

**Egalement nommé**

GELOSE M-H

**Principe**

Milieu recommandé, utilisé pour effectuer des tests de sensibilité aux antibiotiques et aux sulfamides avec des micro-organismes pathogènes provenant d'échantillons cliniques, selon la méthodologie Kirby-Bauer et Ericsson.

**Formule \* en g/L**

Peptone.....	17,5
Beef infusion solids.....	2,0
Amidon.....	1,5
Agar.....	17,0

pH final 7.3 ±0,1 à 25 °C

\*Ajuster et/ou compléter au besoin pour répondre aux critères de performance

**Préparation**

Ajouter 38 g de poudre à 1 L d'eau distillée et laisser tremper. Porter à ébullition pour dissoudre complètement le milieu. Stériliser à l'autoclave à 121 ° C pendant 15 minutes. Remarque: Si le milieu doit être utilisé avec du sang ajouté, il est conseillé d'ajouter 5 g / L de chlorure de sodium pour éviter une hémolyse spontanée.

**Description**

La gélose Mueller-Hinton a été conçue à l'origine pour l'isolement primaire des méningocoques et des gonocoques. Avec l'ajout de sang, il devient un milieu optimal pour la croissance de Neisseria. Il est également plus efficace s'il est réchauffé et transformé en gélose au chocolat. Il ne doit pas être refondu ou réchauffé une fois que du sang y a été ajouté. Pour la culture de Neisseria, les meilleurs résultats sont obtenus si l'incubation est réalisée dans une chambre humide avec une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (5 à 8% de CO<sub>2</sub>).

## Utilisation

L'agar Mueller-Hinton s'est avéré être l'un des milieux les plus efficaces pour une utilisation dans les tests de sensibilité antibactérienne. Sans l'ajout de sang, il peut être utilisé pour les tests de sensibilité aux sulfamides car il est exempt de la plupart de ses antagonistes (nucléotides, etc.). Si ce type de test est effectué, les zones d'inhibition doivent être examinées après 12 à 18 heures, avant que la prolifération ne se produise, car après 24 heures, elle peut interférer avec le test de sensibilité aux sulfamides. L'utilisation d'un petit inoculum aidera à la formation précoce. L'inoculum doit être 100 à 300 fois plus petit que celui utilisé dans le test d'autres antibiotiques.

En 1970, l'OMS a proposé ce milieu pour les tests de sensibilité antibactérienne, et il a été largement utilisé depuis lors. Les tests de sensibilité peuvent être effectués par une variété de techniques, à la fois sur des milieux solides et liquides. La méthode la plus couramment utilisée dans le travail de routine est celle dérivée de Kirby-Bauer et recommandée par l'American Association of Clinical Pathologists.

La méthode Kirby-Bauer est un système de test précis et semi-quantitatif. Il utilise de la gélose Mueller-Hinton et des disques à forte concentration d'antibiotique. L'inoculum est d'abord standardisé à l'aide d'un standard MacFarland, puis la plaque est inoculée avec un écouvillon trempé dans la suspension standardisée, et enfin les disques sont disposés correctement à égale distance les uns des autres sur la plaque puis incubés (voir le tableau).

Certains auteurs suggèrent que l'inoculum soit modifié en introduisant une double couche de milieu inoculé. Ce système fournit sans aucun doute des zones de compensation d'inhibition plus nettes et plus définies. Les plaques sont incubées à 37 ° C pendant une nuit, puis les zones d'inhibition sont mesurées. Les résultats sont rapportés en termes de souches résistantes, moyennement résistantes (intermédiaires) et sensibles (voir tableau).

La technique Ericsson, qui a été adoptée dans la plupart des pays européens, utilise un milieu de culture standardisé (Mueller-Hinton), une quantité standardisée par plaque (25 mL sur plaques de 9 cm de diamètre) et une concentration d'inoculum standardisée.

La suspension de culture fraîche utilisée est incubée pendant 18 heures en milieu liquide puis est diluée en conséquence. Afin d'assurer la quantité appropriée de croissance sur la gélose.

Dilutions suggérées:

- Entérobactéries - Pseudomonas: dilution au 1/300.
- Staphylococcus - Enterococcus: dilution au 1/300.
- Streptococcus - Haemophilus: dilution au 1/10.

La plaque estensemencée en inondant sa surface. L'excès d'inoculum est retiré avec une pipette stérile et les disques antibiotiques sont disposés correctement sur la plaque. Une période de pré-diffusion de 30 à 60 minutes est autorisée avant l'incubation afin que l'antibiotique puisse diffuser lentement avant la croissance. Après incubation à 37 ° C pendant 12 à 18 heures, les zones d'inhibition sont mesurées et les courbes de régression du test référencées. Les résultats sont rapportés en termes de sensibilité ou de résistance ou sous forme de valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI). La technique Ericsson offre sans aucun doute plus de précision et de fiabilité que le Kirby-Bauer. Néanmoins, la méthode Kirby, qui est semi-quantitative, est beaucoup plus simple et plus facile à réaliser dans la pratique quotidienne. La technique Ericsson est fortement recommandée lorsqu'une efficacité et une précision élevées sont requises.

L'agar Mueller-Hinton satisfait aux exigences des tests de sensibilité microbienne et les caractéristiques de base sont vérifiées dans chaque lot. Néanmoins, une certaine variation des résultats peut parfois se produire. Veuillez noter les facteurs suivants qui peuvent être une source de variabilité:

1. Étant donné que les besoins nutritionnels des organismes varient, certaines souches peuvent être rencontrées qui ne poussent pas ou se développent mal sur le milieu.

2. Des facteurs tels que: la taille de l'inoculum, le taux de croissance, la formulation et le pH du milieu, la durée d'incubation et de l'environnement d'incubation, le contenu du disque et la vitesse de diffusion du médicament, et la mesure des paramètres peuvent tous affecter les résultats.

Par conséquent, le strict respect du protocole est nécessaire pour garantir des résultats fiables.

3. Les tests de sensibilité à la diffusion sur disque sont limités aux organismes à croissance rapide. L'inactivation du médicament peut résulter des temps d'incubation prolongés requis par les organismes à croissance lente.

4. Les milieux contenant des quantités excessives de thymidine ou de thymine peuvent inverser les effets inhibiteurs des sulfamides et du triméthoprime, ce qui rend les zones d'inhibition de la croissance plus petites ou moins distinctes.

5. La variation de la concentration des cations divalents, principalement le calcium et le magnésium, affecte les résultats des tests d'amino-glycoside, de tétracycline et de colistine avec des isolats de *Pseudomonas aeruginosa*. Une teneur en cations trop élevée réduit la taille des zones, tandis qu'une teneur en cations trop faible a l'effet inverse.

6. Lorsque le milieu Mueller-Hinton est complété avec du sang, la zone d'inhibition de l'oxacilline et de la méticilline peut être de 2 à 3 mm plus petite que celles obtenues avec de la gélose non complétée. À l'inverse, le sang de mouton peut augmenter considérablement les diamètres de zone de certaines céphalosporines lorsqu'elles sont testées contre les entérocoques.

Le sang de mouton peut provoquer des zones indistinctes ou un film de croissance dans les zones d'inhibition autour des disques de sulfamide et de triméthoprime.

7. Mueller-Hinton Medium d'une profondeur supérieure à 4 mm peut entraîner des résultats de fausse résistance, et une gélose de moins de 4 mm de profondeur peut être associée à des résultats de fausse sensibilité.

8. Une valeur de pH en dehors de la plage de  $7,3 \pm 0,1$  peut avoir un effet néfaste sur les résultats des tests de sensibilité. Si le pH est trop bas, les amino-glycosides et les macrolides semblent perdre de leur puissance; d'autres peuvent sembler avoir une activité excessive.

Les effets opposés sont possibles si le pH est trop élevé.

9. Lorsque le Milieu Mueller-Hinton est inoculé, aucune gouttelette d'humidité ne doit être visible sur la surface ou sur le couvercle de la boîte de Pétri.

10. Le milieu Mueller-Hinton doit être inoculé dans les 15 minutes suivant l'ajustement de la suspension d'inoculum.

11. Les diamètres de zone d'inhibition de certains médicaments, tels que les macrolides, les amino-glycosides et les tétracyclines, sont considérablement modifiés par le CO<sub>2</sub>. Les plaques ne doivent pas être incubées dans une atmosphère augmentée de CO<sub>2</sub>.

Pour plus d'informations sur les performances du test de sensibilité aux antibiotiques sur disque, se reporter à la monographie M2-A9 CLSI (anciennement NCCLS), EUCAST et autres.

### Contrôle qualité

**Température d'incubation:** 35 °C ±1.0

**Temps d'incubation:** 18 ± 2h

**Inoculum:** Inoculer toute la surface de la gélose et ajouter des disques antibiotiques conformément aux directives EUCAST.

Micro-organismes	Croissance	Remarques
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	Bonne	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Bonne	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	Bonne	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	Bonne	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	Bonne	Avec 5% Sang + NAD (20 mg)

### Références

- BAUER, A.L., W.M.M. KIRBY, J.C. SHERRIS & M. TURCK (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *A. J. Clin. Pathol* 45:493.
- BARRY, A.L., M.D. COYLE, C. THORNBERRY, E.H. GARLACH & R.W. HAWKINSON (1979) Methods of measuring zones of inhibition with Bauer-Kirby disk-susceptibility test. *J. Clin. Microbiol.* 10:885-889.
- CFR (1972) Rules and Regulations. 37:20525. Washington. DC. USA.
- CLSI (2006) Document M6-A2. Protocols for evaluating dehydrated Mueller-Hinton Agar: Approved Standard. 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania. USA.
- CLSI (2006) Document M2-A9. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved Standard. 9th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania. USA.
- ERICSSON & SHERRIS (1971) *Acta Pathol. Microbiol. Scand Suppl* 217 p:90.
- EUCAST.(2013). European Society of Clinical Microbiology and infectious Diseases. "Routine internal quality control as recommended by EUCAST" . Version 3,1.
- HINDLER, J. (1998) Antimicrobial Susceptibility Testing in Essential Procedures for Clinical Microbiology. ASM Press Washington. DC. USA.
- MUNRO, S. (1995) Disk diffusion Susceptibility Testing, in *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, H.D. Isenberg (ed) APHA Washington. DC. USA.
- MILLER, J.M, C. THORNBERRY & C.N. BAKER (1984) Disk Diffusion susceptibility test troubleshooting guide. *Lab. Med.* 15:183-185.
- NEUMAN, M.A., D.F. SAMM, C. THORNSBERRY & I.E. MCGOWAN (1991) New developments in antimicrobial agent susceptibility testing: A practical guide. ASM. Washington. DC. USA.
- THORNSBERRY, C., W.G. GAVAN, E.H. GERLACH & J.C. SHERRIS (1977) *Cumitech* 6. ASM. Washington.
- WHO (1977) Requirements for antibiotic susceptibility tests. Technical Report Series No. 610. Geneva.
- WOODS, G.L. & J.A. WASHINGTON (1995) Antibacterial Susceptibility Tests: dilution and disk diffusion methods. In Murray, Baron, Pfaller, Tenover & Tenover eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. ASM. Washington. DC. USA.

### Conservation

Pour usage professionnel uniquement. À conserver fermé, loin de la lumière, dans un endroit frais et sec (+4°C à 30°C).