

## BD Mueller Hinton Chocolate Agar

### NAMJENA

**BD Mueller Hinton Chocolate Agar** (Čokoladni agar BD Mueller Hinton) koristi se za izolaciju i uzgoj zahtjevnih bakterija iz kliničkih uzoraka. Može se koristiti i za ispitivanje osjetljivosti bakterije *Neisseria gonorrhoeae*.

### NAČELA I OBJAŠNJENJE POSTUPKA

Mikrobiološka metoda.

Budući da su klinički mikrobiološki laboratoriji ranih 1960-ih godina koristili veliki broj različitih postupaka za određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike i kemoterapijske agense, Bauer, Kirby i drugi razvili su standardizirani postupak u kojem je agar Mueller Hinton, podloga originalno namijenjena izolaciji gonokoka, odabrana kao podloga za ispitivanje.<sup>1-4</sup> Kasnija međunarodna zajednička studija potvrdila je vrijednost agara Mueller Hinton za ovu namjenu zbog relativno dobre reproduktivnosti podloge, jednostavnosti formule i velike količine eksperimentalnih podataka koji su skupljeni korištenjem ove podloge.<sup>5</sup>

Prema CLSI-ju, preporučena podloga za disk difuzijsko ispitivanje osjetljivosti bakterije *Streptococcus pneumoniae* je agar Mueller Hinton s 5% ovčje krvi. Preporučena podloga za *Haemophilus influenzae* je agar Haemophilus Test Medium (HTM). Kriteriji interpretacije navedeni su u CLSI-jevom dokumentu M100 (M2) koji je uključen u CLSI-jev dokument M2, Standardi učinkovitosti za ispitivanja osjetljivosti protumikrobnih diskova; Odobreni standard.<sup>6</sup> Preporučena podloga za bakteriju *Neisseria gonorrhoeae* je agar GC s određenim dodatkom za rast. Prema drugim podacima, agar Mueller Hinton obogaćen heminom i Iso-VitaleX-om može se koristiti za rutinsko ispitivanje osjetljivosti bakterije *N. gonorrhoeae* na penicilin i spektinomycin.<sup>7</sup>

Agar Mueller Hinton obogaćen sa zagrijanom krvi ili hemoglobinom i faktorima rasta (npr. **BD IsoVitaleX**) preporučuje se kao neselektivna podloga za izolaciju bakterija *Neisseria* i *Haemophilus*.<sup>8</sup>

**BD Mueller Hinton Chocolate Agar** goveđi ekstrakt i pepton iz kazeina opskrbljuju hranjivim tvarima. Škrob apsorbira toksične supstance kao što su masne kiseline sa štapića s vatom. Hemoglobin daje faktor X. **BD IsoVitaleX** opskrbljuje vitaminima i faktorima rasta, uključujući faktor V (=NAD) koji je neophodan za rast bakterije *Haemophilus influenzae*.

### REAGENSI

#### BD Mueller Hinton Chocolate Agar

Formula\* po litri pročišćene vode

Goveđi ekstrakt	2,0 g
Kiseli hidrolizat kazeina	17,5
Škrob	1,5
Hemoglobin	10,0
<b>IsoVitaleX</b>	10,0 mL
Agar	17,0 g

pH 7,3 ± 0,2

\*Prilagođeno i/ili dodano prema potrebi kako bi se udovoljilo kriterijima učinkovitosti.

Obogaćenje **BD IsoVitalex** sadrži sljedeće faktore rasta (formula\* po litri pročišćene vode):

Vitamin B <sub>12</sub>	0,01 g
L-Glutamin	10,0
Adenin	1,0
Guanin hidroklorid	0,03
p-Aminobenzoična kiselina	0,013
Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD)	0,25

Tiamin pirofosfat	0,1
Željezov nitrat	0,02
Tiamin hidroklorid	0,003
Cistein hidroklorid	25,9
L-Cistin	1,1
Glukoza	100,0

\*Prilagođeno i/ili dodano prema potrebi kako bi se udovoljilo kriterijima učinkovitosti.

## MJERE OPREZA

**IVD** . Samo za profesionalnu primjenu. 

Ne upotrebljavajte pločice ako su vidljivi znakovi kontaminacije mikrobima, promjena boje, sušenje, pucanje ili ostali znakovi pogoršanja kvalitete. Preveliko skupljanje podloge uslijed sušenja može dovesti do lažnih rezultata osjetljivosti.

Pogledajte dokument **OPĆE UPUTE ZA UPOTREBU** o postupcima aseptičnog rukovanja, biološkim opasnostima i odlaganju iskorištenog proizvoda.

## ČUVANJE I ROK VALJANOSTI

Po primitku pohranite pločice na tamnom mjestu pri temperaturi od 2 – 8 °C u originalnom pakiranju do trenutka upotrebe. Pazite da ne dođe do smrzavanja i pregrijavanja. Pločice se mogu inokulirati do datuma isteka valjanosti (pogledajte naljepnicu na pakiranju) te inkubirati tijekom preporučenih rokova inkubacije.

Pločice iz otvorenih pakiranja po 10 pločica mogu se koristiti tjedan dana ako se čuvaju na čistom mjestu pri temperaturi od 2 – 8 °C.

## KORISNIČKA KONTROLA KVALITETE

Inokulirajte reprezentativne uzorke sa sljedećim sojevima (za detalje pogledajte dokument **OPĆE UPUTE ZA UPOTREBU**). Inkubirajte pločice na 35 ± 2 °C u aerobnoj atmosferi kojoj je dodan ugljični dioksid. Očitajte pločice nakon 18 – 24 sata i nakon 42 – 48 sati inkubacije.

Sojevi	Rezultati rasta
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	Dobar do odličan rast
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 43069	Prosječan do odličan rast
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	Dobar do odličan rast
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Dobar do odličan rast
Nije inokulirano	Čokoladno smeđa boja, neprozirna, može biti malo nehomogena

Za inokulaciju i inkubaciju testova osjetljivosti pogledajte **Postupak ispitivanja**.

Testni soj	Disk za ispitivanje osjetljivosti	Veličina zone* (mm)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226	Penicilin P-10	33 – 40
	Spektinomycin SPT-100	25 – 31

\* Veličine zona temelje se na rezultatima najmanje 3 različita pakiranja **BD Mueller Hinton Chocolate Agar**

## POSTUPAK

### Priloženi materijal

**BD Mueller Hinton Chocolate Agar** (pločice **Stacker** od 90 mm). Mikrobiološki kontrolirano.

### Materijal koji nije priložen

Podloge za dodatne kulture, reagensi i laboratorijska oprema prema potrebi.

### Vrste uzoraka

**BD Mueller Hinton Chocolate Agar** može se, prije svega, koristiti za sve vrste uzoraka infekcija za koje se sumnja da sadrže zahtjevne organizme, osobito, ali ne isključivo za uzorke s primarno sterilnih tjelesnih mjesta (npr. cerebrospinalni likvor, apscesi) i kao podloga potkulture iz kulture krvi. Njegova glavna namjena je za neselektivnu izolaciju bakterija *Neisseria*,

*Haemophilus* i drugih bakterija koje ne rastu na rutinski korištenoj podlozi s krvnim agarom, kao što je agar Columbia s 5% ovčje krvi. (pogledajte također **KARAKTERISTIKE SVOJSTAVA I OGRANIČENJA POSTUPKA**).

Ako se ova podloga koristi za rutinsko ispitivanje osjetljivosti bakterije *Neisseria gonorrhoeae* s penicilinom G i spektinomycinom, treba koristiti čiste kulture. Nemojte inokulirati s uzorkom za direktno ispitivanje osjetljivosti!

### **Prikupljanje uzoraka i transport**

*Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Haemophilus* i drugi zahtjevni organizmi osjetljivi su na nepovoljne uvjete u okruženju. Zbog toga za sve uzorke treba koristiti odgovarajući medij za transport. Uzorci se moraju poslati u laboratorij što je prije moguće te ne smiju biti stariji od 24 sata, čak i u slučaju da se koristi mediji za transport. Optimalna temperatura za transport je 20 – 25 °C. Nemojte stavljati u hladnjak!<sup>9,10</sup>

### **Postupak ispitivanja**

Za izolaciju zahtjevnih organizama razmažite uzorak odmah po primitku u laboratorij. Pločica s razmazom primarno se koristi za izolaciju čistih kultura iz uzoraka koji sadrže miješanu floru. Drugi način je, u slučaju da se kultura nanosi na materijal izravno štapićem, da štapić protrljate po malom dijelu površine na rubu, a zatim razmažete iz tog inokuliranog dijela.

Ako se uzorak prikuplja s tjelesnog mjesta koje sadrži normalnu floru, također ga treba inokulirati na odgovarajuću selektivnu podlogu, ovisno o patogenom agensu koji se izolira. Za bakteriju *Neisseria gonorrhoeae* treba uključiti modificirani **BD Martin-Lewis Agar** ili pločicu **BD GC-Lect Agar**, a za bakteriju *Haemophilus* **BD Chocolate Agar with IsoVitaleX and Bacitracin**. Inkubirajte pločice na 35 ± 2 °C u aerobnoj atmosferi kojoj je dodan ugljični dioksid. Očitajte pločice nakon 18 – 24 sata i nakon 42 – 48 sati inkubacije.

Za rutinsko ispitivanje osjetljivosti bakterije *N. gonorrhoeae* izolatom koji mora biti čista kultura, treba otopiti u sojinom bujonu **BD Trypticase Soy Broth** kako bi zamućenost odgovarala standardu McFarland 0,5. U roku od 15 min od podešavanja zamućenosti inokuluma umočite sterilni štapić u ispravno razrijeđeni inokulum i okrenite ga nekoliko puta čvrsto prema gornjoj unutrašnjoj stijenci epruvete kako biste iscijedili višak tekućine.

Inokulirajte cijelu površinu pločice agara tri puta, zakrećući pločicu za 60° između razmazivanja kako biste postigli ravnomjernu inokulaciju.

Diskove postavite pomoću dozatora protumikrobnih diskova uz aseptične mjere opreza. Diskove postavite tako da su im središta međusobno udaljena najmanje 24 mm. Preporučuje se postavljanje diskova s penicilinom tako da nisu udaljeni manje od 10 mm od ruba Petrijeve zdjelice. Nakon što diskove postavite na agar, pritisnite ih sa sterilnom iglom ili pincetom radi potpunog kontakta s površinom podloge. Ovaj korak nije potreban ako se diskovi postavljaju pomoću dozatora **BD Sensi-Disc** sa samopopunjavanjem sa 6 ili 8 mjesta.

Unutar 15 minuta nakon postavljanja diskova, okrenite pločice i inkubirajte ih u aerobnoj atmosferi obogaćenoj s 5% ugljičnog dioksida na 35 – 37 °C tijekom 20 – 24 sata.

### **Rezultati**

Tipična morfologija kolonija na **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** je kako slijedi:

<i>Haemophilus influenzae</i>	Male, vlažne, sedefaste s karakterističnim „pljesnivim” mirisom
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Male, sivkastobijele do bezbojne, mukoidne
<i>Neisseria meningitidis</i>	Srednje do velike, plavosive, mukoidne
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Male, plosnate ili veće, mukoidne zelenkaste kolonije, kolonije oko podloge mogu biti zelenkaste

Testovi osjetljivosti: Zone se moraju očitavati s vrha pločice. Osjetljivost na penicilin treba potvrditi testom s beta-laktamazom, npr. test **BD Cefinase**.

### **KARAKTERISTIKE SVOJSTAVA I OGRANIČENJA POSTUPKA**

**BD Mueller Hinton Chocolate Agar** obogaćena je neselektivna podloga na kojoj rastu zahtjevne i nezahtjevne bakterije, uključujući normalnu floru. Zbog toga se preporučuje da se uzorci inokuliraju također i na odgovarajuću selektivnu podlogu.

Pojam „zahtjevne bakterije” odnosi se na bakterije koje uopće ne rastu ili ne rastu dobro na primarnim podlogama za izolaciju s ovčjom krvi koje se obično koriste, to su npr. bakterije *Haemophilus*, patogene bakterije *Neisseria* i više drugih organizama. Pogledajte reference za detaljne opise vrste uzoraka koji se moraju inokulirati na ovu podlogu i vrste organizama za čiju izolaciju se ova podloga koristi.<sup>10,11</sup>

Ova podloga nije testirana za poticanje rasta nutritivno varijabilnih streptokoka (NVS).

Broj i vrsta bakterijskih vrsta koje se pojavljuju kao infektivni agensi vrlo je velik. Stoga, prije nego što se ova podloga rutinski počne upotrebljavati za rijetko izolirane ili novoopisane mikroorganizme, njezinu prikladnost korisnik mora prvo ispitati uzgojem čistih kultura na organizmu o kojemu se radi.

Veličine zona na testovima osjetljivosti nađene na ovoj podlozi nisu u potpunom suglasju s onima navedenima u CLSI-jevom standardu M2<sup>6</sup> koji je zabilježen s čokoladnog agara GC s određenim dodatkom za rast.

## REFERENCE

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. Schoenkecht, and W.M.M. Kirby. 1970. Disc sensitivity testing. *Hospital Practice* 5:91-100.
3. 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.
4. 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.
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](http://www.clsi.org)
7. Berger, U. 1992. *Neisseriaceae. In: Mikrobiologische Diagnostik* (F. Burkhardt, ed.). Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
8. Nash, P., and M.M. Krenz. Culture media. *In: Manual of clinical microbiology*, (Balows, A., et al., eds.). 5<sup>th</sup> edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
9. Miller, J.M., and H.T. Holmes. 1995. Specimen collection, transport, and storage. *In: Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 6th ed.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Forbes, B.A., and P.A. Granato. 1995. Processing specimens for bacteria. *In: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.). 1995. *Manual of clinical microbiology, 6th ed.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.

## PAKIRANJE/DOSTUPNOST

### Čokoladni agar BD Mueller Hinton

Kat. br. 254035

Pločaste podloge spremne za upotrebu, cpu 20

Kat. br. 254082

Pločaste podloge spremne za upotrebu, cpu 120

## DODATNE INFORMACIJE

Dodatne informacije zatražite od lokalnog predstavnika tvrtke BD.



**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/>

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

© 2011 BD