Telefon: ++1-610-688-1100.

## LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Die Empfindlichkeitsprüfung mittels Blättchen-Diffusion wurde nur für die Verwendung mit Reinkulturen konzipiert. Vor der Vorbereitung der Empfindlichkeitsprüfung empfiehlt sich eine Gramfärbung und eine präsumptive Identifizierung des Isolates.<sup>1</sup>

Dieses Medium wird für die Empfindlichkeitsprüfung von *S. pneumoniae* und anderen Streptokokken gegen ausgewählte antimikrobielle Substanzen verwendet.<sup>1,2,5</sup> Es muss beachtet werden, dass für Amoxicillin, Ampicillin, Cefepime, Cefotaxim, Ceftriaxon, Cefuroxim, Imipenem und Meropenem keine zuverlässigen Blättchen-Diffusionstestkriterien für *S. pneumoniae* bestehen. Die *in-vitro* Aktivität dieser antimikrobiellen Substanzen wird am besten mit Hilfe einer MHK-Methode bestimmt.<sup>1</sup>

Für die Bestimmung der Penicillinempfindlichkeit von *S. pneumoniae* sollte ein Oxacillinblättchen verwendet werden. *S. pneumoniae*-Isolate mit Oxacillinzonendurchmessern von  $\geq 20$  mm sind suszeptibel (MHK  $\leq 0,06$  mg/mL) für Penicillin. Da Zonen von  $\leq 19$  mm mit Oxacillin-Screeningblättchen bei Penicillin-resistenten, intermediären und bestimmten suszeptiblen Stämmen auftreten, sollte ein Penicillin-, Meroprem- und Cefotaxim- oder Ceftriaxon-MHK auf allen *S. pneumoniae*-Isolaten mit Oxacillinzonen von  $\leq 19$  mm bestimmt werden.<sup>1</sup>

Der Oxacillintest zur Bestimmung der Penicillinempfindlichkeit wird für andere Streptokokken als *S. pneumoniae* nicht empfohlen. Für beta-hämolytische Streptokokken ist ein Penicillin- oder Ampicillinblättchen zu verwenden. Für Streptokokken der *viridans*-Gruppe sind Blättchen-Diffusionstests mit Penicillin und Oxacillin nicht verlässlich. Ihre Empfindlichkeit sollte mit einem MHK-Test bestimmt werden.<sup>1</sup>

Diffusionsempfindlichkeitsprüfungen mit antimikrobiellen Blättchen wurden intern unter Verwendung von *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 mit Cefaclor, Cefprozil, Chloramphenicol, Erythromycin, Ofloxacin, Tetracyclin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Vancomycin durchgeführt. Gemäß den in M2-A5 beschriebenen Testverfahren wurden über einen Zeitraum von 10 Testtagen zwanzig Tests mit dem Qualitätskontrollstamm und acht antimikrobiellen Blättchen durchgeführt. Bei allen acht antimikrobiellen Substanzen fielen 100 % (160/160) der Zonengrößen in die erwarteten Zonengrößenbereiche, welche in M2-A5 und Tabelle 3C des NCCLS-Dokumentes M100-S6 publiziert wurden.<sup>6,7</sup> Die Standardabweichung für Tetracyclin war weniger als 1 mm, und weniger als 2 mm für alle anderen antimikrobiellen Substanzen.<sup>8</sup>

Reproduzierbarkeitsstudien (3 mal täglich während 3 Tagen) wurden mit den obigen antimikrobiellen Substanzen gegen *S. pneumoniae* ATCC 49619 und neun weiteren, gut charakterisierten *S. pneumoniae*-Stämmen in zwei Außenstellen durchgeführt. Die Interpretationsrichtlinien für die Zonendurchmesser aus Tabelle 2C des NCCLS-Dokumentes M2-A5 und Zusatz M100-S6 wurden für jede antimikrobielle Substanz befolgt.<sup>6,7</sup> Tests mit Chloramphenicol, Erythromycin, Ofloxacin, Tetracyclin und Vancomycin zeigten über 95 % Klassenübereinstimmung mit der NCCLS Referenzmethode. Die Tests mit Trimethoprim Sulfamethoxazol zeigten 90 % Klassenübereinstimmung mit der NCCLS Referenzmethode. Die Reproduzierbarkeit konnte für Cefaclor und Cefprozil auf Grund von nicht existierenden Interpretationsrichtlinien für diese zwei antimikrobiellen Substanzen nicht bestimmt werden. Auf Grund der oben erwähnten Studien wird die Verwendung von Cefaclor, Cefprozil oder Trimethoprim/ Sulfamethoxazol für die Prüfung von *S. pneumoniae* auf diesem Medium nicht empfohlen. Außerdem wird in der Literatur von unverhältnismäßig vielen Interpretationsfehlern bei Blättchen-Diffusionstests mit Trimethoprim/ Sulfamethoxazol auf Mueller-Hinton-Schafblut-Agarplatten berichtet.<sup>9</sup>

Bei manchen Organismen/Antibiotika-Kombinationen hat die Hemmzone ggf. keinen deutlich abgegrenzten Rand, wodurch das Ergebnis falsch interpretiert werden könnte. Verschiedene Faktoren, welche die Empfindlichkeitsprüfung durch Blättchen-Diffusion beeinträchtigen können, wurden identifiziert. Zu diesen Faktoren gehören das verwendete Medium, Agartiefe, Blättchenwirksamkeit, Inokulumkonzentration, Alter des Inokulums und pH-Wert.<sup>2</sup>

Eine falsche Inokulumkonzentration kann zu falschen Ergebnissen führen. Bei einem Inokulum mit zu hoher Konzentration können die Hemmzonen zu klein ausfallen und bei zu niedriger Konzentration können die Hemmzonen zu groß und zu schwer zu messen sein.

Unsachgemäße Lagerung der Antibiotika-Blättchen kann zum Verlust der Wirksamkeit und falsch-resistenten Ergebnissen führen.

Die in-vitro Empfindlichkeit eines Organismus auf ein spezifisches antimikrobielles Agens bedeutet nicht notwendigerweise, dass die antimikrobielle Substanz auch in-vivo wirksam sein wird. Für Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse sind die geeigneten Literaturhinweise hinzuzuziehen.<sup>2,10</sup>

Dieses Medium darf nicht für die Empfindlichkeitsprüfung von anderen Bakterien als *S. pneumoniae* und beta-hämolytischen Streptokokken verwendet werden.

## LITERATUR

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Approved Standard: M2. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA. *Search for latest version at [www.clsi.org](http://www.clsi.org)*
2. Washington, J.A., and G.L. Woods. 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.
3. 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.
4. Swenson, J.M., B.C. Hill, and C. Thornsberry. 1986. Screening pneumococci for penicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 24:749-752.
5. Hindler, J.F., and J.M. Swenson. 2003. Susceptibility test methods: fastidious bacteria. *In: In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology*, 8<sup>th</sup>ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Approved Standard: M2-A5. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 5th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995. Sixth informational supplement: M100-S6. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
8. Data on file at Becton Dickinson Microbiology Systems.
9. Jorgensen, J.J. 1994. Detection of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* by use of standardized susceptibility testing methods and recently developed interpretive criteria. *Clin. Microbiol. Newsl.* 16(13):97-104.
10. Neumann, M.A., D.F. Sahm, C. Thornsberry, J.E. McGowan, Jr. 1991. 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.

## VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

### **BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (90 mm Stacker-Platten)**

Best.-Nr. 254030                      Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten

Best.-Nr. 254080                      Gebrauchsfertige Plattenmedien, 120 Platten

### **BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (150 mm)**

Best.-Nr. 255080                      Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten

### **BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep blood, Square (120 x 120 mm)**

Best.-Nr. 254517                      Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten

## WEITERE INFORMATIONEN

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.



**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 the property of Becton, Dickinson and Company. © 2011 BD