



BD Mueller Hinton Chocolate Agar

AVSEDD ANVÄNDNING

BD Mueller Hinton Chocolate Agar (BD Mueller Hinton chokladagar) används för isolering och kultivering av svårödlade mikroorganismer från kliniska prover. Den kan även användas för resistensbestämning hos *Neisseria gonorrhoeae*.

PRINCIPER FÖR OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDEN

Mikrobiologisk metod.

På grund av att mikrobiologiska laboratorier i början av 1960-talet använde flera olika procedurer vid resistensbestämning av bakterier för antibiotika och kemoterapeutiska medel, utvecklade Bauer, Kirby och andra en standardiserad procedur i vilken Mueller Hinton-agar, ett medium som ursprungligen var uttänkt för isoleringen av gonokocker, utvaldes som testmedium.¹⁻⁴ En efterföljande internationell kollaborativ studie bekräftade värdet av Mueller Hinton-agar för detta syfte på grund av mediets relativt goda reproducerbarhet, formuleringens enkelhet och det överflöd av experimentella data som hade ackumulerats med användning av detta medium.⁵

Enligt CLSI är Mueller Hinton-agar med 5 % fårblod det rekommenderade mediet för resistensbestämning vid diskdiffusionstest av *Streptococcus pneumoniae*. Det rekommenderade mediet för *Haemophilus influenzae* är Haemophilus Test Medium (HTM)-agar. Tolkningskriterier finns i CLSI-dokumentet M100 (M2) som inkluderas i CLSI-dokumentet M¹⁰, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard.⁶ Det rekommenderade mediet för *Neisseria gonorrhoeae* är GC-agar med ett specifikt tillväxsupplement. Enligt andra data kan Mueller Hinton-agar med hemin och Iso-VitaleX användas för rutinmässig resistensbestämning hos *N. gonorrhoeae* mot penicillin och spectinomycin.⁷

Mueller Hinton-agar, supplemerad med upphettat blod eller hemoglobin och tillväxtfaktorer (t.ex. **BD IsoVitaleX**), har rekommenderats som icke-selektivt medium för isolering av *Neisseria* and *Haemophilus*.⁸

I **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** utgörs näringsämnena av nötextrakt och kasein. Stärkelse absorberar toxiska föreningar, såsom fettsyror från bomullspinnar. Faktor X tillförs av hemoglobin. **BD IsoVitaleX** tillför vitaminer och tillväxtfaktorer, inklusive Faktor V (=NAD) som är nödvändigt för tillväxt av *Haemophilus influenzae*.

REAGENSER

BD Mueller Hinton Chocolate Agar

Sammansättning* per liter aqua purif.

Nötextrakt	2,0 g
Kaseinhydrolysat	17,5
Stärkelse	1,5
Hemoglobin	10,0
IsoVitaleX	10,0 ml
Agar	17,0 g

pH 7,3 +/- 0,2

*Justerad och/eller kompletterad efter behov för att uppfylla prestandakriterierna.

BD IsoVitalex-berikning innehåller följande tillväxtfaktorer (sammansättning* per liter renat vatten):

Vitamin B ₁₂	0,01 g
L-glutamin	10,0
Adenin	1,0
Guaninhydroklorid	0,03
p-aminobenzoesyra	0,013
Nikotinamidadenindinukleotid (NAD)	0,25
Tiaminpyrofosfat	0,1
Järnnitrat	0,02
Tiaminhydroklorid	0,003
Cysteinhydroklorid	25,9
L-cystin	1,1
Glukos	100,0

*Justerad och/eller kompletterad efter behov för att uppfylla prestandakriterierna.

FÖRSIKTIGHETSBEAKTANDEN

IVD . Endast för professionellt bruk. ⚠

Plattorna får inte användas om de visar tecken på mikrobiell kontamination, missfärgning, uttorkning, sprickbildning eller annan försämring. Svår krympning av detta medium på grund av uttorkning kan leda till falska resistensresultat.

Se skriften **ALLMÄNNA INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDNING** för information om aseptiska förfaranden vid hantering, biorisker och bortskaffning av använd produkt.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

Förvara plattorna mörkt vid 2 till 8 °C i originalomslaget efter mottagandet fram till dess de skall användas. Överhettning och nedfrysning skall undvikas. Plattorna kan inokuleras fram till utgångsdatum (se etiketten på förpackningen) och inkuberas under rekommenderad inkubationsperiod.

Plattor från öppnade 10-plattsförpackningar kan användas i en vecka vid förvaring i ren miljö vid 2 till 8 °C.

KVALITETSKONTROLL UTFÖRD AV ANVÄNDAREN

Inokulera representativa prover med följande stammar (för ytterligare information hänvisas till skriften **ALLMÄN BRUKSANVISNING**). Inkubera plattorna vid 35 ± 2 °C i en aerob miljö kompletterad med koldioxid. Avläs plattorna efter 18 till 24 respektive 42 till 48 h inkubation.

Stammar	Växtresultat
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	God till utmärkt växt
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 43069	Ansenlig till utmärkt växt
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	God till utmärkt växt
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	God till utmärkt växt
Inte inokulerad	Chokladbrun, opak, kan vara något oenhetlig

För inokulering och inkubation vid resistensbestämningar, se **Testförfarande**.

Teststam	Lapp för resistensbestämning	Zonstorlek * (mm)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226	Penicillin P-10	33 – 40
	Spectinomycin SPT-100	25 – 31

* Zonstorlekarna baseras på resultat från minst 3 olika batcher av **BD Mueller Hinton Chocolate Agar**

FÖRFARANDE

Tillhandahållt material

BD Mueller Hinton chokladagar (90 mm **Stacker**-plattor). Mikrobiologiskt kontrollerade.

Material som inte medföljer

Extra odlingsmedier, reagenser och laboratorieutrustning efter behov.

Provtyper

BD Mueller Hinton Chocolate Agar kan principiellt användas för alla typer av prover från misstänkta infektioner orsakade av svårodlade organismer, speciellt men inte endast från prover från primärt sterila kroppsställen (t.ex. cerebrospinalvätska, abscesser) och som media för subkultivering från blododlingar. Dess huvudsakliga användning är för icke-selektiv isolering av *Neisseria*, *Haemophilus* och andra bakterier som inte kan växa på rutinmässig blodagarmedia, såsom Columbiaagar med 5 % fårblod. (se också **KLINISKA PRESTANDA OCH PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR**).

Användning av detta medium för rutinmässig resistensbestämning hos *Neisseria gonorrhoeae* med penicillin G och spectinomycin kräver att rena kulturer används. Inokulera inte med provet för direkt resistensbestämning!

Provtagning och transport

Neisseria gonorrhoeae, *N. meningitidis*, *Haemophilus* och andra svårodlade organismer är känsliga för negativa miljöförhållanden. Följaktligen måste lämplig transportmedia användas för alla prover. Proverna måste skickas till laboratoriet så fort som möjligt och får inte vara äldre än 24 h, även om transportmedia används. Den optimala transporttemperaturen är 20 to 25 °C. Får inte kylskåpsförvaras!^{9, 10}

Testförfarande

För isolering av svårodlade organismer, stryk ut provet så snart som möjligt efter att det ankommit till laboratoriet. Plattan med utstryket används primärt för isolering av renkulturer från prover med blandflora.

Vid odling direkt från provtagningspinne rullas istället pinnen över ett litet område på ytan nära kanten varefter plattan stryks från det inokulerade området.

Om provet har tagits från ett kroppsställe med normalflora, bör det inokuleras på lämpliga selektiva media beroende på det patogena agens som ska isoleras. För *Neisseria gonorrhoeae*, bör en **BD Martin-Lewis Agar**, modifierad eller en **BD GC-Lect Agar**-platta användas, och för *Haemophilus* bör en **BD Chocolate Agar with IsoVitaleX and Bacitracin**-platta inkluderas. Inkubera plattorna vid 35 ± 2 °C i en aerob miljö kompletterad med koldioxid. Avläs plattorna efter 18 till 24 respektive 42 till 48 h inkubation.

För rutinmässig resistensbestämning hos *N. gonorrhoeae* suspenderas isolatet, som måste vara en renkultur, i **BD Trypticase Soy Broth** för att motsvara grumligheten hos McFarland 0.5 standard. Inom 15 minuter efter det att inokulatets grumlighet har justerats skall en steril odlingspinne sänkas ned i det korrekt spädda inokulatet och pressas och vridas ordentligt mot rörets övre insida flera gånger, så att överskottsvätska pressas ut.

Inokulera plattans hela agaryta tre gånger, vrid plattan 60° mellan utstryken för en jämn inokulation.

Applicera lapparna med hjälp av en applikator för antimikrobiella lappar under iakttagande av aseptiska försiktighetsbeaktanden. Placera lapparna så att mittpunkterna är minst 24 mm från varandra. Helst ska penicillinlapparna placeras så att de är minst 10 mm från petriskålens kant. Efter att lapparna har placerats på agarn skall de tryckas ned med en steril nål eller pincett så att de har fullständig kontakt med mediets yta. Detta steg är inte nödvändigt om lapparna avsatts med användning av **BD Sensi-Disc** 6- eller 8-plats självnedtryckande fördelare.

Inom 15 minuter efter det att lapparna har applicerats, vänd plattorna upp och ned och inkubera dem i en aerob miljö anrikad med 5 % koldioxid vid 35° till 37 °C under 24 h.

Resultat

Typisk kolonimorfologi på **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** är som följer:

<i>Haemophilus influenzae</i>	Små, fuktiga, pärlliknande med en karakteristisk "rättliknande" odör
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Små, gråaktiga-vita till färglösa, mukoida
<i>Neisseria meningitidis</i>	Medium till stora, blågrå, mukoida
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Små, flata eller större mukoida grönaktiga kolonier, medium omgivande kolonier kan vara grönaktiga

Resistensbestämning: Zonerna måste läsas från plattans övre del. Resistensbestämning mot penicillin ska utföras med betalaktamastest, t.ex. **BD Cefinase**-test.

KLINISKA PRESTANDA OCH PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

BD Mueller Hinton Chocolate Agar är ett berikat, icke-selektivt medium på vilket svårödlade och icke svårödlade bakterier, inklusive normal flora, växer. Därför rekommenderas att inokulera prover även på lämpliga selektiva media.

Termen "svårödlade bakterier" relaterar till bakterier som inte växer eller som inte växer bra på normalt använda primära isoleringsmedia innehållande fårblod, t.ex. *Haemophilus*, patogena *Neisseria* och flera andra organismer. För detaljerade beskrivningar av de provtyper som måste inokuleras på detta medium och de olika typer av organismer för vilka detta medium används för isolering, se referenserna.^{10, 11}

Detta medium har inte testats för att stödja tillväxt av näringsvarianter av streptokocker.

Antalet och typer av bakteriella species uppträdande som infektiös agens är mycket stort. Följaktligen måste detta mediums lämplighet först testas av användaren genom kultivering av rena kulturer innan mediet används rutinmässigt vid sällan isolerade eller nyligen beskrivna mikroorganismer.

Testzonernas storlek vid resistensbestämning på detta medium motsvarar inte helt de som anges i CLSI Standard M2⁶ som har registrerats från GC chokladagar med ett specifikt tillväxsupplement.

REFERENSER

1. Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
2. Ryan, K.J., F.D. Schoenkecht, and W.M.M. Kirby. 1970. Disc sensitivity testing. *Hospital Practice* 5:91-100.
3. Mueller, J.H., and J. Hinton. 1941. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 48: 330-333.
4. Barry, A.L., F. Garcia, and L.D. Thrupp. 1970. An improved single-disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly-growing pathogens. *Am. J. Clin. Pathol.* 53: 149-158.
5. Ericsson, H.M., and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B, Suppl.* 217.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Approved standard: M2. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA. Search for latest version at www.clsi.org
7. Berger, U. 1992. *Neisseriaceae*. In: *Mikrobiologische Diagnostik* (F. Burkhardt, ed.). Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
8. Nash, P., and M.M. Krenz. Culture media. In: *Manual of clinical microbiology*, (Balows, A., et al., eds.). 5th edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
9. Miller, J.M., and H.T. Holmes. 1995. Specimen collection, transport, and storage. In: Murray, P. R., 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.
10. Forbes, B.A., and P.A. Granato. 1995. Processing specimens for bacteria. 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.
11. P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.). 1995. *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

FÖRPACKNINGAR/TILLGÄNGLIGHET

BD Mueller Hinton Chocolate Agar

Kat. nr. 254035

Färdiga odlingsplattor, 20 st. per förpackning

Kat. nr. 254082

Färdiga odlingsplattor, 120 st. per förpackning

YTTERLIGARE INFORMATION

Kontakta närmaste BD-representant för ytterligare information.



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/>

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2011 BD