
GELOSE DE MUELLER-HINTON

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose de Mueller Hinton est reconnue par tous les experts comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques et aux sulfamides. Elle constitue un excellent milieu de base pour la fabrication de géloses au sang.

La formule-type répond à la composition définie dans les normes NF U47-106 et NF U47-107.

2 HISTORIQUE

Dans leurs travaux de mise au point d'un milieu transparent capable de résister à l'autoclavage, Mueller et Hinton ont sélectionné le milieu complexe de Gordon et Hine pour essayer d'en déterminer les composants essentiels. Les auteurs ont trouvé que l'amidon pouvait remplacer l'extrait de pois comme élément nutritif et aussi comme agent protecteur agissant contre les substances toxiques présentes dans le milieu. Par la suite, ils trouvèrent que la peptone pancréatique de viande pouvait être remplacée par de l'hydrolysate acide de caséine, favorisant ainsi la croissance des gonocoques et des méningocoques. En 1966, Bauer, Kirby, Shervis et Turck recommandèrent le milieu de Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques par la méthode des disques.

3 PRINCIPES

Le choix des ingrédients est déterminé de façon à obtenir une très faible quantité de thymine et de thymidine (substances connues pour inhiber l'activité antibactérienne du triméthoprim), ainsi qu'une très faible quantité d'acide paraaminobenzoïque (PABA) et de ses analogues de structure qui sont des antagonistes de l'activité des sulfonamides.

En raison de l'influence du calcium et du magnésium sur la sensibilité des souches de *Pseudomonas* aux aminoglycosides, il a été recommandé par Reller *et al.* que les concentrations ioniques soient comprises entre 50 et 100 mg/litre de calcium et entre 20 et 35 mg/litre de magnésium.

La méthode de Kirby-Bauer est basée sur la diffusion de substances antibiotiques imprégnées sur des disques en papier préalablement séchés qui doivent être déposés à la surface de la gélose. Les disques appliqués sur l'agar absorbent une quantité d'eau suffisante pour dissoudre l'antibiotique qui diffuse ainsi progressivement dans le milieu, suivant les lois physiques de diffusion des molécules à travers un gel. Il se forme ainsi un gradient de concentration de l'antibiotique autour de chaque disque. Tandis que le mécanisme de diffusion se produit, la multiplication des germes ensemencés à la surface de l'agar intervient. Au moment où se manifeste la phase logarithmique de croissance, les bactéries se multiplient plus rapidement que la diffusion de l'antibiotique ne peut progresser et les cellules bactériennes non inhibées continuent à se multiplier jusqu'à ce que la culture puisse être visualisée.

Aucune croissance n'apparaît lorsque l'antibiotique est présent aux concentrations inhibitrices; il est alors possible de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition qui est indirectement proportionnel aux concentrations minimales inhibitrices effectuées par la méthode en dilutions. Des tables permettent d'interpréter les résultats obtenus pour déterminer si les germes sont sensibles ou résistants à l'antibiotique mis en œuvre.

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu :

- Hydrolysate acide de caséine 17,5 g
- Extrait de viande 2,0 g
- Amidon soluble..... 1,5 g
- Agar agar bactériologique 17,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,3 ± 0,2.

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 38,0 g de milieu déshydraté (BK048) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 115 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47 °C.
- Couler en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.
- L'épaisseur de la gélose doit être impérativement de 4 mm.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert de façon à éviter la formation de gouttelettes d'eau à la surface de la gélose, phénomène pouvant altérer les qualités de diffusabilité du milieu.

✓ **Reconstitution :**
38,0 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 115 °C

Note

En raison de l'ajustement précis des taux de calcium et de magnésium dans le milieu, l'eau de reconstitution doit être de très bonne qualité.

6 MODE D'EMPLOI

Test de sensibilité aux antibiotiques (méthode standard de Kirby et Bauer) :

- Utiliser une culture pure de la souche sur bouillon caséine-soja, présentant l'opacité standard d'une suspension de sulfate de baryum (densité 0,5 de l'échelle de MacFarland).
- Plonger un écouvillon dans la culture.
- Ensemencer la gélose. L'écouvillon doit passer 2 à 3 fois sur toute la surface de manière à obtenir un ensemencement homogène.
- Laisser sécher les boîtes 10 minutes avant de déposer les disques.
- Poser les disques en appuyant légèrement pour qu'ils adhèrent bien à la gélose. Les disposer à 15 mm minimum de la périphérie de la boîte de manière à ce que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas.
- Incuber à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

✓ **Ensemencement :**
En surface

✓ **Incubation :**
18 à 24 h à 37 °C

Notes :

La méthode de Kirby et Bauer est reconnue pour donner les résultats les plus fiables et les plus reproductibles. D'autres méthodes peuvent toutefois être utilisées à condition que l'inoculum et l'ensemencement soient préalablement étudiés et standardisés.

Pour d'autres utilisations, se reporter au référentiel en vigueur.

7 LECTURE

Mesurer la zone d'inhibition.

Se rapporter aux tableaux d'interprétation des zones d'inhibition fournis par les fabricants de disques d'antibiotiques pour établir les corrélations entre la zone d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (C.M.I.).

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre blanchâtre, fluide et homogène.

Milieu préparé : gélose ambrée.

Réponse culturelle après 24 heures d'incubation à 37 °C :

Microorganismes		Croissance
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Bonne
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	Bonne
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	Bonne
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Bonne

9 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C.

La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

Milieu préparé en tubes ou en flacons (*) : 180 jours à 2-8 °C.

Milieu préparé en boîtes (*) : 30 jours à 2-8 °C.

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

10 PRESENTATION

Milieu déshydraté :

Flacon de 500 g BK048HA

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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.

NF U47-106. Décembre 2004. Méthodes d'analyse en santé animale. Détermination *in vitro* de la sensibilité des bactéries aux anti-infectieux par la méthode de dilution en milieu gélosé.

NF EN ISO 10272-1. Avril 2006. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des *Campylobacter* spp..Partie 1 : Méthode de recherche.

XP CEN ISO/TS 10272-3. Juin 2010. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp. Partie 3 : Méthode semi-quantitative.

NF U47-107. Décembre 2012. Méthodes d'analyse en santé animale. Guide de réalisation des antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

12 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : GELOSE MUELLER HINTON_FR_V7.

Date création : 01-2003

Date de révision : 03-2016

Motif de révision : Révision générale.

Gélose de Mueller-Hinton

Test de sensibilité aux antibiotiques

Lecture :

Croissance obtenue après 24 heures d'incubation à 37 °C.

