



MUELLER HINTON AGAR II

Piastre pronte



Mueller Hinton Agar II: *P.aeruginosa* ATCC 27853

DESTINAZIONE D'USO

Terreno per l'esecuzione del test di sensibilità agli antibiotici dei ceppi isolati da materiali clinici con il metodo dell'agar diffusione. Indicato per batteri a crescita rapida:

Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp.

FORMULA TIPICA*

| | |
|---------------------------|---------|
| Estratto di carne | 2,0 g |
| Digerito acido di caseina | 17,5 g |
| Amido solubile | 1,5 g |
| Agar | 17,0 g |
| Acqua purificata | 1000 ml |

*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il test di sensibilità con il metodo dell'agar diffusione, con dischi di carta impregnati di agenti antimicrobici è stato descritto da Bauer e Kirby. Ericsson e Sherris prima, l'NCCLS (divenuto CLSI) poi, hanno sviluppato un programma di standardizzazione della metodica, dell'applicabilità a diverse tipologie microbiche, del controllo qualità e di lettura ed interpretazione dei risultati. Più di recente è stato implementato un sistema di standardizzazione europeo (EUCAST).

Mueller Hinton Agar II è il terreno di scelta, consigliato da EUCAST e da CLSI, per l'esecuzione del test di sensibilità agli agenti antimicrobici con il metodo dell'agar-diffusione con dischetti di carta contenenti antibiotici. E' il terreno raccomandato inoltre per la determinazione della MIC con metodo a gradiente sui batteri aerobi Gram negativi e positivi a crescita rapida. L'antibiogramma eseguito con tale terreno, seguendo un procedimento di lavoro standardizzato, fornisce risultati attendibili, precisi e riproducibili. La formulazione del terreno consente la crescita dei batteri Gram positivi e Gram negativi a crescita rapida e limitate interferenze nella formazione delle zone di inibizione della crescita batterica. Mueller Hinton Agar II contiene concentrazioni di calcio e magnesio controllate ed adatte all'ottenimento di zone di inibizione per aminoglicosidi e tetraciclina su *P.aeruginosa* entro i limiti delle specifiche e CMI di daptomicina verificate su *Enterococcus faecalis*. I livelli di timidina del terreno consentono di ottenere zone di inibizione con l'associazione trimetoprim+sulfametoxaxolo su *E.faecalis* sostanzialmente privi di sovracrescita interna all'alone.

Il terreno di coltura in piastra, al momento del rilascio alla vendita, è controllato in accordo al documento EUCAST citato in bibliografia.

CARATTERISTICHE DEL TERRENO IN PIASTRA

Aspetto: terreno limpido di colore giallo paglierino.

pH finale a 25 °C: $7,3 \pm 0,1$

MATERIALI FORNITI

Piastre pronte all'uso di Mueller Hinton Agar II.

MATERIALI NON FORNITI

Anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori, termostato e strumentazione di laboratorio.

CAMPIONI

Mueller Hinton Agar II non è destinato all'isolamento microbico da campioni clinici. Il terreno deve essere seminato con ceppi microbici d'isolamento clinico in coltura pura.

PROCEDURA DELL'ANALISI

- Portare le piastre a temperatura ambiente ed assicurarsi che siano ben asciutte.
- Per mezzo di un'ansa o di un tampone prelevare diverse colonie con la medesima morfologia da una coltura di 18-24 ore su terreno non selettivo.



- Sospendere le colonie in soluzione fisiologica sterile fino ad ottenere una opacità simile a quello dello Standard McFarland 0,5. Se è il caso aggiungere più colonie o aggiungere soluzione fisiologica. Questa sospensione deve essere usata entro 60 minuti dalla preparazione.
- Immergere un tampone di cotone nella sospensione. Per i batteri Gram negativi spremere il tampone sulle pareti della provetta per evitare un eccesso di inoculo. Per i batteri Gram positivi non è consigliabile eliminare l'eccesso di inoculo.
- Con il tampone di cotone inoculare la piastra di Mueller Hinton Agar II facendo uso di un inoculatore rotante automatico o strisciando manualmente su tutta la superficie del terreno avendo cura di verificare che non vi siano zone della piastra prive di inoculo.
- Entro 15 minuti dalla semina delle piastre posizionare i dischi con antibiotici. Prima della apertura delle cartucce contenenti i dischi lasciare che raggiungano la temperatura ambiente. Premere leggermente i dischi in modo che aderiscano bene alla superficie del terreno; una volta depositi sulla piastra non spostarli per nessuna ragione. Normalmente il numero di dischi che devono essere impiegati sulla piastra da 90 mm sono 6 e 12 su piastre da 150 mm. Evitare di posizionare un numero eccessivo di dischi per non incorrere in problemi di lettura degli aloni di inibizione.
- Per la determinazione della resistenza inducibile alla clindamicina per gli stafilococchi, posizionare i dischi di eritromicina e di clindamicina ad una distanza di 12-20 mm (bordo/bordo)
- Entro 15 minuti dalla deposizione dei dischi, capovolgere le piastre, assicurandosi che non vi sia caduta dei dischetti di carta, e trasferire in termostato.
- Incubare a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ in aerobiosi per 16-20 ore (24 ore per glicopeptidi/*Enterococcus*). Non protrarre l'incubazione oltre i tempi indicati.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo incubazione, osservare la crescita sulla superficie della piastra: essa deve essere uniforme senza aree di interruzione, senza colonie isolate ed i bordi degli aloni di inibizione non devono essere frastagliati. Nel caso la crescita non risultasse confluyente ed omogenea ed i bordi degli aloni frastagliati, il test deve essere ripetuto.

Controllare che gli aloni sui ceppi del controllo qualità siano entro i limiti delle specifiche.

Misurare gli aloni di inibizione dal fondo della piastra senza rimuovere i coperchi, tenendo conto del punto di completa inibizione della crescita, con le piastre a circa 30 cm dagli occhi e illuminando le piastre con luce riflessa.

Per specifiche istruzioni di lettura delle piastre si rimanda al documento EUCAST citato.

Interpretare la misura degli aloni per la categorizzazione del ceppo in Sensibile/Intermedio/Resistente facendo uso delle tabelle riportate sul documento EUCAST citato in bibliografia.

CONTROLLO QUALITÀ

E' responsabilità dell'utilizzatore eseguire il controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio.

EUCAST fornisce l'elenco dei ceppi batterici da impiegare per il controllo qualità; normalmente si impiegano ceppi sensibili, ma, in funzione delle proprie necessità e per monitorare la qualità oltre che del terreno di coltura anche dei dischi con antibiotici, è raccomandabile l'impiego anche dei ceppi resistenti.

- *Escherichia coli* ATCC 25922 - ceppo sensibile
- *Escherichia coli* ATCC 35218 - β -lattamasi TEM 1 (per il controllo del componente inibitorio nelle combinazioni β -lattamico+inibitore delle β lattamasi).
- *Klebsella pneumoniae* ATCC 700603 - produttore di ESBL (per il controllo del componente inibitorio nelle combinazioni β -lattamico+inibitore delle β lattamasi).
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 - ceppo sensibile.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 - debole produttore di β -lattamasi.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 - ceppo sensibile.
- *Staphylococcus aureus* NCTC 12493 - *mecA+*, MRSA etero resistente.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 - HLAR, *vanB+*

Per i dettagli sulla scelta degli antibiotici, sui ceppi di controllo, sulla frequenza dei controlli e sulle tabelle degli intervalli di accettabilità, consultare il documento EUCAST citato in bibliografia.

Il terreno di coltura in piastra, al momento del rilascio alla vendita, è controllato in accordo al documento EUCAST citato in bibliografia.

LIMITI DEL METODO

- L'ottenimento di risultati accurati nel test di sensibilità per agar diffusione dipende dalla qualità del terreno di coltura e dalla qualità dei dischi con antibiotici. EUCAST in uno studio del 2016, riporta variazioni consistenti nelle prestazioni di 16 tipi diversi di antibiotici reperiti da nove produttori. E' responsabilità dell'utilizzatore implementare un piano per il controllo qualità dei dischi con antibiotici.
- In letteratura vi sono diverse evidenze sull'effetto che hanno l'inoculo, l'eccessiva umidità delle piastre, lo spessore dell'agar, il pH, sui risultati del test di sensibilità. E' opportuno che l'utilizzatore abbia in essere un piano per il controllo dei fattori che influenzano la qualità del test.



- I dischi di colistina non sono indicati per il test per agar diffusione. Per lo studio della sensibilità/resistenza alla colistina è opportuno procedere con il metodo delle microdiluizioni in brodo (EUCAST, Novembre 2016).
- A causa delle limitate proprietà nutritive del terreno, certi ceppi patogeni possono non sviluppare crescita.
- Il terreno in piastra qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente.
- Il prodotto qui descritto contiene peptoni di origine animale. Scaricare da sito web www.biolifeitaliana.it il documento con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alla TSE.
- Il terreno in piastra qui descritto è un diagnostico *in vitro* per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale ma un prodotto a biocontaminazione controllata e nei limiti di specifiche definite.
- Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire i rifiuti in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare le piastre con l'imballaggio deteriorato. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, colore alterato).
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

BIBLIOGRAFIA

- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, K.C. & Truck, M. (1966), Amer. Clin. Path, 45, 493-496.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100 S25, twenty fifth Informational Supplement, January 2015. Consultare l'ultima versione disponibile su www.clsi.org
- Ericsson H.M. and J.C. Sherris (1971) - Antibiotic Sensitivity Testing Report of an International collaborative Study - Acta Path. Microbiol - Second Su. N° 217.
- EUCAST (2016) Wide variation in disk quality in 16 disks from nine manufacturers. EUCAST Development Laboratory (EDL), Vaxjo, Sweden. In http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST Disk Diffusion Method, Version 7.0, January 2019. In http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables, for interpretation of MICs and zones diameters. Version 9.0, valid from 2019-01-01. In http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 9.0, valid from 2019-01-01. In http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/qc_tables/

CONFEZIONI

541740 Mueller Hinton Agar II

2 x 10 piastre ø 90 mm, CONFEZIONATE IN FILM PLASTICO / SCATOLA DI CARTONE
CODICE CND: W0104010403 – RDM: 1444954/R

501740P Mueller Hinton Agar II

5 piastre ø 150 mm, CONFEZIONATE IN FILM PLASTICO
CODICE CND: W0104010403 – RDM: 1458976/R



Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, Milano, Italia.