



ÁGAR MUELLER HINTON

USO

O Ágar Mueller Hinton é reconhecido por todos os especialistas como sendo o meio de referência para o estudo da susceptibilidade de bactérias a antibióticos e sulfamidas. Ele também é útil para o isolamento de *Neisseria* e é um excelente meio base para a preparação de ágar sangue.

HISTÓRIA

Em um trabalho sobre o desenvolvimento de um meio transparente capaz de resistir a autoclavação, Mueller e Hinton selecionaram o meio complexo de Gordon e Hine em uma tentativa de determinar os componentes essenciais. Os autores descobriram que o amido poderia substituir o extrato de ervilha em termos de valor nutritivo assim como agente protetor atuando contra substâncias tóxicas presentes no meio. Eles subsequentemente descobriram que a peptona pancreática de carne poderia ser substituída por hidrolisado ácido de caseína, favorecendo assim o crescimento de gonococos e meningococos. Em 1966, Bauer, Kirby, Shervis e Turck recomendaram o meio de Mueller Hinton para o estudo da susceptibilidade das bactérias aos antibióticos usando o método de discos. Finalmente, um método de controle padronizado foi publicado pelo Comitê Nacional para Padrões de Laboratórios Clínicos para o método de Kirby-Bauer.

PRINCÍPIOS

- A escolha dos ingredientes é determinada a fim de se obter uma quantidade muito baixa de timina e timidina (substâncias conhecidas por inibir a atividade antibacteriana do trimetoprim), e uma quantidade muito baixa de ácido para-aminobenzóico (PABA) e seus análogos estruturais (que antagonizam a atividade das sulfonamidas).
- Como resultado da influência do cálcio e magnésio sobre a sensibilidade das cepas de *Pseudomonas* aos aminoglicosídeos, Reller *et al.* recomendaram que as concentrações dos ions devem ser incluídas dentro dos seguintes limites:
 - cálcio: 50-100 mg/litro
 - magnésio: 20-35 mg/litro
- O método Kirby-Bauer é baseado na difusão dos antibióticos impregnados em discos de papel previamente secos, depositados sobre a superfície do ágar. Quando aplicados sobre a superfície do ágar, os discos absorvem uma quantidade suficiente de água para dissolver o antibiótico, que então se difunde dentro do meio de acordo com as leis físicas de difusão de moléculas através de um gel. Desta maneira, um gradiente de concentração do antibiótico forma-se ao redor de cada disco. Ao mesmo tempo que os antibióticos se difundem, a bactéria inoculada na superfície do ágar se multiplica. Durante a fase logarítmica de crescimento, a multiplicação bacteriana é mais rápida do que a difusão do antibiótico e as células bacterianas não inibidas continuam a se multiplicar até que o crescimento possa ser visualizado. Nenhum crescimento aparece quando o antibiótico está presente em concentrações inibitórias. Assim torna-se possível medir o diâmetro da zona de inibição, que é indiretamente proporcional as concentrações mínimas inibitórias encontradas pelo método de diluição. Existem tabelas para a interpretação dos resultados a fim de determinar se as bactérias são sensíveis ou resistentes aos antibióticos testados.

PREPARAÇÃO

- Suspender 38,0 g do meio desidratado (BK048) em 1 litro de água destilada ou deionizada.
- Levar lentamente a ebulição, com agitação constante até dissolução completa.
- Dispensar em tubos ou frascos.
- Esterilizar em um autoclave a 115°C por 15 minutos.

NOTA 1:

A água usada para preparar o meio deve ser de alta qualidade, uma vez que os níveis de cálcio e magnésio no meio estejam precisamente ajustados.

NOTA 2:

A incompleta fusão do ágar durante a preparação poderá levar a uma significativa inconsistência na formação do gel do agar solidificado, após esterilização e resfriamento.

INSTRUÇÕES PARA USO: teste de susceptibilidade aos antibióticos

O meio:

- Resfriar e manter entre 44-47°C.
- Despejar em placas de Petri estéreis.
- O ágar deve ter 4 mm de espessura.
- Deixar solidificar sobre uma superfície fria.
- Secar em uma incubadora com as tampas parcialmente removidas a fim de evitar a formação de gotículas de água sobre a superfície do ágar, um fenômeno que pode alterar a qualidade de difusão do meio.

O inóculo: método padrão Kirby-Bauer

- O espectro antibiótico deve ser determinado com uma cepa patológica pura.
- Transferir 4 a 5 colônias em um caldo apropriado (Caldo Triptona de Soja: BK046, BM030).
- Coloque em uma estufa a 37°C (em geral de 2 a 5 horas) até que seja obtida uma opacidade que é equivalente a opacidade padrão de uma suspensão de sulfato de bário (densidade de 0,5 na escala de MacFarland).

A inoculação: método padrão Kirby-Bauer

- Adicionar um *swab* estéril ao inóculo ajustado para o padrão de opacidade, e drenar o excesso do caldo pressionando o *swab* nas paredes do tubo. Inocular o ágar. O *swab* deve ser passado 2 ou 3 vezes ao longo de toda a superfície a fim de se obter um inóculo homogêneo.
- Deixar as placas secarem por 10 minutos antes de depositar os discos.

NOTA:

O método Kirby e Bauer é reconhecido por fornecer os resultados mais confiáveis e mais reproduzíveis. Outros métodos podem também ser utilizados, entretanto, desde que o inóculo e os métodos de inoculação sejam primeiramente estudados e padronizados.

Localização dos discos e incubação

- Colocar os discos usando leve pressão para garantir uma boa adesão ao ágar.
- Eles devem estar situados a pelo menos 15 mm a partir da borda da placa e suficientemente afastados para que as zonas de inibição não se sobreponham.

RESULTADOS

Medir a zona de inibição com um compasso. Consultar a tabela para interpretar as zonas de inibição dadas pelos fornecedores dos discos de antibióticos a fim de estabelecer a correlação entre a zona de inibição e a concentração mínima inibitória (M.I.C.).

COMPOSIÇÃO TÍPICA

(pode ser ajustada para se obter um melhor desempenho)

Para 1 litro de meio:

- Hidrolisado ácido de caseína..... 17,5 g
- Infusão de carne..... 2,0 g
- Amido solúvel..... 1,5 g
- Ágar Bacteriológico..... 17,0 g

pH do meio pronto para uso a 25°C: 7,3 ± 0,2.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Meio desidratado: pó esbranquiçado, de fluxo livre e homogêneo.
- Meio preparado: ágar âmbar.
- Típica resposta da cultura após 24 horas de incubação a 37°C:

Microrganismos		Crescimento
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	bom
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	bom
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	bom
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	bom

ESTOCAGEM / SHELF LIFE

Meio desidratado: 2-30°C.

- A data de validade está indicada na etiqueta.

Meio preparado (valor de referência*):

- Meio em tubos ou frascos: 6 meses entre 2-8°C.
- Meio em placas: 1 mês entre 2-8°C.

EMBALAGEM

Código

Meio desidratado:

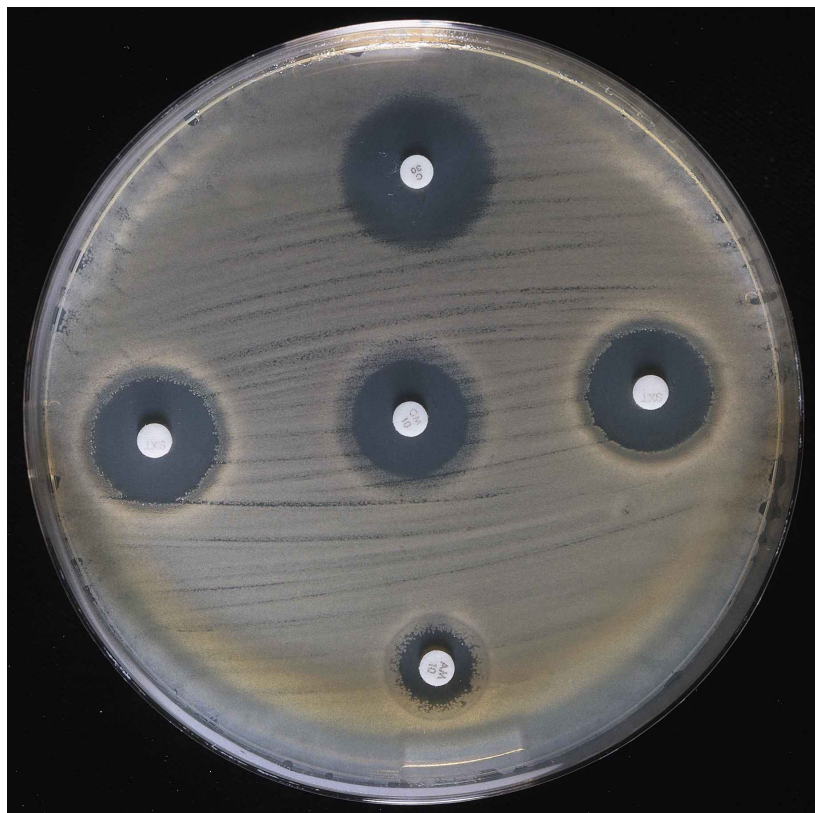
- Frasco de 500 g

BK048HA

FOTO ILUSTRATIVA

Referência do produto: BK048HA

Meio usado para: Teste de sensibilidade a antibióticos, crescimento de bactérias fastidiosas.



Teste de sensibilidade a antibióticos

Ágar Mueller-Hinton

Ref : **BK048HA**

Incubação: 24 horas / 37°C ou de acordo a protocolos individuais

Características: Um "tapete" de crescimento bacteriano com zonas claras (inibição) ao redor dos discos impregnados com antibióticos.

BIBLIOGRAFIA

Mueller, J.H., and Hinton, J. 1941. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 48: 330-333.

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin Pathol., 45: 493-496.

Daguet, G.L., et Chabbert, Y.A. 1972. Techniques en bactériologie. 3. Sérologie bactérienne, antibiotiques en bactériologie médicale. Ed. Flammarion, Paris.

Reller, L.B., Schoenknecht, F.D., Kenny, M.A., and Sherris, J.C. 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.

Acar, J.F. 1976. Journées Nationales de Biologie. Grenoble-Lyon.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1984. Approved standard: M2 A3. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 3rd Ed, NCCLS, Villanova, Pa.

Courvalin, P., Goldstein, F., Philippon, A., et Sirot, J. 1985. L'antibiogramme. MPC. Bruxelles.

National Committee for Clinical Laboratory Standard. 1987. Second informational supplement : M100-S2. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, NCCLS, Villanova, Pa.

NF U 47-106. Décembre 2004. Méthodes d'analyse en santé animale. Détermination *in vitro* de la sensibilité des bactéries aux anti-infectieux par la méthode de dilution en milieu gélosé.

NF U 47-107. Décembre 2004. Méthodes d'analyse en santé animale. Guide de réalisation des antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

NF EN ISO 10272-1. Avril 2006. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Campylobacter* spp.. Partie 1 : Méthode de recherche.

*O valor de referência corresponde à vida de prateleira esperada quando preparados sob condições laboratoriais normais, seguindo as instruções do fabricante. É fornecido apenas como guia e sem garantia, expressa ou implícita associada com esta informação.

As informações fornecidas na embalagem procedem de formulações ou instruções descritas neste documento.

As informações e especificações contidas nesta ficha técnica datam de 17/02/2009.

Elas estão sujeitas a alterações a qualquer momento, sem aviso prévio.

Código do documento: BK048/A/2003-01: 6.