

**ISTRUZIONI PER L'USO****MUELLER HINTON CHOCOLATE AGAR****Piastre pronte all'uso****1 - DESTINAZIONE D'USO**

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Per la coltivazione di *N.gonorrhoeae* ed *H.influenzae* da campioni clinici.

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
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.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

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*.^{1,2}

Mueller Hinton Chocolate Agar è stato indicato in passato da CLSI per l'antibiogramma di *H.influenzae*.

Per i microrganismi a crescita "fastidiosa" i terreni raccomandati dagli organismi di standardizzazione^{3,4} sono ora 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

In accordo ad altri autori, Mueller Hinton Chocolate Agar può essere impiegato per il test di sensibilità di *N.gonorrhoeae* con spectinomycin e penicillina.⁵

4 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto	marrone, opaco
pH finale a 20-25 °C	7,3 ± 0,1

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Mueller Hinton Chocolate Agar	Piastre pronte all'uso	541742	2 x 10 piastre ø 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 di incubazione controllata con CO₂ o incubatore a CO₂ con umidificatore, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

Mueller Hinton Chocolate Agar, quando impiegato per il test di sensibilità, deve essere seminato con ceppi microbici d'isolamento clinico in coltura pura. Mueller Hinton Chocolate Agar 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. Consultare la bibliografia citata per i campioni da esaminare in rapporto a specifiche infezioni.⁶⁻⁸ Le piastre di Mueller Hinton Chocolate Agar non sono indicate per la semina diretta di campioni di sangue. Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici.⁶ Mueller Hinton Chocolate Agar, se impiegato per il test di sensibilità, deve essere seminato con ceppi microbici d'isolamento clinico in coltura pura.

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente. Inoculare con il materiale strisciando con l'ansa su quattro quadranti della piastra, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate assicurandosi che la semina sul quarto quadrante non si sovrapponga a quella del primo. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su una area ristretta in prossimità del bordo piastra, quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa.

Incubare a 35-37 °C in atmosfera al 5-10% di CO₂ ed osservare dopo 18-24, 48 ore.

L'utilizzatore è responsabile della scelta del tempo di incubazione, della temperatura e dell'atmosfera appropriata, a seconda del campione in esame, delle esigenze nutrizionali degli organismi da isolare e dei protocolli operativi locali applicabili. Consultare le procedure descritte in bibliografia per ulteriori informazioni.^{7,8}

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 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.
- Incubare a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ in CO_2 4-6% per 20-24 ore.

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

Le colonie di *Haemophilus influenzae* hanno un diametro di circa 1-2 mm sono incolori, trasparenti, umide e tendono ad essere traslucide, con un caratteristico odore "di topo".

Le colonie di *N.gonorrhoeae* sono di diametro variabile (0,5 - 2 mm), moderatamente convesse, sollevate, finemente granulari, luccicanti, con margini interi o lobati.

Per altri microrganismi esigenti, fare riferimento alle procedure citate in bibliografia, per la lettura e l'interpretazione dei risultati.^{7,8}

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.

10 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà 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. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.⁹

CEPPI DI CONTROLLO	INCUB, T° / t / ATM	SPECIFICHE
<i>H.influenzae</i> ATCC 10211	35°C / 24H / CO_2	buona crescita
<i>N.gonorrhoeae</i> ATCC 43069	35°C / 24H / CO_2	buona crescita

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi dei lotti di piastre di Mueller Hinton Chocolate Agar sono testati per la produttività, valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi: *H.influenzae* ATCC 10221, *N.gonorrhoeae* ATCC 43069. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in atmosfera al 5-10% di CO_2 si osserva l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano buone crescite. I lotti di piastre pronte sono inoltre testate con il test di sensibilità per agar diffusione con *N.gonorrhoeae* ATCC 43069 ed i dischi di penicillina 10 UI e spettinomicina 100 mcg valutando che gli aloni di inibizione siano entro le specifiche definite.

12 - LIMITI DEL METODO

- A volte, nel terreno può essere osservata la presenza di piccole particelle. Questo fenomeno non influisce sulle prestazioni del terreno.
- La crescita microbica su Mueller Hinton Chocolate Agar dipende dalle esigenze metaboliche di ciascun microrganismo; è possibile che alcuni ceppi non siano in grado di crescere sul terreno.
- A seconda dei campioni analizzati e dei microrganismi da isolare, si consiglia di utilizzare anche terreni selettivi come Thayer Martin per l'isolamento del gonococco e agar cioccolato con bacitracina per l'isolamento di *H.influenzae*.
- Per la crescita di *N.gonorrhoeae* è necessario che la superficie delle piastre sia umida; se appare secca, umidificare con alcune gocce di acqua distillata sterile. Posizionare una garza umida nel contenitore per l'incubazione in CO_2 o utilizzare un termostato con umidificatore.¹
- Utilizzare tamponi di dacron o di alginato di calcio per la raccolta dei campioni, evitare i tamponi di cotone poiché contengono acidi grassi che sono inibitori delle *N.gonorrhoeae*.¹
- I gonococchi sono tra i batteri Gram negativi più fragili. Inoculare qualsiasi campione sospetto di contenere *Neisseria* sul terreno di isolamento primario immediatamente al momento del prelievo per evitare qualsiasi perdita di vitalità e/o crescita eccessiva di contaminanti; se ciò non fosse possibile, i tamponi di *N.gonorrhoeae* devono essere mantenuti a 4-6°C per non più di 3 ore.¹
- Se si sospetta la presenza nel campione di *N.gonorrhoeae*, la temperatura d'incubazione dovrebbe essere impostata a 35-36,5°C con 5% di CO_2 , poiché molti ceppi di *N.gonorrhoeae* non cresceranno bene a 37°C e con il 10% di CO_2 .^{1,9}
- La presenza di colonie su Mueller Hinton Chocolate Agar non è di per sé un'indicazione della presenza di microrganismi patogeni nel campione: l'utilizzatore deve differenziare potenziali agenti patogeni che richiedono l'antibiogramma e test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa per l'identificazione completa, da contaminanti, membri di microbiota normale del campione.
- Mueller Hinton Chocolate Agar non è il terreno raccomandato da CLSI ed EUCAST per l'antibiogramma su *Haemophilus* e *Neisseria*. Nel caso venga utilizzato questo terreno, l'utilizzatore è responsabile della validazione della procedura e dei risultati ottenuti.
- Il terreno di coltura 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 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 il prodotto 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.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- 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 tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico in vitro.
- 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. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
2. 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.
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. Berger, U. 1992. Neisseriaceae. In: Mikrobiologische Diagnostik (F. Burkhardt, ed.). Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
6. Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.270.
7. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. 2003; Geneve: World Health Organization.
8. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019.
9. CDC: Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Screening Tests To Detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Infections Recommendations and Reports. October 18, 2002 / Vol. 51 / No. RR-15

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
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2022
Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	03/2023

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

