BD Mueller Hinton Chocolate Agar

PRZEZNACZENIE

Podłoże **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** jest stosowane do izolacji i hodowli bakterii o wysokich wymaganiach odżywczych z próbek pochodzenia klinicznego. Może ono być także wykorzystywane do badań wrażliwości *Neisseria gonorrhoeae.*

ZASADY I OBJAŚNIENIE PROCEDURY

Metoda mikrobiologiczna.

Jako że we wczesnych latach 60. w klinicznych laboratoriach mikrobiologicznych stosowano wiele różnych procedur do określania wrażliwości bakterii na antybiotyki i inne chemioterapeutyki, Bauer, Kirby i inni opracowali wzorcową procedurę, do której jako podłoże testowe wybrano agar Muellera Hintona.[1-4] Przeprowadzone później wspólne, międzynarodowe badanie potwierdziło przydatność wybranego podłoża do tego celu ze względu na jego stosunkowo dobrą odtwarzalność, prosty skład oraz dużą ilość dostępnych danych eksperymentalnych na jego temat.[5]

Według CLSI do dyfuzyjnego krążkowego badania wrażliwości *Streptococcus pneumoniae* zalecane jest podłoże Mueller Hinton Agar with 5% Sheep Blood. Do badań *Haemophilus influenzae* zalecane jest podłoże Haemophilus Test Medium (HTM) Agar. Kryteria interpretacji przedstawiono w dokumencie CLSI M100 (M2), który jest dołączony do dokumentu CLSI M2 – Standardy wykonywania badań wrażliwości z zastosowaniem krążków nasyconych antybiotykami, wyd. 7, zatwierdzony standard.[6] Do badań *Neisseria gonorrhoeae* zalecane jest podłoże GC Agar z określonym dodatkiem promującym wzrost. Według innych autorów do rutynowego badania wrażliwości *N. gonorrhoeae* na penicylinę i spektynomycynę można wykorzystywać podłoże Mueller Hinton Agar z heminą i Iso-VitaleX.[7]

Podłoże Mueller Hinton Agar z dodatkiem podgrzanej krwi lub hemoglobiny oraz czynników wzrostu (np. **BD IsoVitaleX**) jest zalecane jako podłoże nieselektywne do izolowania *Neisseria* i *Haemophilus*.[8]

W podłożu **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** składników odżywczych dostarcza ekstrakt wołowy i peptony kazeiny. Skrobia absorbuje składniki toksyczne, takie jak kwasy tłuszczowe pochodzące z gazików bawełnianych. Hemoglobina dostarcza czynnika X. **BD IsoVitaleX** dostarcza witamin i czynników wzrostu, w tym czynnika V (=NAD), który jest niezbędny do wzrostu *Haemophilus influenzae*.

ODCZYNNIKI

BD Mueller Hinton Chocolate Agar

Skład* w przeliczeniu na jeden litr wody oczyszczonej

Wyciąg wołowy	2,0 g
Kwaśny hydrolizat kazeiny	17,5
Skrobia	1,5
Hemoglobina	10,0
IsoVitaleX	10,0 ml
Agar	17,0 g

pH 7,3 ± 0,2

*Skorygowany i (lub) uzupełniony zgodnie z wymaganiami mającymi na celu spełnienie kryteriów wydajności.

Podłoże **BD IsoVitalex** Enrichment zawiera następujące czynniki wzrostu (skład* w przeliczeniu na jeden litr wody oczyszczonej):

Witamina B_{12}	0,01 g
L-glutamina	10,0
Adenina	1,0
Chlorowodorek guaniny	0,03
Kwas p-aminobenzoesowy	0,013
Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD)	0,25
Pirofosforan tiaminy	0,1
Azotan (V) żelaza (III)	0,02
Chlorowodorek tiaminy	0,003
Chlorowodorek cysteiny	25,9
L-cystyna	1,1
Glukoza	100,0

*Skorygowany i (lub) uzupełniony zgodnie z wymaganiami mającymi na celu spełnienie kryteriów wydajności.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

IVD . Wyłącznie do zastosowań profesjonalnych.

Nie należy używać płytek, jeżeli są na nich widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia, pęknięcia lub inne zjawiska wskazujące na pogorszenie jakości.
Nadmierne obkurczenie się opisywanego podłoża na skutek wysychania może prowadzić do uzyskania fałszywych wyników wskazujących na występowanie wrażliwości.
Procedury aseptycznej techniki pracy z produktem, zagrożenia biologiczne oraz usuwanie zużytego produktu opisano w dokumencie **OGÓLNE INSTRUKCJE DOTYCZĄCE STOSOWANIA**.

PRZECHOWYWANIE I DOPUSZCZALNY OKRES PRZECHOWYWANIA

Po otrzymaniu, płytki należy przechowywać w ciemnym miejscu w temperaturze od 2 do 8° C, w ich oryginalnym opakowaniu izolującym do chwili użycia. Unikać zamrażania i przegrzewania.
Posiewu na płytki można dokonywać aż do daty ważności (patrz etykieta na opakowaniu) i inkubować w zalecanych czasach inkubacji.
Płytek z otwartych stosów zawierających po 10 płytek można używać przez okres jednego tygodnia, przechowując w czystym miejscu w temperaturze od 2 do 8° C.

KONTROLA JAKOŚCI PRZEZ UŻYTKOWNIKA

Na płytki posiewa się próbki reprezentatywne niżej wymienionych szczepów (szczegółowe informacje – zobacz dokument **OGÓLNE INSTRUKCJE DOTYCZĄCE STOSOWANIA**). Płytki inkubuje się w temperaturze 35 ± 2°C w atmosferze tlenowej wzbogaconej dwutlenkiem węgla. Płytki odczytuje się po 18–24 i po 42–48 godzinach inkubacji.

Szczepy bakteryjne	**Wzrost**
Haemophilus influenzae ATCC 10211	Wzrost dobry lub bardzo dobry.
Neisseria gonorrhoeae ATCC 43069	Wzrost dość dobry do bardzo dobrego.
Neisseria meningitidis ATCC 13090	Wzrost dobry lub bardzo dobry.
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305	Wzrost dobry lub bardzo dobry.
Bez posiewu	Zabarwienie czekoladowobrązowe, matowe, czasem nieco niejedorodne

Informacje na temat zaszczepiania i inkubacji w badaniach wrażliwości przedstawiono w części **Procedura testowa**.

Badany szczep	Krążek do badania wrażliwości	Rozmiar stref* (mm)
Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226	Penicylina P-10	33 - 40
	Spektynomycyna SPT-100	25 - 31

* Rozmiary stref oparte na wynikach uzyskanych przy użyciu co najmniej 3 różnych partii podłoża **BD Mueller Hinton Chocolate Agar**.

PROCEDURA

Dostarczane materiały

Podłoże **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** (płytki **Stacker** o śr. 90 mm). Sprawdzane pod kątem obecności mikroorganizmów.

Materiały niedostarczane

Pomocnicze pożywki hodowlane, odczynniki i wyposażenie laboratoryjne zgodnie z wymaganiami.

Typy próbek

Podłoże **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** nadaje się w zasadzie do wszystkich typów próbek pobranych od pacjentów z podejrzeniem zakażenia bakteriami o wysokich wymaganiach odżywczych, przede wszystkim, choć nie tylko, do próbek z pierwotnie sterylnych miejsc w organizmie (np. płynu mózgowo-rdzeniowego, ropni) oraz jako podłoże do hodowli pochodnych z posiewów wykonanych z próbek krwi. Jego głównym zastosowaniem jest nieselektywna izolacja *Neisseria, Haemophilus* i innych bakterii, które mogą nie wykazywać wzrostu na rutynowo stosowanych podłożach agarowych z krwią, takich jak Columbia Agar with 5% Sheep Blood. (zobacz także **CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCI I OGRANICZENIA PROCEDURY**).
Zastosowanie tego podłoża do rutynowego badania wrażliwości *Neissseria gonorrhoeae* na penicylinę G i spektynomycynę wymaga użycia czystych hodowli. Nie należy zaszczepiać tego podłoża do bezpośrednich badań wrażliwości!

Pobieranie i transport próbek

Neisseria gonorrhoeae, *N. meningitidis*, *Haemophilus* i inne drobnoustroje o wysokich wymaganiach odżywczych są wrażliwe na niekorzystne warunki środowiska. W związku z tym do wszystkich próbek należy stosować odpowiednie podłoża transportowe. Próbki należy jak najszybciej przesłać do laboratorium, najpóźniej w ciągu 24 godzin, nawet w przypadku stosowania podłoża transportowego. Optymalna temperatura transportu wynosi 20–25°C. Nie należy zamrażać próbek![9,10]

Procedura testowa

W celu wyizolowania drobnoustrojów o wysokich wymaganiach odżywczych należy wykonać posiew próbki jak najszybciej po jej dostarczeniu do pracowni. Płytka do posiewu służy przede wszystkim do izolowania czystych kultur z próbek zawierających florę mieszaną.
Alternatywnie, jeżeli materiał jest hodowany bezpośrednio z wymazówki, można przetoczyć wymazówkę po niewielkiej powierzchni na obwodzie płytki, a następnie wykonać posiew poprzez rozprowadzenie materiału po podłożu.
W przypadku pobierania próbki, w której może znajdować się fizjologiczna flora bakteryjna, należy wykonać posiew także na odpowiednie podłoża selektywne, w zależności od patogenu, jaki ma zostać wyizolowany. W przypadku *Neisseria gonorrhoeae* należy wykonać posiew także na podłoże **BD Martin-Lewis Agar, modified** lub **BD GC-Lect™ Agar**, a w przypadku *Haemophilus* – na podłoże **BD Chocolate Agar with IsoVitaleX and Bacitracin**.
Płytki inkubuje się w temperaturze 35 ± 2°C w atmosferze tlenowej wzbogaconej dwutlenkiem węgla. Płytki odczytuje się po 18–24 i po 42–48 godzinach inkubacji.

W przypadku rutynowego badania wrażliwości *N. gonorrhoeae*, wyizolowany szczep, który powinien być czystą hodowlą, zawiesza się w podłożu płynnym **BD Trypticase Soy Broth** w taki sposób, aby jego zmętnienie odpowiadało standardowi 0,5 McFarland. W ciągu 15 min od

skorygowania zmętnienia inokulum należy zanurzyć sterylną wymazówkę w odpowiednio rozcieńczonym inokulum i kilkakrotnie ją obrócić, mocno przyciskając do górnej części wewnętrznej ścianki probówki, aby odsączyć nadmiar płynu.
Wykonać posiew, trzykrotnie rozprowadzając materiał po całej powierzchni podłoża agarowego na płytce, obracając płytkę za każdym razem o 60°, aby uzyskać równomierny posiew.
Nałożyć krążki nasycone antybiotykami za pomocą odpowiedniego aplikatora, zachowując zasady aseptyki. Krążki należy rozmieścić w taki sposób, aby ich środki znajdowały się w odległości co najmniej 24 mm od siebie. Krążki z penicyliną najlepiej umieścić w takich miejscach, aby znajdowały się one co najmniej 10 mm od brzegu szalki Petriego. Po umieszczeniu krążków na agarze należy je lekko docisnąć za pomocą sterylnej igły lub pincety, aby dokładnie przylegały one do powierzchni podłoża. Ta czynność nie jest konieczna, jeśli krążki są nakładane za pomocą 6- lub 8-pozycyjnego automatycznego aplikatora **BD Sensi-Disc**.
W ciągu 15 minut od nałożenia krążków płytki należy odwrócić i umieścić w atmosferze tlenowej wzbogaconej 5% dwutlenkiem węgla, w temperaturze 35–37°C, na 20 do 24 godzin.

Wyniki
Typowa morfologia kolonii otrzymywanych na podłożu **BD Mueller Hinton Chocolate Agar**:

Haemophilus influenzae	Małe, wilgotne, perłowe, o charakterystycznym, „mysim” zapachu
Neisseria gonorrhoeae	Małe, szarawobiałe do bezbarwnych, śluzowe
Neisseria meningitidis	Średnie lub duże, niebieskoszare, śluzowe
Streptococcus pneumoniae	Kolonie małe, płaskie lub większe, śluzowe, zielonkawe, podłoże otaczające kolonie może być zielonkawe

Badania wrażliwości: Średnicę stref należy mierzyć na górnej powierzchni płytki. Wrażliwość na penicylinę należy potwierdzić badaniem z beta-laktamazą, np. testem **BD Cefinase**.

CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW I OGRANICZENIA DOTYCZĄCE PROCEDURY
BD Mueller Hinton Chocolate Agar jest wzbogaconym, nieselektywnym podłożem, na którym obserwuje się wzrost bakterii o wysokich i niskich wymaganiach odżywczych, w tym flory fizjologicznej. W związku z tym zaleca się wykonywanie posiewów wszystkich próbek także na odpowiednie podłoża selektywne.
Termin „bakterie o wysokich wymaganiach odżywczych” odnosi się do drobnoustrojów, których wzrost ulega zahamowaniu lub jest śladowy na rutynowo stosowanym podłożu do pierwszej izolacji zawierającym krew owczą – są to np. *Haemophilus,* patogenne szczepy *Neisseria* oraz szereg innych bakterii. Szczegółowe opisy typów próbek, które należy zaszczepiać na tym podłożu, a także drobnoustrojów, do których izolacji jest używane to podłoże, przedstawiono w piśmiennictwie.[10,11]
Podłoże to nie było badane pod kątem wzrostu paciorkowców o zmiennych wymaganiach odżywczych.

Liczba gatunków bakterii występujących jako czynniki zakaźne jest bardzo duża. Dlatego też, zanim podłoże będzie rutynowo używane do rzadko izolowanych lub nowo odkrytych drobnoustrojów, użytkownik powinien najpierw sprawdzić jego przydatność, posiewając czyste hodowle tego typu mikroorganizmów.
Występujące na tym podłożu rozmiary stref w badaniu wrażliwości nie są całkowicie zgodne z wartościami przedstawionymi w standardzie CLSI M2[6], które zostały zmierzone przy użyciu podłoża GC Chocolate Agar z określonym dodatkiem promującym wzrost.

PIŚMIENNICTWO

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. Schoenknecht, 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. Yolken (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. Yolken (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. Yolken (ed.). 1995. Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

PAKOWANIE / DOSTĘPNOŚĆ

BD Mueller Hinton Chocolate Agar

Nr katalogowy 254035	Gotowe podłoża na płytkach hodowlanych, cpu 20
Nr katalogowy 254082	Gotowe podłoża na płytkach hodowlanych, cpu 120

DODATKOWE INFORMACJE

W celu uzyskania dodatkowych informacji należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy BD.



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