



Mueller Hinton II Broth

Cation-adjusted Mueller-Hinton broth for antimicrobial susceptibility testing of bacteria that grow aerobically.

INTENDED PURPOSE

Liquid medium for quantitative antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing aerobic organisms by broth dilution procedures, as standardized by the CLSI.

DESCRIPTION

Mueller Hinton II Broth (MH II broth or cation-adjusted MHB) is the recommended medium for Minimum Inhibitory Concentration (MIC) testing of commonly isolated rapidly growing aerobic bacteria by broth dilution procedures.

This medium is formulated to have low levels of thymine and thymidine and is adjusted to the calcium and magnesium ions concentrations. It conforms to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recommendations.

TYPICAL FORMULA*

	(g/l)
Beef Extract	3.0
Acid Hydrolysate of Casein	17.5
Starch	1.5
Final pH 7.3 ± 0.1 at 25°C	

*Adjusted and/or supplemented as required with appropriate salts to provide the following concentrations of ions and meet performance specifications according to ISO/TS 16782: 20-25 mg/l of calcium, 10-12.5 mg/l of magnesium, manganese and zinc below 8 mg/l and 3 mg/l, respectively.

METHOD PRINCIPLE

Acid hydrolysate of casein and beef extract provide amino acids, nitrogen, minerals, vitamins, carbon and other nutrients which support the growth of microorganisms. These ingredients are selected for low thymine and thymidine content as determined by MIC values obtained by testing *Enterococcus faecalis* with trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT). Starch acts as a protective colloid against toxic molecules which can be present in the medium. Hydrolysis of starch during autoclaving supplies a little amount of glucose, which is a source of energy. Specified levels of calcium and magnesium are based on studies performed with aminoglycosides and *Pseudomonas aeruginosa*.

Broth dilution methods, macrodilution and microdilution, are used to measure quantitatively the *in vitro* activity of an antimicrobial agent against a given bacterial isolate. To perform the test, a series of tubes/wells is prepared with a broth medium to which various concentrations of the antimicrobial agents are added. The tubes/wells are then inoculated with a standardized suspension of the test organism. After incubation at 35 ± 2°C, the tests are examined and the MIC is determined.

PREPARATION

Dehydrated medium

Suspend 22 g of the powder in 1 liter of distilled or deionized water. Mix well. Heat to boil shaking frequently until completely dissolved. Sterilize in autoclave at 121°C for 10 minutes.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Standard microbiological supplies and equipment such as: Autoclave, test tubes, inoculating loops, swabs, incubator, quality control organisms.

SPECIMENS

Specimens should be obtained before antimicrobial therapy (where possible) and promptly delivered to the laboratory for examination. Clinical samples are not inoculated directly onto MH II broth. The microorganism to be tested must first be isolated on a nonselective solid medium, such as blood agar or tryptic soy agar (TSA). Refer to specific guidelines for more detailed information.

TEST PROCEDURE

1. Prepare antimicrobial agents in serial two-fold dilutions in Mueller Hinton II Broth.

2. Prepare a standardized suspension of the test organism using either the direct colony suspension or growth method.
3. Add the suitable volume of the adjusted inoculum to each tube/well containing the antimicrobial agent in the dilution series, and mix.
4. Incubate the tubes or trays aerobically at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 16-20 hours.

For more detailed information, consult appropriate guidance.

INTERPRETING RESULTS

After incubation the presence of turbidity indicates growth of the organism. The lowest concentration of antimicrobial agent showing no growth is the MIC of that organism for that agent.

Interpret the MIC by referring to the current CLSI document M100 and report the organism as susceptible, intermediate or resistant to the agents that have been tested.

STORAGE

The powder is very hygroscopic, store the powder at $10-30^\circ\text{C}$, in a dry environment, in its original container tightly closed. Store tubes and bottles at $10-25^\circ\text{C}$ away from light. Do not use the product beyond its expiry date on the label or if product shows any evidence of contamination or any sign of deterioration.

SHELF LIFE

Dehydrated medium: 4 years.

Medium in tubes/bottles: 2 years.

QUALITY CONTROL

Appearance of Dehydrated Medium: Fine, homogeneous, free of extraneous material.

Appearance of Prepared Medium: Pale to light yellow, clear to slightly hazy.

Expected Cultural Response:

Control strain	Inoculum	Incubation	Criteria
<i>Enterococcus faecalis</i>	10-100 CFU/ ml	16-20 h / $35 \pm 2^\circ\text{C}$	Good growth
WDCM 00087 (ATCC® 29212; NCTC 12697)			
<i>Escherichia coli</i>			
WDCM 00013 (ATCC® 25922; NCTC 12241)			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
WDCM 00025 (ATCC® 27853; NCTC 12903)			
<i>Staphylococcus aureus</i>			
WDCM 00131 (ATCC® 29213; NCTC 12973)			

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Performance testing of Mueller Hinton II Broth was carried out using the QC strains listed above. The results obtained met the established criteria.

LIMITATIONS

Invalid results can be caused by poor specimen quality, improper sample collection, improper transportation, improper laboratory processing, or a limitation of the testing technology. The operator should understand the principles of the procedures, including its performance limitations, in advance of operation to avoid potential mistakes.

Due to nutritional variation, some strains may result in poor growth or fail to grow in this medium. For example, microorganisms requiring thymine and thymidine may not grow. Also fastidious organisms such as species of *Streptococcus*, *Haemophilus*, and *Neisseria* will not grow or will grow poorly in MH II Broth.

The efficacy of this medium has not been established for all microorganisms that might be isolated from clinical specimens. If growth is inadequate (i.e. turbidity that cannot be seen by the naked eye) the MIC values may not be valid. Always include a growth control tube or well that contains the inoculated medium but no antimicrobial agent. If no growth is seen, repeat testing or use an alternative procedure.

In vitro susceptibility of an organism to a specific antimicrobial agent does not mean that it will be effective as a therapeutic agent *in vivo*.

MH II broth is not adequate for susceptibility testing of fastidious organisms. For MIC tests of fastidious organisms such as *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Streptococcus pneumoniae*, use proper media according to the reference method.

WARNING AND PRECAUTIONS

- 1) **For *in vitro* diagnostic use (IVD).**
- 2) **For laboratory professional use only.**
- 3) Operators must be trained and have certain experience. Please read the instructions carefully before using the product. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this document.
- 4) Consult the Safety Data Sheet (SDS) for information regarding hazards and safe handling practices.
- 5) Do not use if the product or packaging appears to be damaged.
- 6) Follow standard precautions. All patient specimens should be considered potentially infectious and handled accordingly.
- 7) Handle all specimens as if infectious using safe laboratory procedures. Dispose of hazardous or biologically contaminated materials according to the practices of your institution.
- 8) Avoid cross-contamination of samples by using disposable tips and changing them after each sample.
- 9) Do not mix reagents of different batches. Please use the product within the validity period.
- 10) Do not eat, drink, smoke, apply cosmetics or handle contact lenses in areas where reagents and human specimens are handled
- 11) Results should be interpreted by a trained professional in conjunction with the patient's history and clinical signs and symptoms, and epidemiological risk factors.
- 12) Ensure laboratory equipment is calibrated and maintained in accordance with the laboratory's procedure.
- 13) When test results are transmitted from the laboratory to an informatics centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.

DISPOSAL OF WASTE

Disposal of waste must be carried out according to national and local regulations in force.

BIBLIOGRAPHY

See the references at the end of this document.

TABLE OF SYMBOLS

See the table of symbols at the end of this document.

The product is available in the various configurations listed below. There may be additional product ref. numbers as well. For an updated listing of available products, visit liofilchem.com

Product	Format	Packaging	Ref.
Mueller Hinton II Broth	Tube	20 x 10 ml	24107
		100 x 7 ml	26177
		20 x 3.6 ml	27504
	Bottle	6 x 100 ml	402020
	Dehydrated media	500 g	610218
		100 g	620218

Significant changes from previous version (Rev.3 / 01.03.2017):

Document	Release Date	Change Summary
24107_IFU(4)	2022-12-16	Updated layout and content in compliance with IVDR 2017/746 Updated ordering info

This IFU document and the SDS are available from the online Support Center:

liofilchem.com/ifu-sds



Mueller Hinton II Broth

Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth per i test di sensibilità antimicrobica dei batteri che crescono aerobicamente.

DESTINAZIONE D'USO

Terreno liquido per l'antibiogramma quantitativo di microrganismi aerobi a rapida crescita con tecniche di diluizione in brodo, come standardizzato dal CLSI.

DESCRIZIONE

Mueller Hinton II Broth (MH II broth o cation-adjusted MHB) è il terreno consigliato per la determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) di batteri aerobi a crescita rapida comunemente isolati mediante procedure di diluizione del brodo.

Questo terreno è stato formulato in modo da avere un basso contenuto di timina e timidina ed è adattato alle concentrazioni di ioni calcio e magnesio. È conforme alle raccomandazioni del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

FORMULA TIPICA (*)

	(g/l)
Estratto di Manzo	3.0
Idrolizzato Acido di Caseina	17.5
Amido	1.5
pH finale 7.3 ± 0.1 at 25°C	

*Modificato e/o corretto secondo necessità con sali appropriati per fornire le seguenti concentrazioni di ioni e soddisfare le specifiche prestazionali secondo ISO/TS 16782: 20-25 mg/l di calcio, 10-12,5 mg/l di magnesio, manganese e zinco rispettivamente inferiori a 8 mg/l e 3 mg/l.

PRINCIPIO DEL METODO

Idrolizzato acido di caseina ed estratto di manzo forniscono aminoacidi, azoto, carbonio, vitamine, minerali ed altri nutrienti che supportano la crescita dei microrganismi. Questi ingredienti sono stati selezionati per il basso contenuto di timina e timidina, determinato dai valori MIC ottenuti con *Enterococcus faecalis* e sulfametoxazolo-trimetoprim (SXT). L'amido agisce come sostanza colloidale protettiva contro molecole tossiche eventualmente presenti nel terreno. L'idrolisi dell'amido durante la sterilizzazione in autoclave fornisce una piccola quantità di glucosio, fonte di energia. Le concentrazioni di ioni calcio e magnesio sono corrette per fornire le quantità raccomandate da CLSI per ottenere i valori CMI corretti con aminoglicosidi e *Pseudomonas aeruginosa*.

Metodi di diluizione in brodo, macrodiluizione e microdiluizione, sono utilizzati per misurare quantitativamente l'attività in vitro di agenti antimicrobici nei confronti di un dato isolato batterico. Per effettuare il test, viene allestita una serie di provette/pozzetti contenenti un terreno in brodo al quale sono aggiunti gli agenti antimicrobici a diverse concentrazioni. Le/i provette/pozzetti sono quindi inoculate/i con una sospensione standardizzata del microrganismo da testare. Dopo incubazione a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, i test sono esaminati per determinare il valore di MIC.

PREPARAZIONE

Terreno disidratato

Sospendere 22 g di polvere in 1 litro di acqua distillata o deionizzata sterile. Mescolare bene. Riscaldare agitando di frequente e bollire fino a completa dissoluzione. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 10 minuti.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Forniture e apparecchiature microbiologiche standard come: autoclave, provette, anse da inoculo, tamponi, incubatore, microrganismi per il controllo qualità.

CAMPIONI

I campioni devono essere ottenuti prima della terapia antimicrobica (ove possibile) e consegnati prontamente al laboratorio per l'esame. I campioni clinici non vengono inoculati direttamente in MH II broth. Il microrganismo da testare deve essere prima isolato su un terreno solido non selettivo, come l'agar sangue o il tryptic soy agar (TSA). Fare riferimento alle linee guida specifiche per informazioni più dettagliate.

PROCEDURA DEL TEST

1. Preparare gli agenti antimicrobici in diluizioni seriali a raddoppio in Mueller Hinton II Broth.
2. Preparare una sospensione standardizzata del microrganismo da testare utilizzando il metodo diretto o il metodo di crescita.
3. Distribuire in ciascun/a pozzetto/provetta il volume adeguato di sospensione di inoculo e miscelare.
4. Incubare le provette o la piastra multipozzetto in atmosfera aerobica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 16-20 ore.

Per informazioni più dettagliate, consultare la guida appropriata.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione la presenza di torbidità indica la crescita dell'organismo. La più bassa concentrazione di agente antimicrobico che non mostra crescita è la MIC di quell'organismo per quell'agente.

Interpretare il valore di MIC facendo riferimento al documento M100 più recente del CLSI e riportare il microrganismo in esame come sensibile, intermedio o resistente agli agenti antimicrobici testati.

CONSERVAZIONE

La polvere è fortemente igroscopica, conservare a $10-30^\circ\text{C}$, in ambiente asciutto, nel suo contenitore originale chiuso ermeticamente. Conservare provette e flaconi a $10-25^\circ\text{C}$ al riparo dalla luce. Non usare il prodotto dopo la sua data di scadenza indicata sull'etichetta o se il prodotto mostra segni di contaminazione o deterioramento.

VALIDITÀ

Terreno disidratato: 4 anni.

Terreno in provette/flaconi: 2 anni.

CONTROLLO QUALITÀ

Aspetto del terreno disidratato: omogeneo, fine granulometria, privo di materiali estranei.

Aspetto del terreno preparato: da pallido a giallo chiaro, da limpido a leggermente velato.

Risultati attesi dei test colturali:

Ceppi di controllo	Inoculo	Incubazione	Criteri
<i>Enterococcus faecalis</i>	10-100 UFC/ml	16-20 h / $35 \pm 2^\circ\text{C}$	Crescita buona
WDCM 00087 (ATCC® 29212; NCTC 12697)			
<i>Escherichia coli</i>			
WDCM 00013 (ATCC® 25922; NCTC 12241)			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
WDCM 00025 (ATCC® 27853; NCTC 12903)			
<i>Staphylococcus aureus</i>			
WDCM 00131 (ATCC® 29213; NCTC 12973)			

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

I test di performance del MH II broth è stato eseguito utilizzando i ceppi CR sopra elencati. I risultati ottenuti hanno soddisfatto i criteri stabiliti.

LIMITAZIONI

Risultati non validi possono essere causati da una scarsa qualità del campione, da una raccolta impropria del campione, da un trasporto improprio, da un processamento improprio in laboratorio o da una limitazione della tecnologia di analisi. L'operatore deve comprendere i principi delle procedure, compresi i limiti nelle prestazioni, prima delle singole operazioni per evitare potenziali errori.

A causa della variazione nutrizionale, alcuni ceppi possono causare una scarsa crescita o non riuscire a crescere in questo terreno. Ad esempio, i microrganismi che richiedono timina e timidina potrebbero non crescere. Anche i microrganismi esigenti come le specie di *Streptococcus*, *Haemophilus* e *Neisseria* non crescono o mostrano una crescita mediocre nel MH II broth.

L'efficacia di questo terreno non è stata stabilita per tutti i microrganismi che potrebbero essere isolati da campioni clinici. Se la crescita è inadeguata (ovvero torbidità non visibile ad occhio nudo) i valori di MIC potrebbero non essere validi. Includere sempre una provetta o un pozzetto di controllo della crescita che

contenga il terreno inoculato ma senza agente antimicrobico. Se non si osserva alcuna crescita, ripetere il test o utilizzare una procedura alternativa.

La sensibilità in vitro di un organismo a uno specifico agente antimicrobico non significa che sarà efficace come agente terapeutico in vivo.

MH II broth non è adatto per i test di sensibilità di microrganismi esigenti. Per i test MIC di microrganismi esigenti come *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Streptococcus pneumoniae*, utilizzare terreni adeguati secondo il metodo di riferimento.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- 1) **Per uso diagnostico in vitro (IVD).**
- 2) **Solo per uso professionale di laboratorio.**
- 3) Gli operatori devono essere formati e avere una certa esperienza. Si prega di leggere attentamente le istruzioni prima di utilizzare il prodotto. L'affidabilità dei risultati del test non può essere garantita in caso di deviazioni dalle istruzioni contenute in questo documento.
- 4) Consultare la scheda di sicurezza (SDS) per informazioni sui pericoli e sulle pratiche di manipolazione sicure.
- 5) Non utilizzare se il prodotto o la confezione sembrano danneggiati.
- 6) Seguire le precauzioni standard. Tutti i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infetti e maneggiati di conseguenza.
- 7) Maneggiare tutti i campioni come infetti utilizzando procedure di laboratorio sicure. Smaltire materiali pericolosi o biologicamente contaminati secondo le pratiche del proprio istituto.
- 8) Evitare la contaminazione incrociata dei campioni utilizzando puntali monouso e sostituendole dopo ogni campione.
- 9) Non mescolare reagenti di lotti diversi. Si prega di utilizzare il prodotto entro il periodo di validità.
- 10) Non mangiare, bere, fumare, applicare cosmetici o maneggiare lenti a contatto nelle aree in cui vengono manipolati reagenti e campioni umani.
- 11) I risultati devono essere interpretati da un professionista qualificato insieme alla storia del paziente, ai segni e sintomi clinici e ai fattori di rischio epidemiologici.
- 12) Assicurarsi che le apparecchiature di laboratorio siano calibrate e mantenute in conformità con la procedura del laboratorio.
- 13) Quando i risultati dei test vengono trasmessi dal laboratorio a un centro informatico, è necessario prestare attenzione per evitare trasferimenti di dati errati.

SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

Lo smaltimento dei rifiuti deve essere effettuato in conformità alle normative nazionali e locali in vigore.

BIBLIOGRAFIA

Vedere i riferimenti alla fine di questo documento.

TABELLA DEI SIMBOLI

Vedere la tabella dei simboli alla fine di questo documento.

Il prodotto è disponibile in diverse configurazioni. Vedere l'elenco nella lingua inglese.

Questo documento IFU e la SDS sono disponibili dal Support Center online: liofilchem.com/ifu-sds

