



AGAR MUELLER HINTON SANGRE

Medio de cultivo Agar Mueller Hinton Sangre

INTRODUCCIÓN:

Agar Mueller Hinton sangre de cordero al 5% es un medio preparado por BIOBACTER SAS en caja de Petri desechable para la realización de pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión según la técnica de Kirby–Bauer. Es especialmente útil en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana para *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y otros Gram-positivos. Según las normas del documento NCCLS M-100 S12

COMPONENTES:

1. Caja por 10 unidades
2. Inserto
- 3.

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS:

1. Asas Bacteriológicas
2. Hisopos estériles desechables
3. Guantes estériles
4. Tubos escala de Mac Farland
5. Sensidiscos
6. Tapabocas
7. Estufa a 37 °C
8. Caldo Mueller Hinton ó tripticasa de soya
9. Mechero de Bunsen

METODOLOGÍA.

Principio del método:

En el manejo clínico de los cuadros infecciosos causados por microorganismos bacterianos (*Streptococcus pneumoniae*), es, en la mayoría de los casos, de vital importancia establecer la susceptibilidad ó resistencia del microorganismo implicado a los antimicrobianos de uso corriente para tener un mejor criterio y mejores posibilidades de éxito en el tratamiento. Para el logro de este propósito, se requiere un proceso estandarizado, el cual incluye el uso de un medio que asegure el buen crecimiento del microorganismo en estudio y la adecuada difusión del antimicrobiano probado; el medio de Mueller Hinton llena dichos criterios.

Agar Mueller-Hinton sangre se prepara a partir de materia prima deshidratada comercialmente obtenida de la casa BBL, la cual cumple los requisitos del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), se dispensa en un volumen

de 20 cc por placa para dar una capa de 4 mm de altura. El Agar Mueller Hinton sangre básicamente contiene infusión deshidratada de carne de res, Hidrolizado de Caseína, almidón y agar, su pH final es de 7.4 +/-0.2. y es adicionado de 5% de sangre de cordero.

CRITERIOS DE DESEMPEÑO Y LIMITACIONES DEL MÉTODO

El medio de Mueller Hinton sangre, debe permitir el crecimiento abundante de los microorganismos en estudio y la adecuada difusión de los antimicrobianos incorporados en los sensidiscos después de 18 horas de incubación. Este medio se recomienda principalmente para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae*.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:

El medio de Mueller Hinton sangre en placa de Petri viene listo para ser utilizado.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El medio de Mueller Hinton sangre debe conservarse a T° de 4-8°C colocando las placas en posición invertida para evitar que el agua de condensación pueda caer sobre la superficie del medio. Este medio debe manipularse con cuidado evitando movimientos bruscos o caídas que puedan resquebrajar la capa del medio.

La congelación arruina totalmente el medio. Conservado en condiciones óptimas es estable hasta la fecha de expiración señalada.

PROCEDIMIENTO:

1. Seleccionar 4-5 colonias de cultivo del microorganismo en estudio, no utilizar cultivos de mas de 24 horas.
2. Transferir estas colonias simplemente tocando la parte superior de cada una de ellas con el asa bacteriológica estéril a un tubo que contenga 3-5 cc de caldo estéril de Mueller Hinton ó de Tripticasa- Soya

3. Incubar este cultivo a 37°C por 2 horas, si es necesario diluir el cultivo con solución salina estéril hasta obtener una turbidez similar al tubo 0.5 de la escala de Mac Farland lo que corresponde a 1.5×10^8 microorganismos viables por mililitro.
4. Sumergir un aplicador de algodón estéril en la suspensión del microorganismo. No utilizar cultivos sin diluir.
5. Colocar el aplicador por encima del nivel del contenido del tubo, rotarlo contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo.

6. Tomar una caja de Mueller – Hinton sangre que esté a T° ambiente cuya superficie tersa no presente humedad. Sembrar con el aplicador suavemente en tres direcciones. Hay que evitar inóculos muy concentrados ó muy diluidos.
7. Permitir que la superficie del medio resembrado se equilibre durante 5-20 minutos, manteniendo la caja con su tapa.
8. Colocar con pinza estéril los discos de los antimicrobianos seleccionados, no más de 7 discos por caja: 1 en el centro y 6 en la periferia a distancias equidistantes para evitar que los halos de inhibición se imbriquen.
9. Incubar las cajas en posición con la tapa hacia abajo a 37°C por 18-24 horas. Nunca usar atmósfera de CO₂.
10. Leer el diámetro de los halos de inhibición e informar.

INTERPRETACION DE RESULTADOS ANALITICOS:

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar según el procedimiento de Kirby-Bauer se interpretan según tablas especiales de comparación. El resultado será: sensible (S), resistente (R) ó sensibilidad intermedia (I).

CONTROL DE CALIDAD:

El medio de Mueller Hinton sangre tiene un estricto control de calidad durante el proceso de producción y producto terminado que incluye el cumplimiento de las especificaciones del medio y las pruebas de crecimiento de cepas ATCC.

Escherichia coli 25922
Enterococcus faecalis 19433
Staphylococcus aureus SS691
Klebsiella pneumoniae 13883

Además, BIOBACTER LTDA hace para cada lote un control de desempeño frente a sensidiscos de ceftriaxona, ciprofloxacina, trimetoprim sulfametoxazole y oxacilina con una cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

VALOR DE REFERENCIA:

Para la cepa utilizada y los sensidiscos utilizados el patrón de lectura debe ser

Ceftriaxona	30-37 mm
Ciprofloxacina	28-33 mm
Trimetoprim sulfametoxazole	29-36 mm

Oxacilina

24-34 mm

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS:

Se debe observar estrictas medidas de asepsia y antisepsia. Desechar todos los elementos utilizados en recipientes con solución de Hipoclorito de Sodio al 2.5%. Los cultivos una vez leídos deben esterilizarse en autoclave y luego empacados en bolsa plástica roja para ser recogidos por la compañía recolectora de desechos biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Bauer AW, Kirby MM, Sherris JC, et al.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45: 493-496.
2. **Barry AL, Coyle MB, Thornsberry C, et al.** Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer Kirby disk susceptibility test. J. Clin Microbiol 1979; 10: 885-889
3. **Bernal M, Guzman M:** El antibiograma de discos. Guías para la normalización de la técnica de Kirby-Bauer. Serie de notas e informes técnicos No 9-INS. Bogotá 1986.
4. **National Committee for Clinical Laboratory Standards** (1990). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 4th ed. Approved Standard M2-A4. NCCLS. Villanova Pa.
5. **Greenwood D.** In vitro veritas? Antimicrobial susceptibility test and their clinical relevance. J Inf Dis 1981; 144:380-385.
6. **Nash P, Krenz MM.** Culture Media. Chapter 121. pg 1226-1228 in: Manual of Clinical Microbiology, edited by Balows A, Hauser WJ, Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Fifth Ed. 1991 Am Soc Microbiol. Washington DC.
7. Quality control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard-Third Edition; Document M22-A3. CLSI 940 West Valley Road. Suite 1400, Wayne, Pensilvania, 19087-1898 USA, 2004.
8. **Mossel DAA, Trees MG, Van Laarhoven B. et al.** Quality Assurance of Selective Culture Media for Bacteria, Moulds and Yeast: an Attempt to Standardization at the International level. J App Bacteriol. 1983; 54:313-327

REVISION SEGUN NORMAS DEL INVIMA.

Marzo 2015.

