

MUELLER HINTON AGAR

INDICAZIONI

Terreno di riferimento per i test di sensibilità dei batteri agli antibiotici e ai sulfamidici. È anche utilizzato per l'isolamento di *Neisseria* ed è una base eccellente per la preparazione dei terreni al sangue.

STORIA

Mueller e Hinton, nel tentativo di sviluppare un terreno trasparente che fosse in grado di resistere al processo di sterilizzazione in autoclave, selezionarono il terreno complesso di Gordon e Hine e ne determinarono gli elementi essenziali. Essi scoprirono che l'amido poteva rimpiazzare l'estratto di piselli sia in termini di valore nutritivo che come agente di protezione contro le sostanze tossiche presenti nel terreno. In seguito notarono che il prodotto della digestione pancreatico della carne poteva essere sostituito dall'idrolisato acido di lisina, favorendo in questo modo la crescita di gonococchi e meningococchi.

Nel 1966, Bauer, Kirby, Shervis e Turck raccomandarono il terreno di Mueller Hinton per i test di sensibilità agli antibiotici con il metodo di diffusione in agar. Il Comitato Nazionale per la Standardizzazione dei Laboratori Clinici (NCCLS) pubblicò infine un metodo di controllo standardizzato per il metodo di Kirby-Bauer.

PRINCIPI

- La scelta degli ingredienti è stata valutata in modo tale da ottenere:
- una bassissima quantità di timina e timidina, sostanze che notoriamente inibiscono l'attività antibatterica del trimethoprim;
- una bassissima quantità di acido para-amminobenzoico (PABA) e dei suoi analoghi strutturali, che esercitano attività antagonista nei confronti dei sulfamidici;
- causa l'influenza esercitata da calcio e magnesio sulla sensibilità dei ceppi di *Pseudomonas* verso gli aminoglicosidi, Reller e Coll. raccomandarono i seguenti limiti di concentrazione ionica:
 - calcio: 50-100 mg/litro
 - magnesio: 20-35 mg/litro;
- il metodo di Kirby-Bauer si basa sulla diffusione degli antibiotici impregnati in dischi di carta, precedentemente essiccati, depositati sulla superficie dell'agar. Questi dischi, una volta applicati sulla superficie dell'agar, assorbono una quantità d'acqua sufficiente a dissolvere l'antibiotico che quindi diffonde nel terreno secondo la legge fisica della diffusione molecolare attraverso un gel. In questo modo, attorno a ciascun disco si forma un gradiente di concentrazione dell'antibiotico. I batteri inoculati sulla superficie dell'agar si moltiplicano contemporaneamente alla diffusione dell'antibiotico. La moltiplicazione dei batteri è tuttavia più rapida della diffusione dell'antibiotico durante la fase logaritmica di crescita e le cellule batteriche non inibite continuano pertanto a moltiplicarsi fino a quando tale crescita può essere visualizzata. Se l'antibiotico è presente a concentrazioni inibenti non si osserva alcuna crescita. A questo punto è possibile misurare il diametro della zona di inibizione, che è direttamente proporzionale alle concentrazioni minime inibenti riscontrate con il metodo della diluizione. Apposite tabelle consentono quindi di interpretare i risultati per stabilire se i batteri sono sensibili o resistenti all'antibiotico in esame.

PREPARAZIONE

- Sospendere 38,0 g di terreno disidratato in 1 litro di acqua distillata o deionizzata.
- Portare lentamente a ebollizione, agitando fino a completa soluzione.
- Distribuire in provette o flaconi.
- Sterilizzare in autoclave a 115°C per 15 minuti.

NOTA

La preparazione del terreno richiede un'acqua di elevata qualità perché i livelli di calcio e magnesio devono essere attentamente monitorati.

ISTRUZIONI PER L'USO: Test di sensibilità agli antibiotici.

Terreno:

- Raffreddare e mantenere il terreno a 47°C.
- Versare in piastre Petri sterili.
- L'agar deve avere uno spessore di 4 mm.
- Lasciare solidificare su una superficie fredda.
- Asciugare la superficie dell'agar, ponendo le piastre in termostato con i coperchi parzialmente aperti per il tempo strettamente necessario, per evitare la formazione di gocce d'acqua sulla superficie dell'agar, un fenomeno che potrebbe deteriorare le qualità di diffusione nel terreno.

Inoculo: Metodo Standard di Kirby Bauer

- Lo spettro antibiotico deve essere determinato con un ceppo patogeno puro.
- Trasferire 4 o 5 colonie in un brodo appropriato (Tryptone Soy Broth, M046-17-K).
- Incubare a 37°C (solitamente per 2-5 ore), fino a ottenere una opacità equivalente alla opacità standard di una sospensione di solfato di bario (densità 0,5 secondo la scala MacFarland).

Semina: Metodo Standard di Kirby Bauer.

- Immergere un tampone di cotone sterile nella brodocoltura, rettificata ad opacità standard e drenare il brodo in eccesso premendo il tampone sulle pareti della provetta. Seminare sulla superficie dell'agar. Il tampone deve essere strisciato 2 o 3 volte sull'intera superficie per ottenere una distribuzione omogenea.
- Lasciare asciugare le piastre per 10 minuti prima di depositare i dischi.

NOTA

Il metodo di Kirby e Bauer garantisce i risultati più affidabili e riproducibili. E' possibile utilizzare anche altri protocolli, a condizione che l'inoculo e il metodo di semina siano precedentemente studiati e standardizzati.

Applicazione dei dischi e incubazione

- Depositare i dischi esercitando una leggera pressione per garantire una corretta adesione all'agar.
- I dischi devono essere applicati ad almeno 15 mm dal bordo della piastra e sufficientemente distanziati affinché gli aloni di inibizione non si sovrappongano.

RISULTATI

Misurare gli aloni di inibizione.

Per stabilire una eventuale correlazione tra l'alone di inibizione e la concentrazione minima inibente (MIC), consultare la tabella di interpretazione degli aloni di inibizione distribuita dai fornitori dei dischi per antibiogramma.

COMPOSIZIONE TIPICA (rettificabile per ottenere un rendimento ottimale)

Per 1 litro di terreno:

- Idrolisato acido di caseina..... 17,5 g
- Infusione di manzo..... 2,0 g
- Amido solubile 1,5 g
- Agar batteriologico..... 17,0 g

pH del terreno pronto per l'uso a 25°C: 7,3 ± 0,2.

500 g di polvere consentono la preparazione di 13,1 litri di terreno.

CONTROLLO DI QUALITA'

- Terreno disidratato: polvere biancastra, omogenea e priva di grumi.
- Terreno preparato: agar di colore ambra.
- Tipica risposta della coltura (*) dopo 24 ore di incubazione a 37°C:

Microrganismi	Crescita
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Buona-eccellente
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Buona-eccellente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	Buona-eccellente
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	Buona-eccellente

(*) Per i test di sensibilità agli antibiotici fare riferimento agli standard NCCLS.

CONSERVAZIONE/STABILITA'

- **Terreno disidratato:** 2-30°C.
La data di scadenza è indicata sull'etichetta.
- **Terreno preparato** (valore indicativo):
 - Flaconi: 6 mesi a 2-8°C.
 - Piastre: 1 mese a 2-8°C.

BIBLIOGRAFIA

- Mueller, J.H., and Hinton, J. 1941. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **48**: 330-333.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., **45**: 493-496.
- Daguet, G.L., et Chabbert, Y.A. 1972. Techniques en bactériologie. 3. Sérologie bactérienne, antibiotiques en bactériologie médicale. Ed. Flammarion, Paris.
- Reller, L.B., Schoenknecht, F.D., Kenny, M.A., and Sherris, J.C. 1974. Antibiotic susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*: selection of a control strain and criteria for magnesium and calcium content in media. J. Infect. Dis., **130**: 454-463.
- Acar, J.F. 1976. Journées Nationales de Biologie. Grenoble-Lyon.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1984. Approved standard : M2 A3. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 3rd Ed. NCCLS, Villanova, Pa.
- Courvalin, P., Goldstein, F., Philippon, A., et Sirot, J. 1985. L'antibiogramme. MPC. Bruxelles.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard. 1987. Second informational supplement : M100-S2. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, NCCLS, Villanova, Pa.

PRESENTAZIONE

MUELLER HINTON AGAR

Confezione	500 g (13,1 litri di terreno finale)
Codice	M048-17-K

Le informazioni e le specifiche contenute in questa scheda tecnica, datate 29.09.1999, sono suscettibili di modifica in qualsiasi momento, senza preavviso. Le informazioni trascritte sull'etichetta del prodotto sono prioritarie rispetto alle formulazioni o alle istruzioni descritte in questo documento.

