



## MUELLER HINTON CHOCOLATE AGAR

Piastre pronte



Mueller Hinton Agar Chocolate:  
*Neisseria gonorrhoeae*/spectinomicina

### DESTINAZIONE D'USO

Per la coltivazione di *N. gonorrhoeae* ed *H. influenzae* da campioni clinici e per test di sensibilità di microrganismi esigenti (*N. gonorrhoeae*).

### FORMULA TIPICA\*

Estratto di carne	2,0 g
Digerito acido di caseina	17,5 g
Amido solubile	1,5 g
Agar	17,0 g
Biovitex	10 ml
Sangue defibrinato cotto di cavallo	50 ml
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 della lettura ed interpretazione dei risultati. Più di recente è stato implementato un sistema di standardizzazione europeo (EUCAST).

Per i microrganismi a crescita "fastidiosa" i terreni raccomandati dagli organismi di standardizzazione sono i seguenti:

CLSI: Mueller Hinton Agar+5% Defibrinated Sheep Blood: *Streptococcus* spp.

CLSI: HTM: *Haemophilus* spp.

CLSI: Mueller Hinton Agar + supplemento di crescita: *N.gonorrhoeae*

EUCAST: MHA-F: *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp

Mueller Hinton Chocolate Agar è stato indicato in passato da CLSI per l'antibiogramma di *H.influenzae*. In accordo ad altri autori esso può essere impiegato per il test di sensibilità di *N.gonorrhoeae* con streptomina e penicillina (Berger).

Mueller Hinton Chocolate Agar contiene peptoni di carne e di caseina quali fonti di aminoacidi, vitamine e minerali per la crescita microbica, amido per la neutralizzazione dei composti tossici, sangue cotto di cavallo fonte di emoglobina per stimolare la crescita di *Haemophilus* spp e Biovitex, un supplemento chimicamente definito, per stimolare la crescita di *Neisseria* spp. La formulazione del Mueller Hinton Chocolate Agar si presta quindi alla coltivazione di *N. gonorrhoeae* ed *H. influenzae*.

### CARATTERISTICHE DEL TERRENO IN PIASTRA

Aspetto: terreno di colore marrone, opaco

pH finale a 25 °C: 7,3 ± 0,1

### MATERIALI FORNITI

Piastre pronte all'uso di Mueller Hinton Chocolate Agar

### MATERIALI NON FORNITI

Anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori, dischi o tavolette impregnati di antibiotici, standard McFarland 0.5, materiali per la generazione dell'atmosfera di incubazione controllata, termostato e strumentazione di laboratorio.

### CAMPIONI

Mueller Hinton Chocolate Agar, quando impiegato per il test di sensibilità, deve essere seminato con ceppi microbici d'isolamento clinico in coltura pura. Quando impiegato per l'isolamento di *N. gonorrhoeae* ed *H. influenzae* può essere inoculato direttamente con campioni clinici raccolti con tampone e conservato in appropriato terreno di trasporto. Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

**PROCEDURA DELL'ANALISI**

Portare le piastre a temperatura ambiente. Ruotare il tampone con il quale è stato raccolto il campione su un'area ristretta della piastra, quindi strisciare con un'ansa su quattro quadranti della piastra, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate. Incubare le piastre inoculate con il materiale in esame a 35-37°C in atmosfera umida con il 5-10% CO<sub>2</sub>, per 24-48 ore.

Per l'antibiogramma con *N.gonorrhoeae* operare come segue:

- 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. Questa sospensione deve essere usata entro 60 minuti dalla preparazione.
- Immergere un tampone di cotone nella sospensione. Spremere il tampone sulle pareti della provetta per evitare un eccesso di inoculo.
- Con il tampone di cotone inoculare la piastra di Mueller Hinton Chocolate Agar 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.
- Incubare a 35 ± 1 °C in CO<sub>2</sub> 4-6% per 20-24 ore.

**LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica delle colonie. Su piastre di Mueller Hinton Chocolate Agar le colonie di *Haemophilus influenzae* hanno un diametro di circa 1-2 mm, sono incolori, trasparenti, umide e tendono ad essere traslucide. Le colonie di *N.gonorrhoeae* sono di diametro variabile (0,5 - 2 mm), moderatamente convesse, sollevate, finemente granulari, traslucide, con bordi interi o lobati.

L'identificazione completa dei microrganismi coltivati sul terreno deve essere effettuata con metodologie biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato.

Per la lettura dell'antibiogramma operare come segue:

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.

Rimuovere il coperchio della piastra e misurare gli aloni di inibizione, tenendo conto del punto di completa inibizione della crescita,

Interpretare la misura degli aloni per la categorizzazione del ceppo in Sensibile/Intermedio/Resistente facendo uso delle tabelle riportate in letteratura. La sensibilità alla penicillina deve essere confermata con un test della beta lattamasi.

**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.

Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUB, T° / t / ATM	SPECIFICHE
<i>H.influenzae</i> ATCC 10211	35 °C / 24H / CO <sub>2</sub>	buona crescita
<i>N.gonorrhoeae</i> ATCC 43069	35 °C / 24H / CO <sub>2</sub>	
Penicillina 10 U		33-40 mm
Spectinomycin 100 mcg		25-31 mm

**LIMITI DEL METODO**

- Le tabelle CLSI per *N.gonorrhoeae* non sono applicabili poiché il terreno per il test di sensibilità è diverso.
- 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. 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.
- Nonostante la presenza di sangue animale cotto e di NAD, alcuni ceppi a crescita "fastidiosa" possono non crescere o crescere stentatamente sul terreno.
- 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 sangue animale. Anche se esso è raccolto in ambiente controllato, da animali sani e con la supervisione veterinaria, è comunque consigliabile maneggiare le piastre con le precauzioni adeguate, considerandole come potenzialmente infettive.
- Il prodotto qui descritto contiene peptoni di origine animale. Scaricare da sito web [www.biolifeitaliana.it](http://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](http://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.
- Berger, U. 1992. Neisseriaceae. In: Mikrobiologische Diagnostik (F. Burkhardt, ed.). Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard M2 A4 - Seventh Edition. American National Standard.
- NCCLS Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twelfth Informational Supplement. NCCLS Document M100 – S12, January 2002.

### CONFEZIONI

**541742 Mueller Hinton Chocolate Agar,**  
2 x 10 piastre ø 90 mm, confezionate in film plastico / scatola di cartone  
CODICE CND: W0104010403 – RDM: 1444961/R



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