

BD Mueller Hinton Chocolate Agar

VERWENDUNGSZWECK

BD Mueller Hinton Chocolate Agar (Mueller-Hinton-Schokoladenagar) wird für die Isolierung und Kultivierung von anspruchsvollen Bakterien aus klinischen Proben verwendet. Das Medium ist ebenfalls für die Empfindlichkeitsprüfung von *Neisseria gonorrhoeae* geeignet.

GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.

Da klinische Mikrobiologielabors in den frühen 1960ern eine breite Vielzahl verschiedener Verfahren benutzten, um die Empfindlichkeit von Bakterien gegen antibiotische und chemotherapeutische Agenzien zu bestimmen, haben Bauer, Kirby und andere ein standardisiertes Verfahren entwickelt, für welches Mueller-Hinton-Agar, ursprünglich als Medium zur Isolierung von Gonokokken konzipiert, als Testmedium ausgewählt wurde.¹⁻⁴ Eine nachfolgende internationale Gemeinschaftsstudie hat auf Grund der relativ guten Reproduzierbarkeit des Mediums, der Einfachheit seiner Rezeptur und der großen Fülle der bereits mit diesem Medium gesammelten Versuchsdaten, den Nutzen von Mueller-Hinton-Agar für diesen Zweck bestätigt.⁵

Gemäß CLSI ist das empfohlene Medium für Empfindlichkeitsprüfung von *Streptococcus pneumoniae* mittels Blättchen-Diffusion Mueller-Hinton-Agar mit 5 % Schafblut. Das empfohlene Medium für *Haemophilus influenzae* ist das Haemophilus Testmedium (HTM). Die Interpretationskriterien wurden im CLSI-Dokument M100 (M2) veröffentlicht, welches im CLSI-Dokument M2 *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 7th ed.; Approved Standard* enthalten ist.⁶ Das für *Neisseria gonorrhoeae* empfohlene Medium ist GC-Agar mit einem spezifischen, wachstumsfördernden Zusatz. Gemäß anderer Daten kann Mueller-Hinton-Agar mit Hämin und Iso-VitaleX für routinemäßige Empfindlichkeitsprüfungen von *N. gonorrhoeae* gegen Penicillin und Spectinomycin verwendet werden.⁷

Mueller-Hinton-Agar mit einem Zusatz von aufgewärmtem Blut oder Hämoglobin und Wachstumsfaktoren (z.B. **BD IsoVitaleX**) wurde als nicht selektives Medium zur Isolierung von *Neisseria* und *Haemophilus* empfohlen.⁸

In **BD Mueller Hinton Chocolate Agar** liefern Rindfleischextrakt und Casein-Peptide die Nährstoffe. Stärke absorbiert toxische Verbindungen, wie z.B. von Wattetupfern stammende Fettsäuren. Hämoglobin liefert den Faktor X. **BD IsoVitaleX** liefert Vitamine und Wachstumsfaktoren, einschließlich Faktor V (=NAD), welcher für das Wachstum von *Haemophilus influenzae* benötigt wird.

REAGENZIEN

BD Mueller Hinton Chocolate Agar

Zusammensetzung* pro Liter destilliertem Wasser

Rindfleischextrakt	2,0 g
Säurehydrolysat von Casein	17,5
Stärke	1,5
Hämoglobin	10,0
IsoVitaleX	10,0 mL
Agar	17,0 g

pH 7,3 ± 0,2

*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

BD IsoVitalex Anreicherung enthält die folgenden Wachstumsfaktoren (Zusammensetzung* pro Liter destilliertem Wasser):

Vitamin B ₁₂	0,01 g
L-Glutamin	10,0
Adenin	1,0
Guaninhydrochlorid	0,03
p-Aminobenzoesäure	0,013
Nikotinamidadenindinukleotid (NAD)	0,25
Thiaminpyrophosphat	0,1
Eisen (III)-nitrat	0,02
Thiaminhydrochlorid	0,003
Cysteinhydrochlorid	25,9
L-Cystin	1,1
Glucose	100,0

*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD . Nur für den professionellen Gebrauch. ☒

Agarplatten bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung, Rissen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden. Übermäßige Schrumpfung dieses Mediums als Folge von Austrocknung kann zu falschen Empfindlichkeitsergebnissen führen.

Hinweise zur aseptischen Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des Produkts sind der **ALLGEMEINEN GEBRAUCHSANLEITUNG** zu entnehmen.

AUFBEWAHRUNG UND HALTBARKEIT

Nach Erhalt Platten bis unmittelbar vor dem Gebrauch im Dunkeln bei 2 – 8 °C in der Originalverpackung lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Die Platten können bis zum Verfallsdatum (s. Kennzeichnung auf der Verpackung) inokuliert und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden.

Platten aus bereits geöffneten Stapeln mit jeweils 10 Platten können bei Lagerung in einem sauberen Bereich bei 2 – 8 °C bis zu einer Woche verwendet werden.

QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER

Repräsentative Proben mit den nachfolgend aufgeführten Stämmen inokulieren (detaillierte Informationen siehe **ALLGEMEINE GEBRAUCHSANLEITUNG**). Platten bei 35 ± 2 °C in einer mit Kohlendioxid angereicherten aeroben Atmosphäre inkubieren. Platten nach 18 – 24 sowie nach 42 – 48 Stunden Inkubation ablesen.

Stämme	Wachstum
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	Gutes bis sehr gutes Wachstum
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 43069	Mittleres bis sehr gutes Wachstum
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	Gutes bis sehr gutes Wachstum
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Gutes bis sehr gutes Wachstum
Nicht inokuliert	Schokoladenbraun, opak, möglicherweise leicht inhomogen

Siehe **Testverfahren** für Details betreffend der Inokulation und Inkubation von Empfindlichkeitstests.

Teststamm	Empfindlichkeitstest-Blättchen	Zonengröße* (mm)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226	Penicillin P-10	33 - 40
	Spectinomycin SPT-100	25 - 31

*Die Zonengrößen basieren auf den Ergebnissen von mindestens 3 verschiedenen Chargen von **BD Mueller Hinton Chocolate Agar**.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BD Mueller Hinton Chocolate Agar (90 mm **Stacker-Platten**). Mikrobiologisch kontrolliert.

Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

Probenarten

BD Mueller Hinton Chocolate Agar kann grundsätzlich für alle Arten von Proben von Infektionen mit Verdacht auf anspruchsvolle Organismen verwendet werden, besonders, aber nicht ausschließlich, für Proben aus primär sterilen Körperbereichen (z.B. Hirnflüssigkeit, Abszesse) und als Subkulturmedium von Blutkulturen. Sein Hauptanwendungsbereich ist die nicht selektive Isolierung von *Neisseria*, *Haemophilus* und anderen Bakterien, welche möglicherweise auf routinemäßig verwendeten Blutagarmedien, wie z.B. Columbia-Agar mit 5 % Schafblut, nicht wachsen (siehe auch **LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN**).

Bei der Verwendung dieses Mediums für die routinemäßige Empfindlichkeitsprüfung von *Neisseria gonorrhoeae* mit Penicillin G und Spectinomycin sind Reinkulturen erforderlich. Für direkte Empfindlichkeitsprüfungen nicht mit der Probe inokulieren.

Probenentnahme und Transport

Neisseria gonorrhoeae, *N. meningitidis*, *Haemophilus* und andere anspruchsvolle Organismen sind anfällig für ungünstige Umgebungsbedingungen. Deshalb müssen für alle Proben geeignete Transportmedien verwendet werden. Die Proben müssen so schnell wie möglich ins Labor geschickt werden und dürfen nicht älter als 24 Stunden sein, selbst wenn Transportmedien verwendet werden. Die optimale Transporttemperatur beträgt 20 – 25 °C. Nicht kühlen!^{9,10}

Testverfahren

Für die Isolierung von anspruchsvollen Organismen muss die Probe möglichst bald nach Eingang im Labor ausgestrichen werden. Diese Platte wird hauptsächlich zur Isolierung von Reinkulturen aus Proben mit einer gemischten Flora verwendet.

Falls das Material direkt von einem Tupfer kultiviert wird, Tupfer über einen kleinen Bereich am Rand der Oberfläche rollen; anschließend aus diesem inokulierten Bereich ausstreichen.

Wenn die Probe aus einem Körperbereich mit normaler Flora entnommen wurde, sollte sie, je nach dem zu isolierenden pathogenen Agens, auch auf ein passendes selektives Medium inokuliert werden. Für *Neisseria gonorrhoeae* sollte eine **BD Martin-Lewis Agar, modified-** (modifizierter Martin-Lewis-Agar) oder **BD GC-Lect Agar-Platte** und für *Haemophilus* eine **BD Chocolate Agar mit IsoVitaleX und Bacitracin-Platte** miteinbezogen werden.

Platten bei 35 ± 2 °C in einer mit Kohlendioxid angereicherten aeroben Atmosphäre inkubieren. Platten nach 18 – 24 sowie nach 42 – 48 Stunden Inkubation ablesen.

Für routinemäßige Empfindlichkeitsprüfungen von *N. gonorrhoeae* wird das Isolat, welches eine Reinkultur sein muss, in **BD Trypticase Soy Broth** (Trypticase-Soja-Bouillon) suspendiert, um der Trübung des McFarland 0,5-Standards zu entsprechen. Innerhalb von 15 Min nach Anpassung der Trübung einen sterilen Wattetupfer in das korrekt verdünnte Inokulum tauchen und gegen die obere Innenwand des Röhrchens mehrmals fest hin und her drehen, um überschüssige Flüssigkeit auszudrücken.

Die gesamte Agaroberfläche der Platte dreimal inokulieren und dabei zwischen den einzelnen Ausstrichen die Platte jeweils um 60° drehen, um eine gleichmäßige Inokulierung zu erreichen. Die Blättchen mit Hilfe eines entsprechenden Dispensiergeräts unter Beachtung aseptischer Vorsichtsmaßnahmen auflegen. Dabei die Blättchen so absetzen, dass deren Zentren mindestens 24 mm auseinander liegen. Penicillin-Blättchen sollten nicht näher als 10 mm zum Rand der Petrischale platziert werden. Die Blättchen nach dem Auflegen auf den Agar mit einer sterilen Kanüle oder Pinzette andrücken, um einen guten Kontakt mit der Medienoberfläche sicherzustellen. Dieser Schritt ist nicht notwendig, wenn die Blättchen mit dem **BD Sensi-Disc** 6-, 8- oder 12-Platz selbstandrückenden Dispensiergerät platziert wurden.

Innerhalb 15 Minuten nach dem Aufbringen der Blättchen Platten umdrehen und 24 Stunden bei 35 – 37 °C in mit 5 % Kohlendioxid angereicherter Atmosphäre aerob inkubieren.

Ergebnisse

BD Mueller Hinton Chocolate Agar weist typischerweise die folgende Koloniemorphologie auf:

<i>Haemophilus influenzae</i>	Klein, feucht, perlmuttglänzend mit einem charakteristischen „Mausgeruch“
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Klein, gräulich-weiß bis farblos, mukoid
<i>Neisseria meningitidis</i>	Mittelgroß bis groß, blaugrau, mukoid
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Klein, flach oder größere, mukoide grünliche Kolonien, Medium um die Kolonien kann grünlich sein

Empfindlichkeitsprüfungen: Die Zonen müssen von oben gelesen werden. Die Penicillin-Empfindlichkeit sollte mit einem Beta-Lactamase-Test, z.B. **BD Cefinase-Test**, bestätigt werden.

LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

BD Mueller Hinton Chocolate Agar ist ein angereichertes, nicht selektives Medium, auf welchem anspruchsvolle und nicht anspruchsvolle Bakterien wachsen, einschließlich der normalen Flora. Es wird deshalb empfohlen, die Proben auch auf ein geeignetes selektives Medium zu inokulieren.

Der Begriff „anspruchsvolle Bakterien“ bezieht sich auf Bakterien die nicht oder nicht gut auf den üblicherweise verwendeten Erstisolierungs-Medien mit Schafblut wachsen, z.B. *Haemophilus*, pathogene *Neisseria* und einigen andere Organismen. Für detailliertere Beschreibungen der auf dieses Medium zu inokulierenden Probenarten und der Arten von Organismen, welche mit diesem Medium isoliert werden können, sollten die Literaturhinweise hinzugezogen werden.^{10,11} Dieses Medium wurde nicht zur Unterstützung des Wachstums von nährstoffabweichenden Streptokokken getestet.

Es gibt eine hohe Anzahl und zahlreiche Arten bakterieller Spezies, die Infektionskrankheiten hervorrufen. Bevor das Medium routinemäßig für selten isolierte oder neu beschriebene Organismen verwendet wird, muss seine Eignung daher zunächst durch den Anwender anhand der Kultivierung von Reinkulturen des betreffenden Organismus getestet werden.

Die Zonengrößen der auf diesem Medium durchgeführten Empfindlichkeitsprüfungen stimmen nicht vollständig mit den im CLSI-Standard M2 beschriebenen überein, welche auf GC Schokoladenagar mit einem definierten Wachstumszusatz registriert wurden.

LITERATUR

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. Schoenknecht, 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
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.). 5th 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.

VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

BD Mueller Hinton Chocolate Agar

Best.-Nr. 254035 Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten
Best.-Nr. 254082 Gebrauchsfertige Plattenmedien, 120 Platten

WEITERE INFORMATIONEN

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.



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 the property of Becton, Dickinson and Company. © 2011 BD