



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

USO PREVISTO

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood, disponibile su piastre di diversi formati, è utilizzato per i test di sensibilità con diffusione su dischetti per gli isolati clinici dello *Streptococcus pneumoniae* e di altri streptococchi secondo le direttive del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).¹

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodo microbiologico.

La tecnica di Bauer-Kirby è basata sulla diffusione su gel di agar di sostanze antimicrobiche di cui sono imbevuti alcuni dischetti di carta.² Questa metodica prevede che una sospensione standardizzata dell'organismo venga applicata su tutta la superficie del terreno. I dischetti di carta imbevuti di un dato quantitativo di antibiotico o altro agente antimicrobico sono disposti sulla superficie del terreno, la piastra viene incubata e infine si misurano le zone di inibizione intorno a ciascun disco. Per informazioni più dettagliate sulla tecnica di Bauer-Kirby, consultare il relativo standard qualitativo pubblicato dall'CLSI. Sono state stabilite anche altre norme nazionali per i test di sensibilità antimicrobica in base alla tecnica di Bauer-Kirby. In tali norme, la densità dell'inoculo, la tecnica di insemminazione, le dimensioni delle zone ottenute e il metodo di interpretazione possono discostarsi dallo standard CLSI. Poiché non esistono standard comuni europei per i test di sensibilità, attenersi agli standard vigenti a livello nazionale ove non sia possibile applicare i parametri dell'CLSI.

L'agar Mueller Hinton non corretto, benché sia adatto ai test di sensibilità dei patogeni aerobi a crescita rapida, non è adeguato per organismi più esigenti, tipo *Streptococcus pneumoniae*. Lo standard M2 CLSI raccomanda l'agar Mueller Hinton corretto con 5% di sangue defibrinato di montone e illustra nei dettagli sia la procedura per il controllo di qualità sia i criteri interpretativi per usarlo con *S. pneumoniae* e altri streptococchi.¹

REAGENTI

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood

Formula* per litro di acqua purificata

Estratto di carne bovina	2,0 g
Idrolizzato acido di caseina	17,5
Amido	1,5
Agar	17,0
Sangue defibrinato di montone	5%

pH 7,3 +/- 0,2

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro

IVD. Solo per uso professionale. Ⓢ

Non usare le piastre se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento, incrinature o altri segni di deterioramento. Un eccessivo restringimento del terreno dovuto a essiccamento può dare risultati di falsa sensibilità.

Per maneggiare i prodotti in condizioni asettiche, riconoscere i rischi biologici e smaltire i prodotti usati, consultare le **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**.

CONSERVAZIONE E VITA UTILE

Alla consegna, conservare le piastre al buio a 2 – 8 °C nella confezione originaria fino a immediatamente prima dell'uso. Evitare congelamento e surriscaldamento. Le piastre possono essere inoculate sino alla data di scadenza (v. l'etichetta sulla confezione) e incubate per i tempi di incubazione raccomandati.

Le piastre prelevate dalle confezioni da 10 già aperte possono essere usate per una settimana se conservate in luogo pulito a 2 – 8 °C.

CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Per il controllo di qualità a cura dell'utente, consultare il relativo standard CLSI¹ o, all'occorrenza, gli standard nazionali. Attenersi scrupolosamente alle metodiche descritte più avanti nella **Procedura del test**, inclusi ceppi di controllo e *S. pneumoniae* ATCC 49619, e controllare almeno due volte a settimana l'efficacia dei dischetti antimicrobici normalmente usati in laboratorio.

Il corretto diametro delle zone è riportato nella tabella 3A del documento M100 CLSI, allegato al documento M2 CLSI.¹

Aspetto del terreno inoculato: rosso (color sangue), opaco.

PROCEDURA

Materiali forniti

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (fornito su piastre di diversi formati, v. **Confezione/Disponibilità**). Microbiologicamente controllate.

Materiali non forniti

1. Brodo di inoculo in 5 ml, tipo brodo Mueller Hinton II (n. cat. BBL 4397701, provetta 16 x 102 mm) o soluzione fisiologica 0,9%, per preparazione dell'inoculo standard.
2. Standard di raffronto al solfato di bario (0,5 ml di 0,048 M BaCl₂ [1,175% peso/vol. BaCl₂ 2H₂O] aggiunti a 99,5 mL di 0,18 M [0,36 N] H₂SO₄ [1% vol/vol]).
3. Dispositivo fotometrico per regolare la torbidità della sospensione di inoculo in modo che sia equivalente allo standard McFarland 0,5.
4. In alternativa ai suddetti materiali (1-3), si può usare **BD Prompt Inoculation System** (dispositivo graduato per preparazione dell'inoculo).^{1,3}
5. Coltura di controllo: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
6. Dischetti di carta imbevuti di quantità specifiche di agenti antimicrobici, tipo dischetti per prove di sensibilità **BD Sensi-Disc**.
7. Erogatore di dischetti, ad esempio il dispositivo con applicatore automatico **BD Sensi-Disc** da 6, 8 o 12 posti.
8. Dispositivo per misurare o valutare il diametro delle zone, tipo calibro o riga.
9. Incubatore in grado di generare un'atmosfera con 5% di CO₂, o altra apparecchiatura che produca una simile atmosfera arricchita di CO₂.
10. Terreni di coltura accessori, reagenti e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Tipi di campioni

Il prodotto è usato per i test di sensibilità delle colture pure isolate da campioni clinici (v. anche **CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**).

Procedura del test

Usare la sospensione diretta della colonia quando si esegue il test di *S. pneumoniae*.¹

Applicare le tecniche asettiche.

1. Assicurarsi che sia disponibile una coltura pura e fresca (della sera prima) su terreno non selettivo a base di agar sangue.
2. Sospendere la crescita in brodo tipo brodo Mueller Hinton II o soluzione fisiologica 0,9%. Regolare la torbidità in modo che sia equivalente allo standard del solfato di bario (McFarland 0,5). Confrontare la torbidità dello standard e quella dell'inoculo tenendo le due provette su fondo bianco con sottili linee nere, o utilizzando un dispositivo fotometrico.

3. Per i test di routine si sono dimostrati validi anche metodi alternativi di preparazione dell'inoculo che consentono la standardizzazione diretta degli inoculi senza regolazione della torbidità, tipo **BD Prompt Inoculation System**.^{1,3}
4. Entro 15 min dalla regolazione della torbidità dell'inoculo, immergere un tampone sterile nell'inoculo correttamente diluito e premendo sulla parte interna superiore della provetta ruotare il tampone più volte fino ad eliminare il liquido in eccesso.
5. Inoculare **BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood** strisciando tre volte l'intera superficie della piastra agar e ruotando ogni volta la piastra di 60° per ottenere un inoculo uniforme.
6. Riporre il coperchio e tenere la piastra a temperatura ambiente per almeno 3 min, ma non più di 15 min, per far assorbire l'umidità superficiale prima di applicare i dischetti imbevuti di farmaco. Non usare più di nove dischi per piastra da 150 mm, o più di quattro dischi per piastra da 90 e 100 mm. Per i test di *S. pneumoniae* rispetto alla penicillina, usare un disco da 1 µg di oxacillina.⁴
7. Incubare per 20 – 24 ore a 35 °C in atmosfere con 5% di CO₂.

Risultati

Dopo l'incubazione, deve notarsi un'area di crescita convergente. La sola crescita di colonie isolate indica che l'inoculo è troppo leggero e il test deve essere ripetuto.

Misurare (a occhio nudo) il diametro delle zone di totale inibizione, incluso il diametro del disco, arrotondando al millimetro e utilizzando un calibro a corsoio o una riga, dalla parte superiore della piastra senza il coperchio.⁵ Il margine è delimitato dall'area priva di segni evidenti di crescita rilevabili a occhio nudo. Ignorare la crescita indistinta delle colonie più piccole, che sono appena rilevabili in prossimità del margine della zona di evidente inibizione.

Se si usa **BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood**, misurare la zona di inibizione della crescita, non la zona di inibizione dell'emolisi.

Calcolo e interpretazione dei risultati

Confrontare i diametri delle zone con i valori riportati nella tabella 2G per *S. pneumoniae* e 2H per altri streptococchi nel Documento M100 (M2) CLSI, che fornisce i criteri interpretativi.¹ I risultati ottenuti possono essere registrati in termini di resistente, sensibile o a carattere intermedio. Rispettare i criteri interpretativi specifici per isolati di *S. pneumoniae* con diametri delle zone di oxacillina di 19 mm riportati dallo standard (v. anche **PERFORMANCE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**).

N.B. periodicamente vengono pubblicati i supplementi informativi del Documento M2-CLSI o le versioni rivedute, contenenti le tabelle aggiornate dei dischi antimicrobici e gli standard interpretativi. Per le raccomandazioni vigenti, consultare le tabelle più recenti. Tutti gli standard e i supplementi informativi possono essere richiesti al Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA. Telefono: ++1-610-688-1100.

PERFORMANCE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il test di sensibilità di diffusione su dischetti deve essere usato solo con colture pure. Prima di preparare il test di sensibilità, si raccomanda di procedere alla colorazione di Gram e all'identificazione presuntiva dell'isolato.¹

Il terreno è usato per i test di sensibilità di *S. pneumoniae* e altri streptococchi contro agenti antimicrobici selezionati.^{1,2,5} Tuttavia, per amoxicillina, ampicillina, cefepima, cefotaxime, ceftriaxone, cefuroxime, imipenem e meropenem non esistono criteri sicuri per quanto riguarda i test di diffusione su disco di *S. pneumoniae*. Il metodo migliore per determinarne l'attività *in vitro* di questi antibiotici è mediante MIC.¹

Per stabilire la sensibilità alla penicillina di *S. pneumoniae*, utilizzare un dischetto di oxacillina. Gli isolati di *S. pneumoniae* con diametri delle zone di oxacillina di 20 mm sono sensibili alla penicillina (MIC ≤ 0,06 mg/ml). Determinare il valore MIC di penicillina, meropenem e cefotaxime o ceftriaxone per tutti gli isolati di *S. pneumoniae* con zone di oxacillina di 19 mm perché tali zone con disco di screening per l'oxacillina sono presenti sia con ceppi penicillino-resistenti o intermedi sia con determinati ceppi sensibili.¹

Si sconsiglia il test dell'oxacillina per stabilire la sensibilità alla penicillina di streptococchi diversi da *S. pneumoniae*. Per streptococchi beta-emolitici, usare un dischetto di penicillina o

ampicillina. Il test di diffusione su dischetto di penicillina e oxacillina non è affidabile per streptococchi *viridans*: la loro sensibilità deve essere determinata con il test MIC.¹

Il test di sensibilità antimicrobica su dischetto di diffusione usando *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 è stato eseguito nei nostri laboratori con cefaclor, cefprozil, cloramfenicolo, eritromicina, ofloxacina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametossazolo e vancomicina. In base alle procedure di analisi descritte dal documento M2-A5, sono stati eseguiti 20 test con ceppo per controllo di qualità e 8 dischetti antimicrobici nell'arco di 10 giorni. Per gli otto agenti antimicrobici, tutte le dimensioni (160/160) delle zone rientravano nella gamma di valori attesi riportati dall'M2-A5 e dalla tabella 3C del Documento M100-S6 NCCLS.^{6,7} La deviazione standard per la tetraciclina è stata inferiore a 1 mm e per tutti gli altri antibiotici meno di 2 mm.⁸ Gli studi di riproducibilità (3 volte al giorno per 3 giorni) sono stati eseguiti sul campo presso due siti utilizzando i precedenti antibiotici contro *S. pneumoniae* ATCC 49619 e altri nove ceppi ben caratterizzati di *S. pneumoniae*. A ogni agente antimicrobico sono stati applicati gli standard interpretativi del diametro delle zone riportati dalla tabella 2C del Documento M2-A5 NCCLS e dal Supplemento M100-S6.^{6,7} I test con cloramfenicolo, eritromicina, ofloxacina, tetraciclina e vancomicina sono risultati in oltre il 95% dei casi conformi al metodo di riferimento NCCLS. I test con trimetoprim-sulfametossazolo sono risultati nel 90% dei casi conformi al metodo di riferimento NCCLS. Non è stato possibile determinare la riproducibilità per cefaclor e cefprozil a causa della mancanza di standard interpretativi per questi due antibiotici. Alla luce degli studi riportati in precedenza, si sconsiglia di usare cefaclor, cefprozil o trimetoprim-sulfametossazolo su questo terreno per i test di *S. pneumoniae*. Nelle pubblicazioni, inoltre, è stato riportato un numero eccessivo di errori di interpretazione nei test di diffusione su dischetto con trimetoprim-sulfametossazolo su piastre di agar Mueller Hinton con sangue di montone.⁹

In alcune combinazioni organismo-agente antimicrobico, la zona di inibizione può mostrare margini indistinti che potrebbero indurre a errori di interpretazione.

Tra i numerosi fattori in grado di influenzare i test di sensibilità su dischetti di diffusione figurano il terreno, lo spessore dell'agar, l'attività del dischetto, la concentrazione e l'età dell'inoculo e il pH.²

Se la concentrazione dell'inoculo è inadeguata, può dare risultati errati. Le zone di inibizione possono apparire esigue se l'inoculo è troppo pesante, o vaste e difficilmente misurabili se l'inoculo è troppo leggero.

Una errata conservazione dei dischetti antimicrobici può causare perdita di attività e falsi risultati di resistenza.

La sensibilità *in vitro* di un organismo a un dato agente antimicrobico non implica necessariamente che l'antibiotico sia efficace anche *in vivo*. Per l'interpretazione dei risultati, consultare le relative voci della bibliografia.^{2,10}

Non usare il terreno per test di sensibilità di batteri diversi da *S. pneumoniae* e streptococchi beta-emolitici.

BIBLIOGRAFIA

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
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*: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th 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.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (piastre impilate **Stacker da 90 mm)**

N. di cat. 254030 Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 20
 N. di cat. 254080 Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 120

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood (100 mm)

N. di cat. 254507 Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 10

BD Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood, Square (120 x 120 mm)

N. di cat. 254517 Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 20

ULTERIORI INFORMAZIONI

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.



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. © 2013 BD