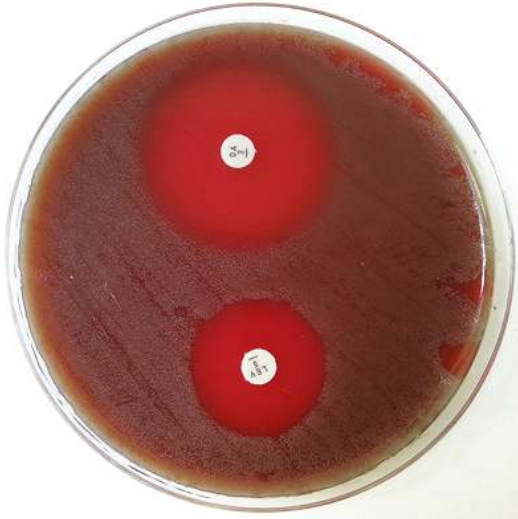




ISTRUZIONI PER L'USO

MUELLER HINTON AGAR F (MHA-F)

Piastrre pronte all'uso

Mueller Hinton Agar F: *S.pneumoniae* ATCC 49619**1 - DESTINAZIONE D'USO**Dispositivo diagnostico *in vitro*.

Terreno per l'esecuzione del test di sensibilità agli antibiotici dei batteri esigenti, con il metodo della disco-diffusione.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Estratto di carne	2,0 g
Digerito acido di caseina	17,5 g
Amido solubile	1,5 g
Agar	17,0 g
Sangue defibrinato di cavallo	50 mL
β -NAD	20 mg
Acqua purificata	1000 ml

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Lo sviluppo della resistenza batterica agli antibiotici nella prima metà del XX secolo, ha comportato la necessità per i medici di richiedere al laboratorio di microbiologia di testare l'agente patogeno contro varie concentrazioni di un determinato antimicrobico per determinare la suscettibilità o la resistenza a quel farmaco.¹ William M.M. Kirby propose un metodo a disco singolo per il test di sensibilità antimicrobica e, successivamente, Kirby e Bauer, revisionarono la letteratura sui test di sensibilità e pubblicarono i loro risultati, consolidando e aggiornando tutte le precedenti descrizioni del metodo della disco-diffusione.²

Attualmente, il Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) per gli USA ed EUCAST per l'Europa sono responsabili dell'aggiornamento e della modifica della procedura originale, attraverso un processo di consenso globale.^{5,6} Nei documenti pubblicati sono incluse anche le linee guida interpretative per le zone di inibizione.^{3,5}

Mueller Hinton Agar addizionato di sangue defibrinato di cavallo e di β -NAD è raccomandato e standardizzato da EUCAST⁴, per l'esecuzione del test di sensibilità agli agenti antimicrobici con il metodo dell'agar-diffusione con dischetti di carta contenenti antibiotici su ceppi d'isolamento clinico a crescita "fastidiosa": *Streptococcus pneumoniae*, Streptococchi *viridans*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida*, *Campylobacter jejuni e coli*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* ed *urinae*, *Kingella kingae*, *Aeromonas* spp. *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter jejuni e coli*.

Il sangue defibrinato di cavallo ed il β -NAD consentono la crescita di batteri esigenti con un'interferenza minima nei risultati del test di sensibilità.

4 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto	rosso brillante.
pH finale a 20-25 °C	7,3 \pm 0,1
Strato del terreno in piastra	4,0 \pm 0,5 mm

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Mueller Hinton Agar F (MHA-F) CND: W0104010403 EDMA: 14.01.04.0; RDM: 1444950/R	Piastrre pronte all'uso	541740F	2 x 10 piastrre \varnothing 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, materiali per la generazione di una atmosfera d'incubazione controllata, dischi di carta con antibiotici.

7 - CAMPIONI

Il test di sensibilità con il metodo della disco-diffusione è effettuato su colture pure dei ceppi in esame, isolati da campioni clinici.

Mueller Hinton Agar F non è destinato all'isolamento microbico direttamente da campioni clinici.

È consigliabile una colorazione Gram e un'identificazione batterica preliminare per la scelta appropriata degli agenti antimicrobici da testare. EUCAST ha pubblicato un metodo per il test di sensibilità rapido (lettura dopo 4, 6 o 8 ore di incubazione) direttamente dai flaconi per emocolture positivi, validato per alcuni batteri; consultare il documento EUCAST per la tecnica, la lettura e l'interpretazione delle zone di inibizione.⁶





8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

- Il metodo qui riportato è una sintesi della procedura di lavoro descritta nei documenti EUCAST a cui fare riferimento per i dettagli.^{4,5,7}
- La superficie dell'agar deve essere asciutta prima dell'uso. Non devono essere visibili gocce d'acqua sulla superficie dell'agar o all'interno del coperchio. Se necessario, asciugare le piastre a 20-25°C durante la notte o a 35°C, con il coperchio rimosso, per 15 minuti. Non asciugare eccessivamente le piastre.
- 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 (per *S.pneumoniae* da agar cioccolato preparare un'inoculo pari a McFarland 1). 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 F 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 deposti 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.
- 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 ± 1°C in CO₂ 4-6%, per 16-20 ore. Incubare le piastre con *Aeromonas* spp. e *Burkholderia pseudomallei* a 35 ± 1°C in aerobiosi per 18 ± 2 ore. Per *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* incubare a 41 ± 1°C per 24 ore in atmosfera microaerofila.
- In caso di crescite insufficienti di *Campylobacter* protrarre l'incubazione delle piastre per 40-48 ore. In caso di crescite insufficienti di *Corynebacterium*, *Aerococcus*, *Kingella* protrarre l'incubazione delle piastre per 40-44 ore.

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, leggere le piastre dalla parte anteriore con il coperchio rimosso e con luce riflessa.

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 apparissero 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.⁴

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.⁵

10 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre di Mueller Hinton Agar II sono testati in accordo alle regole di EUCAST.^{4,6} È comunque responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. EUCAST indica l'elenco dei ceppi batterici da impiegare per il controllo qualità⁴, riportati qui di seguito; 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. Verificare che i risultati dei ceppi di controllo rientrino negli intervalli di accettabilità delle tabelle EUCAST.⁶

- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 - ceppo con ridotta sensibilità alla benzilpenicillina
- *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 - ceppo sensibile
- *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 – ceppo sensibile
- *H.influenzae* ATCC 49247 – ceppo con ridotta sensibilità ai beta lattamici per mutazioni PBP.

Per i dettagli sulla scelta degli antibiotici, sui ceppi di controllo, sulla frequenza dei controlli e per le tabelle degli intervalli di accettabilità, consultare i documenti EUCAST.^{4,7}

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre di Mueller Hinton Agar F e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Mueller Hinton Agar II, REF 401740, addizionato di sangue defibrinato di cavallo e di β-NAD) sono testati per la produttività, per il test di sensibilità agli antibiotici su disco, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi: *S.pyogenes* ATCC 19615, *S.pneumoniae* ATCC 6305 and *L.monocytogenes* ATCC 19111. Dopo incubazione a 35-37°C per 16-20 h ore in aerobiosi si osserva l'entità delle crescite microbiche; tutti i ceppi mostrano buone crescite.

Il test di sensibilità agli agenti antimicrobici è eseguito in conformità al metodo EUCAST⁴ con i seguenti ceppi microbici/dischi con antibiotici: *S.pneumoniae* ATCC 49619 (CLI, ERY, LEV, SXT, VAN), *H.influenzae* ATCC 49766 (AMP, CTX, CIP, IMI, TET, SXT). Dopo incubazione a 35 ± 1°C in CO₂ 4-6%, per 16-20 ore si misurano le zone di inibizione e si verifica che siano all'interno degli intervalli per il controllo qualità riportato da EUCAST.^{5,17}

La concentrazione degli ioni Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ è determinata su tutti i lotti di produzione della materia prima terreno in polvere per assicurare una riproducibilità di risultati tra lotti diversi.





12 - LIMITI DEL METODO

- L'ottenimento di risultati accurati nel test di sensibilità per agar diffusione dipende oltre che dalla qualità del terreno di coltura, 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.⁸ È responsabilità dell'utilizzatore implementare un piano per il controllo qualità dei dischi con antibiotici.
- Una concentrazione errata dell'inoculo, la conservazione impropria dei dischi con antimicrobici, la conservazione impropria delle piastre con conseguente modifica dello strato del terreno e del pH, l'umidità eccessiva delle piastre, misurazioni scorrette delle zone di inibizione, sono tutti elementi che possono produrre risultati errati.⁹ Per garantire risultati affidabili è necessaria la stretta aderenza al protocollo di lavoro sopra riassunto.
- Nonostante la presenza di sangue animale e NAD, alcuni ceppi esigenti potrebbero non crescere o crescere solo leggermente sul terreno.
- Consultare i documenti EUCAST per i dettagli della procedura di lavoro, della lettura e dell'interpretazioni delle zone di inibizione, per le avvertenze, per i documenti di orientamento per il test di sensibilità, per le linee guida per il rilevamento dei meccanismi di resistenza, per i breakpoint clinici.
- Mueller Hinton Agar F può essere impiegato per la determinazione delle Minime Concentrazioni Inibenti con strisce contenenti gradienti di antibiotici. Per l'esecuzione di tale metodica si raccomanda di seguire le istruzioni d'uso del fornitore di strisce e di validare in laboratorio la procedura di lavoro.
- Il terreno in piastra qui descritto è da intendersi come un ausilio alle scelte terapeutiche per le infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati del test di sensibilità agli antimicrobici deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, 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.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare le piastre con le precauzioni d'uso specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- 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, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ




Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. 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, rotture dell'agar, colore alterato).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology (ASM), December 8, 2009.
2. Bauer AW, Perry DM, Kirby WM. Single disk antibiotic sensitivity testing of staphylococci. Analysis of technique and results. Arch Intern Med 1959; 104:208
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2020.
4. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing - Version 8.0 (January 2020). <http://www.eucast.org>.
5. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>.
6. Jonasson E, Matuschek E, Kahlmeter G. The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles. J Antimicrob Chemother 2020; 75: 968-978
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>.
8. Ahman J, Matuschek E, Kahlmeter G. The quality of antimicrobial discs from nine manufacturers EUCAST evaluations in 2014 and 2017. Clinical Microbiology and Infection 2019; 25:346-352
9. Matuschek E. EUCAST Educational Workshop. Technical problems and controversies in antimicrobial susceptibility testing. ECCMID 2017, Vienna, Austria.



**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Non riutilizzare	 Fragile maneggiare con cura

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	08/2020

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

