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 in piastre e confezioni di vari formati e dimensioni, viene usato per la procedura standardizzata di diffusione su dischetti per valutare la sensibilità agli antibiotici degli aerobi a crescita rapida.

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.[1-4] Un successivo studio collaborativo internazionale ha confermato la validità 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.[5]

Per informazioni più dettagliate sulla tecnica di Bauer-Kirby, consultare il relativo standard qualitativo pubblicato dall'CLSI.[6] Sono state stabilite altre norme nazionali per i test di sensibilità antimicrobica utilizzando la tecnica di Bauer-Kirby. In tali norme, la densità dell'inoculo, la tecnica di inseminazione, le dimensioni delle zone ottenute e i criteri di interpretazione possono discostarsi dallo standard CLSI. Poiché non esistono standard comuni europei per i test di sensibilità, fare riferimento agli standard nazionali ove non sia possibile applicare i parametri dell'CLSI.

La tecnica di Bauer-Kirby è basata sulla diffusione su gel di agar di sostanze antimicrobiche di cui sono imbevuti alcuni dischetti di carta.[7] 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).[1,2,6,7]
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 disco. L'organismo viene riportato con le definizioni "sensibile", "intermedio" o "resistente" a un dato agente mettendo a confronto le dimensioni delle zone ottenute con quelle riportate nelle tabelle 2A – 2D nel Documento M100 (M2) CLSI.[6]

Esistono numerosi fattori in grado di influenzare i test di sensibilità su dischetti di diffusione, 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.[5-8]
BD Mueller Hinton II Agar contiene una bassa concentrazione di timina e timidina[9.10] e un livello controllato di calcio e magnesio.[11-13] 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* ATCC 33186 e/o 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.

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 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

Per il controllo di qualità a cura dell'utente, consultare il relativo standard CLSI[6] o, all'occorrenza, gli standard nazionali. Applicare le tecniche descritte più avanti nella **Procedura del test**, utilizzando i ceppi di riferimento menzionati nella sezione **Materiali non forniti**. Controllare almeno due volte a settimana le piastre di agar Mueller Hinton II e i dischetti antimicrobici utilizzati per valutarne lo stato di efficienza.

Aspetto del terreno inoculato: da incolore a giallo ambrato chiaro.

PROCEDURA

Materiali forniti

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

Materiali non forniti

1. Brodo di inoculo in provetta, tipo **BD Trypticase Soy Broth** (brodo di estratto di caseina di soia) o brodo Mueller Hinton II (con compensazione di cationi), per la preparazione di un inoculo standard, e brodo sterile o soluzione fisiologica per la diluizione dell'inoculo.
2. Standard di raffronto al solfato di bario (0,5 mL di 0,048 M $BaCl_2$ [1,175% peso/vol. $BaCl_2 \cdot 2H_2O$] aggiunti a 99,5 mL di 0,18 M [0,36 N] H_2SO_4[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** (un dispositivo graduato per la preparazione dell'inoculo).[6,18]
5. Colture di controllo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 (solo per inibizioni beta-lattamico-beta-lattamasi), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ed *Enterococcus faecalis* ATCC 33186 o ATCC 29212.[6]

6. Dischetti di carta imbevuti di quantità specifiche di antibiotici,[6] 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 dispenser 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 viene usato solo per i test di sensibilità delle colture pure e non deve essere utilizzato direttamente con campioni clinici (v. anche **PERFORMANCE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**). È stata avanzata l'ipotesi di eseguire i test di sensibilità antimicrobica direttamente su emocoltura e urinocoltura;[14-17] i test, tuttavia, devono essere ripetuti e confermati con colture pure.

Procedura del test

Descrizione del metodo diretto di sospensione della colonia:[6]

1. Assicurarsi che sia disponibile una coltura pura e fresca (della sera prima) su un terreno non selettivo, come l'agar sangue.
2. L'inoculo per gli abituali test di sensibilità si può preparare direttamente con una sospensione di colonie in brodo o soluzione fisiologica.[6] Portare immediatamente la sospensione alla torbidità dello 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 di preparazione dell'inoculo per la standardizzazione diretta degli inoculi senza regolazione della torbidità, tipo **BD Prompt Inoculation System**.[18]
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 tre volte l'intera superficie della piastra agar, ruotando la piastra di 60° prima di ogni striscio per ottenere un inoculo uniforme.
6. Prima di applicare i dischetti imbevuti di antibiotico, 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.
7. 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. 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**.
8. Entro 15 min dall'applicazione dei dischetti, capovolgere le piastre e depositarle in un incubatore a 35 °C. Non incubare le piastre a concentrazioni crescenti di anidride carbonica.
9. Incubare le piastre per 16 – 18 h. Lasciare in incubazione per 24 h lo *Staphylococcus aureus* con oxacillina per identificare i ceppi di *S. aureus* resistenti alla meticillina (MRSA)[19] e l'*Enterococcus* testato con vancomicina per rivelare i ceppi resistenti alla vancomicina. La crescita entro la zona apparente di inibizione è indicativa di resistenza.[20]

Risultati

1. Dopo l'incubazione, deve apparire una crescita "erbosa" convergente. La sola crescita di colonie isolate indica che l'inoculo è troppo leggero e il test deve essere ripetuto.
2. Misurare (a occhio nudo) il diametro delle zone di totale inibizione, incluso il diametro del disco, 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.
3. 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. 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 disco caratteristico dei ceppi MRSA resistenti "occulti"[19] o degli enterococchi resistenti alla vancomicina.[6] Con i *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.

Calcolo e interpretazione dei risultati
Misurare i diametri delle zone attorno ai dischi e confrontarli con i valori riportati nelle tabelle 2A – 2D nel Documento M100 (M2) CLSI.[6] I risultati ottenuti con i singoli organismi possono essere riportati con le definizioni "resistente", "intermedio" o "sensibile".

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

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.) Per le analisi delle specie esigenti, come *Haemophilus* spp*., Neisseria* spp., *S. pneumoniae* e streptococchi, si applicano tecniche, terreni e condizioni differenti.

La procedura standardizzata CLSI 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.[6] Gli organismi esigenti (*Haemophilus influenzae*) devono essere analizzati secondo le indicazioni del Documento M2 CLSI.[6]

In alcune combinazioni organismo-agente antimicrobico, la zona di inibizione può mostrare margini indistinti che potrebbero indurre a errori di interpretazione.
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.
Un eccessivo restringimento del terreno dovuto a conservazione errata può dar luogo a falsi risultati di sensibilità.
La sensibilità *in vitro* di un organismo a uno 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.[7,8]
Possono essere presenti batteri che richiedono timina o timidina:[20,21] 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 streptomicina (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.[6,21,22]
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.[23]
L'agar Mueller Hinton II è valido per rilevare MRSA che producono un alone di inibizione intorno ai dischetti di oxacillina.[19] Se l'esito è dubbio, impiegare una base aggiuntiva, come **BD Oxacillin Screen Agar**.

Le tecniche di inoculazione, l'interpretazione e le dimensioni delle zone riportate nel presente documento e nello standard CLSI possono discostarsi dagli standard nazionali.[6, 24]

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. Schoenknecht, and W.M.M. Kirby. 1970. Disc sensitivity testing. Hospital Practice 5:91-100.
3. 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.
4. 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.
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. 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. Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Waterworth, P.M., and M. Del Piano. 1976. Dependability of sensitivity tests in primary culture. J. Clin. Pathol. 29:179-184.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Maskell, R., O.A. Okubadejo, R.H. Payne, and L. Pead. 1977. Human infections with thymine-requiring bacteria. J. Med. Microbiol, 11:33-45.

21. 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.
22. Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. 3:46-65.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). 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**
24. 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. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

BD Mueller Hinton II Agar (**piastre da 90 mm Stacker** [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
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. © 2011 BD