



BD Mueller Hinton II Agar BD Mueller Hinton II Agar 150 mm BD Mueller Hinton II Agar, Square

USO PREVISTO

BD Mueller Hinton II Agar, disponibile su piastre di diversi formati, è utilizzato per la procedura standardizzata di diffusione su dischetto per valutare la sensibilità agli agenti antimicrobici degli isolati clinici degli aerobi a crescita rapida secondo le direttive del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e dello European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, comitato europeo sui test di sensibilità antimicrobica).^{1,2}

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodo microbiologico.

Nei primi anni Sessanta, i laboratori di microbiologia clinica utilizzavano diverse procedure per valutare la sensibilità dei batteri ad antibiotici e chemioterapici; per tale ragione, Bauer, Kirby e altri elaborarono una procedura standardizzata usando come terreno per test l'agar Mueller Hinton, una base originariamente allestita per l'isolamento dei gonococchi.¹⁻⁵ Un successivo studio collaborativo internazionale ha confermato il valore dell'agar Mueller Hinton per la discreta riproducibilità del terreno, la semplicità della sua formula e la massa di dati sperimentali raccolti grazie ad esso.⁶

Per informazioni più dettagliate sulla tecnica di Bauer-Kirby, consultare i relativi standard qualitativi pubblicati dal CLSI e dall'EUCAST.^{7,8} 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 i criteri di interpretazione possono discostarsi dalle raccomandazioni del CLSI e dell'EUCAST.

La tecnica di Bauer-Kirby è basata sulla diffusione su gel di agar di sostanze antimicrobiche di cui sono imbevuti alcuni dischetti di carta.⁹ A differenza dei primi metodi, in cui dischetti con concentrazioni antimicrobiche alte e basse venivano interpretati alla luce della presenza o assenza di zone di inibizione, questa tecnica impiega dischetti con una sola concentrazione di agente antimicrobico e i diametri delle zone sono messi in rapporto con le concentrazioni minime inibenti (MIC).^{1-3,7-9}

Questa metodica prevede che una sospensione standardizzata dell'organismo venga applicata su tutta la superficie del terreno. I dischetti di carta imbevuti di una data concentrazione di antibiotico o altro agente antimicrobico sono disposti sulla superficie del terreno, la piastra viene messa in incubazione e infine vengono misurate le zone di inibizione intorno a ciascun dischetto. L'organismo viene riportato con le definizioni "sensibile" (S), "intermedio" (I) o "resistente" (R) a un dato agente mettendo a confronto le dimensioni delle zone ottenute con quelle riportate nelle tabelle 2A – 2D nel Documento M100 (M2) CLSI.¹⁰ Per stabilire se l'organismo è sensibile (S) o resistente (R) a un dato agente, le dimensioni delle zone ottenute vengono confrontate con quelle elencate nelle tabelle dei breakpoint dell'EUCAST.¹¹

Sono stati individuati diversi fattori che influenzano il test di sensibilità mediante diffusione su dischetto: come il terreno, l'eccessiva umidità del terreno, lo spessore dell'agar, l'attività del dischetto, la concentrazione dell'inoculo, il pH e la produzione di beta-lattamasi da parte degli organismi testati.^{6-9,12}

BD Mueller Hinton II Agar contiene una bassa concentrazione di timina e timidina e un livello controllato di calcio e magnesio.¹⁵⁻¹⁷ I livelli di timina e timidina nei materiali non trattati sono misurati con la tecnica di diffusione su dischetto imbevuto di trimetoprim-sulfametossazolo (SXT) ed *Enterococcus faecalis* ATCCTM 29212. Le concentrazioni di calcio e magnesio sono controllate analizzando i materiali non trattati e, all'occorrenza, aggiungendo fonti di calcio e/o magnesio per regolare il diametro delle zone con aminoglicosidi e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

La profondità dell'agar di ciascuna piastra di **BD Mueller Hinton II Agar** è stata compensata per soddisfare le raccomandazioni del CLSI e dell'EUCAST.^{7,8}

REAGENTI

BD Mueller Hinton II Agar

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

pH 7,3 +/- 0,2

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

PRECAUZIONI

IVD . Solo per uso professionale. 

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

Consultare le **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO** su come gestire le procedure in condizioni asettiche, conoscere i rischi biologici e smaltire i prodotti usati.

CONSERVAZIONE E DURATA

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 fino alla data di scadenza (vedere l'etichetta sulla confezione) e incubate per i tempi 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 i relativi standard CLSI¹⁰ ed EUCAST¹⁸ o, all'occorrenza, gli standard nazionali. Inoculare i campioni rappresentativi con i ceppi di seguito elencati su ciascun terreno (per informazioni più dettagliate, consultare **Tipi di campioni** e **Procedura del test**). Incubare le piastre, preferibilmente capovolte, rispettando le temperature, i tempi e le condizioni atmosferiche indicati sotto. Controllare almeno due volte a settimana le piastre di **BD Mueller Hinton II Agar** e i dischetti antimicrobici utilizzati per valutarne lo stato di efficienza.

Tabella 1: Risultati attesi per gli intervalli dei diametri della zone di inibizione dei ceppi di controllo di qualità secondo il CLSI¹⁹ e l'EUCAST²⁰

Ceppo	Agente antimicrobico	Intervallo (mm)	Incubazione
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ¹	Ampicillina (10 µg)	15-22	CLSI: 16 – 18 h, 35±2 °C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1 °C
	Imipenem (10 µg)	26-32	
	Gentamicina (10 µg)	19-26	
	Amicacina (30 µg)	19-26	
	Ciprofloxacina (5 µg)	30-40	
	Trimetoprim-sulfametossazolo SXT (1,25 µg – 23,75 µg)	23-29	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 ¹	Amoxicillina/acido clavulanico (30 µg)	17-22	CLSI: 16 – 18 h, 35±2 °C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1 °C
	Ampicillina/sulbactam (30 µg)	13-19	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 ²	Trimetoprim-sulfametossazolo (1,25 µg – 23,75 µg)	26-34	CLSI: 16 – 18 h, 35±2 °C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1 °C
	Ciprofloxacina (5 µg)	19-25	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ³	Tetraciclina (30 µg)	24-30	CLSI: 16 – 18 h, 35±2 °C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1 °C
	Gentamicina (10 µg)	19-27	
	Eritromicina (15 µg)	22-30	
	Clindamicina (2 µg)	24-30	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 ²	Tetraciclina (30 µg)	23-31	CLSI: 16 – 18 h, 35±2 °C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1 °C
	Gentamicina (10 µg)	19-25	
	Eritromicina (15 µg)	23-29	
	Clindamicina (2 µg)	23-29	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ¹	Aztreonam (30 µg)	23-29	CLSI: 16 – 18 h, 35±2 °C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1 °C
	Amicacina (30 µg)	18-26	
	Gentamicina (10 µg)	17-23	
	Imipenem (10 µg)	20-28	
Non inoculati	Da incolore ad ambra chiaro		

¹: Risultati per i ceppi di controllo di qualità secondo il CLSI e l'EUCAST

²: Risultati per i ceppi di controllo di qualità secondo l'EUCAST

³: Risultati per i ceppi di controllo di qualità secondo il CLSI

PROCEDURA

Materiali forniti

BD Mueller Hinton II Agar (fornito su piastre di diversi formati, v. **Confezione/Disponibilità**). Microbiologicamente controllate.

Materiali non forniti

- Secondo il CLSI: Brodo di inoculo in provetta, tipo **BD Trypticase™ Soy Broth** (brodo di estratto di caseina di soia) o brodo Mueller Hinton II (con compensazione dei cationi), per la preparazione di un inoculo standard, e brodo sterile o soluzione fisiologica per la diluizione dell'inoculo.⁷
Secondo l'EUCAST: Soluzione salina 0,9% (5 mL) per la preparazione dell'inoculo standard.⁸
- 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.] oppure
- 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** (un dispositivo graduato per la preparazione dell'inoculo).^{7,8,25}
5. Colture di controllo secondo il CLSI: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.¹⁰
Colture di controllo secondo l'EUCAST: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 e ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e ATCC 51299, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Staphylococcus aureus* NCTC 12493.¹⁸
6. Dischetti di carta imbevuti di quantità specifiche di agenti antimicrobici,^{7,8} come i dischetti per test di sensibilità **BD Sensi-Disc™**.
7. Erogatore di dischetti, come ad es. il dispositivo **BD Sensi-Disc** da 6, 8 o 12 posti. È disponibile anche un erogatore per piastre quadrate con agar Mueller Hinton II.
8. Riga o altro dispositivo per misurare in millimetri le dimensioni delle zone.
9. 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**). È stata avanzata l'ipotesi di eseguire i test di sensibilità antimicrobica direttamente su emocoltura e urinocoltura; i test, tuttavia, devono essere ripetuti e confermati con colture pure.²¹⁻²⁴

Procedura del test

La metodologia descrive il metodo di sospensione diretta delle colonie raccomandato dal CLSI⁷ e dall'EUCAST⁸:

1. Assicurarsi che sia disponibile una coltura pura e fresca (della sera prima) su un terreno non selettivo, come l'agar sangue.
Secondo il CLSI: Per gli abituali test di sensibilità, l'inoculo si può preparare direttamente con una sospensione di colonie in brodo o soluzione fisiologica.
Secondo l'EUCAST: Per gli abituali test di sensibilità, l'inoculo si può preparare direttamente con una soluzione fisiologica di più colonie morfologicamente simili.
2. Portare immediatamente la sospensione alla torbidità degli standard al solfato di bario (McFarland 0,5) senza incubazione. Confrontare la torbidità dello standard e quella dell'inoculo tenendo le due provette su un fondo bianco con sottili linee nere, o utilizzando un dispositivo fotometrico.
3. Per i test di routine si sono dimostrati validi anche metodi alternativi per la preparazione dell'inoculo che consentono la standardizzazione diretta degli inoculi senza regolazione della torbidità, ad esempio **BD Prompt Inoculation System**.²⁵
4. Idealmente, l'inoculo va usato entro 15 minuti. In ogni caso, la sospensione deve essere utilizzata entro 60 minuti dalla preparazione. Immergere un tampone sterile nell'inoculo correttamente diluito e, premendo sulla parte interna superiore della provetta, ruotare il tampone più volte con decisione per eliminare il liquido in eccesso ed evitare un'inoculazione eccessiva.
5. Inoculare tre volte l'intera superficie di una piastra agar, girando ogni volta la piastra di 60° per ottenere un inoculo uniforme.
6. Secondo il CLSI: Prima di applicare i dischetti imbevuti di agente antimicrobico, scostare il coperchio per 3 – 5 min e lasciare la piastra a temperatura ambiente per non più di 15 min per far assorbire l'umidità della superficie. Applicare i dischetti mediante un erogatore di dischetti antimicrobici, adottando le opportune tecniche asettiche. Depositare i dischetti in modo tale che la distanza tra i rispettivi centri sia di almeno 24 mm.
Secondo l'EUCAST: Entro 15 minuti dall'inoculazione, applicare i dischetti sulla piastra essiccata adottando le opportune tecniche asettiche. Porre al massimo sei dischetti sulla piastra.

7. Dopo aver posto i dischetti sull'agar, applicarli con un ago o con pinze sterili affinché siano completamente a contatto con la superficie del terreno. Questo passaggio non è necessario se i dischetti vengono applicati usando gli erogatori con applicatore automatico **BD Sensi-Disc**.
8. Entro 15 minuti dall'applicazione dei dischetti, invertire le piastre e collocarle nell'incubatore. Non incubare le piastre a concentrazioni crescenti di anidride carbonica. Per le condizioni di incubazione raccomandate, fare riferimento al CLSI e all'EUCAST.^{7,8,10,11}

Letture dei risultati

1. Dopo l'incubazione, deve apparire una crescita "erbosa" convergente. La sola crescita di colonie isolate indica che l'inoculo era troppo leggero; in tal caso, il test deve essere ripetuto.
2. Secondo il CLSI: Misurare (a occhio nudo) il diametro delle zone di totale inibizione, incluso il diametro del dischetto, e arrotondare al millimetro, utilizzando un calibro a corsoio, una riga, o un calibro sagomato predisposto a tal fine. Il dispositivo di misura è posto alla base della piastra capovolta su un fondo nero non riflettente ed è illuminato dall'alto.⁷
Secondo l'EUCAST: Misurare (a occhio nudo) il diametro delle zone di totale inibizione, incluso il diametro del dischetto, e arrotondare al millimetro, utilizzando un calibro a corsoio o una riga. Il dispositivo di misura è posto alla base della piastra capovolta su un fondo nero illuminato con luce riflessa. La piastra è tenuta a circa 30 cm dagli occhi.⁸
3. Assumere come endpoint l'area che non evidenzia alcuna crescita visibile a occhio nudo. Ignorare la crescita debole di colonie minute rilevabili con difficoltà all'estremità della zona di inibizione evidente.
4. Secondo il CLSI: Lo *Staphylococcus aureus* testato con dischetti di oxacillina costituisce un'eccezione, così come gli enterococchi testati con vancomicina. In questi casi, usare la luce trasmessa per individuare l'alone di crescita intorno al dischetto caratteristico dei ceppi MRSA resistenti "occulti" o degli enterococchi resistenti alla vancomicina.^{7,26} Con *Proteus*, se la zona di inibizione è sufficientemente distinta per essere misurata, ignorare la sciamatura interna alla zona. Con trimetoprim e sulfonamidi, gli antagonisti del terreno possono consentire una lieve crescita; ignorare quindi sviluppi di minore entità (20% o meno della crescita erbosa) e misurare i margini più evidenti per delimitare il diametro della zona.
Secondo l'EUCAST: In caso di doppia zona, deve essere misurata quella interna, se non diversamente specificato.⁸

Calcolo e interpretazione dei risultati

Secondo il CLSI:

Misurare i diametri delle zone attorno ai dischetti e confrontarli con i valori riportati nelle tabelle 2A – 2D nel Documento M100 (M2) CLSI.¹⁰ I risultati ottenuti con i singoli organismi possono essere riportati con le definizioni "resistente", "intermedio" o "sensibile".

Secondo l'EUCAST:

Per l'interpretazione dei diametri delle zone consultare le tabelle dei breakpoint.¹¹ I risultati ottenuti con specifici organismi possono essere refertati come resistenti o sensibili. Per ulteriori informazioni su specifiche caratteristiche della crescita e sull'interpretazione o per altri documenti di guida, consultare l'EUCAST.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

L'agar Mueller Hinton è il terreno abitualmente utilizzato per i test di sensibilità di aerobi a crescita rapida o anaerobi facoltativi, come stafilococchi, enterococchi, famiglia *Enterobacteriaceae* e Gram-negativi aerobi (*Pseudomonas* spp.) I documenti di guida per l'interpretazione della sensibilità sono aggiornati annualmente e ne deve essere consultata la versione più recente per l'interpretazione corretta dei risultati ottenuti.^{10,11} Per le analisi delle specie esigenti, come *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Streptococcus pneumoniae* e streptococchi, si applicano tecniche, terreni e condizioni differenti.

La procedura standardizzata del CLSI e dell'EUCAT non viene applicata nelle analisi su anaerobi obbligati, organismi che mostrano crescita insufficiente o lenta su agar Mueller Hinton o batteri con spiccate variazioni di crescita tra i singoli ceppi.^{7,8} Gli organismi esigenti (*Haemophilus influenzae*) devono essere analizzati secondo le raccomandazioni del CLSI e dell'EUCAST.^{7,8}

Valutazione interna delle prestazioni

Le prestazioni di **BD Mueller Hinton II Agar** (tutti i formati di piastra) sono state validate internamente utilizzando i ceppi raccomandati di controllo di qualità (CQ), inclusi quelli con meccanismi di resistenza caratterizzati (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Staphylococcus aureus* NCTC 12493, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 con amoxicillina-acido clavulanico AMC-3).^{19,20,34}

Nella tabella 2 sono riassunti gli agenti antimicrobici validati per i ceppi QC e i ceppi con meccanismi di resistenza caratterizzati. Se non diversamente specificato, le dimensioni delle zone di inibizione determinate per gli agenti antimicrobici validati erano comprese negli intervalli dei diametri delle zone di inibizione specificati dal CLSI e dall'EUCAST.^{19,20}

Altri studi sulle prestazioni condotti utilizzando isolati clinici di MRSA che presentano il tipo di resistenza a *mecC* hanno indicato che **BD Mueller Hinton II Agar** rileva accuratamente i ceppi di MRSA positivi a *mecC*.^{34,35}

Tabella 2: Descrizione generale degli agenti antimicrobici validati e dei ceppi di controllo di qualità. Se non diversamente specificato, i diametri delle zone di inibizione erano compresi nei rispettivi intervalli del CLSI e/o dell'EUCAST.^{19,20}

Agente antimicrobico	Contenuto del dischetto (µg)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 ^{10,18}	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ^{10,18}	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 ^{10,18}	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ¹⁸	<i>E. coli</i> ATCC 35218 ^{10,18}	<i>S. aureus</i> NCTC 12493 ¹⁸	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 ^{10,18}	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 ¹⁸
Amicacina	AN-30	✓	✓		✓				
Amoxicillina-acido clavulanico	AMC-3				✓				
	AMC-30	✓				5			
Ampicillina	AM-2			3	✓				
	AM-10	✓							
Ampicillina-sulbactam	SAM-20	✓				✓			
Aztreonam	ATM-30	✓	✓					✓	
Benzilpenicillina	P-1				✓				
Cefadroxil	CFR-30	✓ ¹							
Cefalexina	CN-30	✓ ¹							
Cefepime	FEP-30	✓	✓						
Cefexime	CFM-5	✓							
Cefotaxime	CTX-5	✓ ²						✓ ²	
Cefoxitina	FOX-30	✓			✓		✓		
Cefpodoxime	CPD-10	✓						✓	
Ceftarolina	CPT-5	✓ ²			✓				
Ceftazidime	CAZ-10	✓ ²	✓ ²					✓ ²	
Ceftibuten	CFT-30	✓							
Ceftriaxone	CRO-30	✓						✓	
Cefuroxime	CXM-30	✓							
Cloramfenicolo	C-30	✓			✓				
Ciprofloxacina	CIP-5	✓	✓	✓	✓				
Clindamicina	CC-2				✓				
Doripenem	DOR-10	✓	✓						
Ertapenem	ETP-10	✓							
Eritromicina	E-15				✓				
Acido fusidico	FA-10				✓				
Gentamicina	GM-10	✓	✓		✓				
	GM-30			✓					✓
Imipenem	IPM-10	✓	✓	✓					
Levofloxacina	LVX-5	✓	✓	✓	✓				
Linezolid	LZD-10			✓	✓				
Mecillinam	MEC-10	✓							
Meropenem	MEM-10	✓	✓						
Minociclina	MI-30				✓				
Moxifloxacina	MXF-5	✓			✓				
Mupirocina	MUP-200				✓				
Acido nalidissico	NA-30	✓							

Tabella 2: (cont.)

Agente antimicrobico	Contenuto del dischetto (µg)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 ^{10,18}	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ^{10,18}	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 ^{10,18}	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ¹⁸	<i>E. coli</i> ATCC 35218 ^{10,18}	<i>S. aureus</i> NCTC 12493 ¹⁸	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 ^{10,18}	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 ¹⁸
Netilmicina	NET-10	✓ ²	✓ ²		✓				
Nitrofurantoina	FM-100	✓ ²		✓	✓				
Norfloxacina	NOR-10	✓		✓	✓				
Ofloxacina	OFX-5	✓			✓				
Pefloxacina	PEF-5	✓							
Piperacillina	PIP-30	✓ ²							
Piperacillina/tazobactam	PIP-30/TAZ-6	✓ ²	✓ ²			✓ ²			
Quinupristin-dalfopristin	SYN-15			✓	✓				
Rifampicina	RA-5				✓				
Streptomicina	S-300			6					
Teicoplanina	TEC-30			✓					✓
Tetraciclina	TE-30				✓				
Ticarcillina	TIC-75	✓							
Ticarcillina-acido clavulanico	TIM-85	✓	✓			✓			
Tigeciclina	TGC-15	✓		✓	✓				
Tobramicina	NN-10	✓	✓		✓				
Trimetoprim	TMP-5	✓		✓	4				
Trimetoprim-sulfametossazolo	SXT 1,25 – 23,75	✓		✓	✓				
Vancomicina	VA-5			✓					✓

✓ Le zone di inibizione indicate sono comprese nell'intervallo dell'EUCAST e del CLSI.

¹ Il CLSI non raccomanda l'analisi dell'agente antimicrobico.

² Il CLSI e l'EUCAST raccomandano concentrazioni di agente antimicrobico diverse. Sono state seguite le raccomandazioni dell'EUCAST.

³ La zona di inibizione dell'agente antimicrobico non rientra nell'intervallo raccomandato dall'EUCAST (Mueller Hinton II Agar, 150 mm e Square).

⁴ La zona di inibizione dell'agente antimicrobico non rientra nell'intervallo raccomandato dall'EUCAST (Mueller Hinton II Agar, 90 mm).

⁵ La zona di inibizione dell'agente antimicrobico non rientra nell'intervallo raccomandato dall'EUCAST e dal CLSI (Mueller Hinton II Agar, 90 mm).

⁶ La zona di inibizione dell'agente antimicrobico non rientra nell'intervallo raccomandato dal CLSI (Mueller Hinton II Agar, 90 e 150 mm) ma rientra nell'intervallo raccomandato dall'EUCAST.

Limitazioni della procedura

Il test di sensibilità mediante diffusione su dischetto è indicato all'uso 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.

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

Sono stati individuati diversi fattori che influenzano il test di sensibilità mediante diffusione su dischetto: terreno, profondità dell'agar, potenza del dischetto, concentrazione dell'inoculo, età dell'inoculo e pH.³¹

La concentrazione dell'inoculo se è inadeguata può dare risultati errati. Le zone di inibizione potrebbero risultare troppo piccole in caso di inoculo eccessivamente pesante e troppo ampie e difficili da misurare se l'inoculo è troppo leggero. Di conseguenza, è fortemente consigliato seguire le raccomandazioni del CLSI e dell'EUCAST sulla gestione dell'inoculo e delle piastre inoculate per ridurre al minimo il rischio potenziale di risultati scorretti dovuti a una gestione inadeguata. La conservazione inadeguata dei dischetti antimicrobici può comportare perdita di potenza e risultati di falsa sensibilità. Un eccessivo restringimento del terreno dovuto a conservazione inadeguata può portare a risultati di falsa sensibilità.

La sensibilità in vitro di un organismo a un agente antimicrobico specifico non implica necessariamente che l'agente sarà efficace in vivo. Consultare i riferimenti adeguati per la guida all'interpretazione dei risultati.^{10,11,32,33}

Possono essere presenti batteri che richiedono timina o timidina.^{27,28} Tali organismi, tuttavia, non possono crescere bene su agar Mueller Hinton con bassi livelli di timina o timidina.

Sono state ideate nuove procedure basate su dischetti ad alto contenuto di gentamicina (120 mg) e streptomina (300 mg) per stabilire se una elevata resistenza agli aminoglicosidi indica che un isolato di enterococchi non verrà influenzato sinergicamente dalla combinazione di penicillina o glicopeptidi e aminoglicosidi.^{7,28,29}

Per un'esposizione completa sull'identificazione di MRSA, enterococchi resistenti, ampio spettro, batteri Gram-negativi produttori di beta-lattamasi e altre limitazioni dei test, consultare i documenti M2 e M7 CLSI e l'EUCAST.^{7,8,10,11,30}

L'agar Mueller Hinton II è valido per rilevare MRSA che producono un alone di inibizione intorno ai dischetti di oxacillina.²⁶ Se l'esito è dubbio, impiegare una base aggiuntiva, come **BD Oxacillin Screen Agar**.

Le tecniche di inoculazione, l'interpretazione, le raccomandazioni e le dimensioni delle zone riportate nel presente documento e raccomandate dallo standard CLSI e EUCAST possono discostarsi dagli standard nazionali.^{7,8,31}

BIBLIOGRAFIA

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. Matuschek, E., D.F. Brown, and G. Kahlmeter. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20 (4): 255-66.
3. Ryan, K.J., F.D. Schoenknecht, and W.M.M. Kirby. 1970. Disc sensitivity testing. *Hospital Practice* 5:91-100.
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. 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.
6. 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.
7. CLSI. Approved standard: M02-A12 - Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA. *Search for latest version at www.clsi.org.*
8. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Search for latest version at <http://www.eucast.org>.*
9. Woods, G.L., and J.A. Washington. 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.C. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
10. CLSI - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. *Search for latest version at www.clsi.org.*
11. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *Search for latest version at <http://www.eucast.org>.*

12. Thornsberry, C., T.L. Gavan, and E.H. Gerlach. 1977. Cumitech 6, New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Coordinating ed., J.C. Sherris. American Society of Microbiology, Washington, DC.
13. Koch, A.E., and J.J. Burchall. 1971. Reversal of the antimicrobial activity of trimethoprim by thymidine in commercially prepared media. *Appl. Microbiol.* 22:812-817.
14. Ferone, R., S.R.M. Bushby, J.J. Burchall, W.D. Moore, and D. Smith. 1975. Identification of Harper-Cawston factor as thymidine phosphorylase and removal from media of substances interfering with susceptibility testing to sulfonamides and diaminopyrimidines. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:91-98.
15. Reller, L.G., F.D. Schoenknecht, M.A. Kenny, and J.C. Sherris. 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.
16. Pollock, H.M., B.H. Minshew, M.A. Kenny, and F.D. Schoenknecht. 1978. Effect of different lots of Mueller-Hinton Agar on the interpretation of the gentamicin susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14:360-367.
17. D'Amato, R.F., and C. Thornsberry. 1979. Calcium and magnesium in Mueller-Hinton agar and their influence on disk diffusion susceptibility results. *Current Microbiol.* 2:135-138.
18. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. *Search for latest version at <http://www.eucast.org>.*
19. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 6.0, 2016. *<http://www.eucast.org>.*
20. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
21. Wegner, D.L., C.R. Mathis, and T.R. Neblett. 1976. Direct method to determine the antibiotic susceptibility of rapidly growing blood pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9:861-862.
22. Johnson, J.E., and J.A. Washington II. 1976. Comparison of direct and standardized antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10:211-214.
23. Waterworth, P.M., and M. Del Piano. 1976. Dependability of sensitivity tests in primary culture. *J. Clin. Pathol.* 29:179-184.
24. Hollick, G.E., and J.A. Washington II. 1976. Comparison of direct and standardized disk diffusion susceptibility testing of urine cultures. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9:804-809.
25. 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.
26. Hindler, J.A., and C.B. Anderbied. 1985. Effect of the source of Mueller-Hinton agar and resistance frequency on the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 21:205-210.
27. Maskell, R., O.A. Okubadejo, R.H. Payne, and L. Pead. 1977. Human infections with thymine-requiring bacteria. *J. Med. Microbiol.* 11:33-45.
28. Haltiner, R.C., P.C. Migneault, and R.G. Robertson. 1980. Incidence of thymidine-dependent enterococci detected on Mueller-Hinton agar with low thymidine content. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18:365-368.
29. Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:46-65.
30. CLSI. Approved standard: M7. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI, Wayne, PA, USA. *Search for latest version at www.clsi.org.*
31. Jorgensen, J.H., and J.D. Turnidge. 2003. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.*

32. Washington, J.A., and G.L. Woods. 1995. Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. P. 1327-1341. In Muarry, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., and Tenover, R.H. (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995.
33. Neumann, M.A., D.F. Sahn, C. Thornsberry, J.E. McGowan, Jr. 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. 1991.
34. Data on file. Becton Dickinson.
35. Skov, R., A.R. Larsen, A. Kearns, M. Holmes, C. Teale, G. Edwards, and R. Hill. Phenotypic detection of *mecC*-MRSA: cefoxitin is more reliable than oxacillin. 2014. J. Antimicrob. Chemother. 69:133-135.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

BD Mueller Hinton II Agar (piastre Stacker da 90 mm; [dimensioni standard])

N. di cat. 254032 Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 20
N. di cat. 254081 Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 120

BD Mueller Hinton II Agar (150 mm)

N. di cat. 254062 Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 20

BD Mueller Hinton II Agar, Square (120 x 120 mm)

N. di cat. 254518 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
69126 Heidelberg/Germany
Telefono: +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/>

I marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi titolari.

© 2017 BD. BD, il logo BD e tutti gli altri marchi sono proprietà di Becton, Dickinson and Company.