

## BD Mueller Hinton Chocolate Agar

### USO PREVISTO

**BD Mueller Hinton Chocolate Agar** (agar Mueller Hinton cioccolato) è usato per l'isolamento e la coltura di batteri esigenti da campioni clinici. Il terreno può essere utilizzato anche per i test di sensibilità di *Neisseria gonorrhoeae*.

### 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.<sup>1-4</sup> 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.<sup>5</sup>

L'CLSI raccomanda per i test di sensibilità su dischetti di diffusione per *Streptococcus pneumoniae* l'agar Mueller Hinton con 5% di sangue di montone. La base raccomandata per *Haemophilus influenzae* è l'agar Haemophilus Test Medium (HTM). I criteri interpretativi sono delineati nel Documento M100 (M2) CLSI, inserito nel Documento M2 CLSI, intitolato Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 7° edizione; standard approvato.<sup>6</sup> Il terreno raccomandato per *Neisseria gonorrhoeae* è l'agar GC con supplemento di crescita definito. Secondo altri dati, l'agar Mueller Hinton con emina e Iso-VitaleX può essere usato per i normali test di sensibilità alla penicillina e alla spectinomina di *N. gonorrhoeae*.<sup>7</sup> L'agar Mueller Hinton addizionato con sangue riscaldato o emoglobina e fattori di crescita (**BD IsoVitaleX**) è stato raccomandato come terreno non selettivo per l'isolamento di *Neisseria* ed *Haemophilus*.<sup>8</sup>

Nel **BD Mueller Hinton Chocolate Agar**, i nutrienti sono forniti dall'estratto di carne bovina e dalla caseina, l'amido assorbe i composti tossici come gli acidi grassi derivati dai tamponi di cotone e l'emoglobina fornisce il fattore X. **BD IsoVitaleX** fornisce vitamine e fattori di crescita, incluso il fattore V (= NAD) necessario per la crescita di *Haemophilus influenzae*.

### REAGENTI

#### **BD Mueller Hinton Chocolate Agar**

Formula\* per litro di acqua purificata

Estratto di carne bovina	2,0 g
Idrolizzato acido di caseina	17,5
Amido	1,5
Emoglobina	10,0
<b>IsoVitaleX</b>	10,0 ml
Agar	17,0 g

pH 7,3 ± 0,2

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

Microbiologicamente controllate.

Il supplemento **BD IsoVitaleX** contiene i seguenti fattori di crescita (formula\* per litro di acqua purificata):

Vitamina B <sub>12</sub>	0,01 g
L-Glutamina	10,0
Adenina	1,0
Cloridrato di guanina	0,03
Acido <i>p</i> -aminobenzoico	0,013
Nicotinamide adenina dinucleotide (NAD)	0,25
Pirofosfato di tiamina	0,1
Nitrato di ferro	0,02
Cloridrato di tiamina	0,003
Cloridrato di cistina	25,9
L-cistina	1,1
Glucosio	100,0

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

## PRECAUZIONI

**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 ad 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

Inoculare i campioni rappresentativi con i seguenti ceppi (per ulteriori informazioni, v. **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**). Incubare le piastre a 35 ± 2 °C in atmosfera aerobica con addizione di anidride carbonica. Leggere le piastre dopo 18 – 24 e 42 – 48 ore di incubazione.

Ceppi	Risultati della crescita
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	Crescita da buona a eccellente
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 43069	Crescita da discreta a eccellente
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	Crescita da buona a eccellente
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Crescita da buona a eccellente
Non inoculate	Marrone cioccolato, opaca, leggermente disomogenea

Per le procedure di inoculazione e incubazione nei test di sensibilità, v. **Procedura del test**.

Ceppo per test	Disco per test di sensibilità	Dimensioni zona* (mm)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226	Penicillina P-10	33 - 40
	Spectinomomicina SPT-100	25 - 31

\* Dimensioni delle zone basate sui risultati di almeno 3 diversi lotti di **BD Mueller Hinton Chocolate Agar**

## PROCEDURA

### Materiali forniti

**BD Mueller Hinton Chocolate Agar** (piastre impilate **Stacker** da 90 mm).

Microbiologicamente controllate.

## Materiali non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti e apparecchiature di laboratorio necessarie.

## Tipi di campioni

**BD Mueller Hinton Chocolate Agar** può essere usato per tutti i campioni di processi infettivi sospettati di contenere organismi esigenti, in particolare i campioni prelevati da siti corporei normalmente sterili (ad es., liquido cerebrospinale, ascessi), e come terreno per subcolture ricavate da emocolture. Viene usato principalmente per l'isolamento non selettivo di *Neisseria*, *Haemophilus* e altri batteri che potrebbero non crescere sull'agar sangue utilizzato abitualmente, come l'agar Columbia con 5% di sangue di montone (v. anche **PERFORMANCE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**).

Su questo terreno è necessario usare colture pure per i normali test di sensibilità a penicillina G e spectinomomicina di *Neisseria gonorrhoeae*. Non inoculare il terreno con il campione per eseguire il test di sensibilità diretta!

## Prelievo e trasporto dei campioni

*Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Haemophilus* e altri organismi esigenti sono sensibili alle condizioni ambientali avverse. Utilizzare pertanto terreni di trasporto appropriati per tutti i campioni. I campioni devono essere inviati quanto prima al laboratorio e non devono avere più di 24 ore, anche se si usa un terreno di trasporto. La temperatura ottimale per il trasporto è 20 – 25 °C. Non conservare in frigorifero.<sup>9,10</sup>

## Procedura del test

Per isolare gli organismi esigenti, strisciare il campione quanto prima dopo la consegna al laboratorio. La piastra strisciata è utilizzata prevalentemente per isolare le colture pure dai campioni contenenti flora mista.

In alternativa, se il materiale in coltura proviene direttamente da un tampone, rotolare il tampone su una piccola area del bordo e strisciare da questa zona inoculata.

Se il campione è stato prelevato da un sito corporeo contenente flora normale, deve essere inoculato anche su terreni selettivi appropriati, in funzione dell'agente patogeno isolato.

Aggiungere una piastra di **BD Martin-Lewis Agar, modified** o **BD GC-Lect Agar** per *Neisseria gonorrhoeae* e una piastra di **BD Chocolate Agar with IsoVitaleX and Bacitracin** per *Haemophilus*.

Incubare le piastre a 35 ± 2 °C in atmosfera aerobica con addizione di anidride carbonica.

Leggere le piastre dopo 18 – 24 e 42 – 48 ore di incubazione.

Per gli abituali test di sensibilità di *N. gonorrhoeae*, l'isolato deve essere una coltura pura sospesa in **BD Trypticase Soy Broth** per corrispondere alla torbidità dello standard McFarland 0,5. 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.

Inoculare tre volte l'intera superficie della piastra agar, ruotando la piastra di 60° prima di ogni striscio per ottenere un inoculo uniforme.

Applicare i dischi mediante un erogatore di dischi antimicrobici, adottando le opportune tecniche asettiche. Depositare i dischetti in modo tale che la distanza tra i rispettivi centri sia di almeno 24 mm. Depositare i dischi di penicillina preferibilmente a una distanza di almeno 10 mm dal bordo della piastra di Petri. Dopo aver depositato i dischetti sull'agar, applicarli con un ago o pinze sterili in modo da porli a contatto con la superficie del terreno. Questa misura non è necessaria se i dischetti vengono depositati usando l'erogatore con applicatore automatico **BD Sensi-Disc** da 6 o 8 posti.

Entro 15 min dall'applicazione dei dischetti, capovolgere le piastre e incubarle in atmosfera aerobica arricchita con 5% di anidride carbonica a 35 – 37 °C per 20 – 24 ore.

## Risultati

La morfologia tipica delle colonie su **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** è la seguente:

<i>Haemophilus influenzae</i>	Piccole, umide, perlaccee con caratteristico odore murino
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Piccole, da bianco-grigiastre a incolori, mucoidi

<i>Neisseria meningitidis</i>	Da medie a grandi, grigiazzurre, mucoidi
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Colonie piccole, piatte o grandi, mucoidi e verdastre, con terreno circostante eventualmente verdastro

**Test di sensibilità:** Osservare le zone dalla parte superiore della piastra. La sensibilità alla penicillina deve essere confermata da un test per la beta-lattamasi, come il **BD Cefinase**.

## PERFORMANCE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

**BD Mueller Hinton Chocolate Agar** è un terreno arricchito non selettivo su cui crescono batteri esigenti e non esigenti, inclusa la flora normale. Si raccomanda pertanto di inoculare i campioni anche su terreni selettivi adatti allo scopo.

Con l'espressione "batteri esigenti" si intendono i batteri che non crescono o crescono con difficoltà sui normali terreni di isolamento primario contenenti sangue di montone, come *Haemophilus*, *Neisseria* patogene e diversi altri organismi. Per avere indicazioni più dettagliate sul tipo di campioni che devono essere inoculati su questo terreno e sul tipo di organismi isolati su di esso, consultare la bibliografia.<sup>10,11</sup>

Questo terreno non è stato usato sperimentalmente per sostenere la crescita di streptococchi con variazioni nutritive.

Il numero e la tipologia delle specie batteriche che si comportano da agenti infettivi è molto ampio. Pertanto, prima di usare abitualmente il terreno con microrganismi isolati raramente o descritti di recente, l'utilizzatore deve verificarne l'idoneità coltivando colture pure dell'organismo in questione.

Su questo terreno, le dimensioni delle zone dei test di sensibilità non corrispondono esattamente a quelle indicate dallo standard M2 CLSI,<sup>6</sup> ottenute su agar GC cioccolato con supplemento di crescita definito.

## 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. 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](http://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.). 5<sup>th</sup> 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.

## CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

### BD Mueller Hinton Chocolate Agar

- N. di cat. 254035 Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 20  
 N. di cat. 254082 Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 120

## **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/>

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. © 2011 BD