

GÉLOSE MUELLER HINTON II + 5% DE SANG DE MOUTON

NOTICE D'UTILISATION POUR LES MILIEUX PRECOULES PRÊTS A L'EMPLOI

1. Utilisation prévue

La gélose Mueller Hinton II + 5% de sang de mouton est un milieu conçu pour tester la sensibilité aux médicaments des bactéries fastidieuses par la méthode de diffusion en disque (méthode Bauer-Kirby), selon les normes du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) à partir de colonies bactériennes isolées provenant d'échantillons cliniques humains.

La fonction du milieu est d'étayer le diagnostic en déterminant le profil de sensibilité/résistance aux antimicrobiens des bactéries fastidieuses isolées à partir d'échantillons cliniques.

L'antibiogramme utilisé dans le traitement des infections et la détermination du mécanisme de résistance de l'agent pathogène détecté dans un échantillon clinique permettent de prendre la bonne décision, individuelle, pour le patient en ce qui concerne le choix d'une antibiothérapie appropriée et efficace.

La méthode de diffusion sur disque selon CLSI est basée sur la méthode décrite par l'International Collaborative Study of Antimicrobial Sensibility Testing en 1972 (Etude collaborative internationale des tests de sensibilité aux antimicrobiens). En raison de sa simplicité d'exécution, cette méthode est la méthode la plus largement utilisée pour tester la sensibilité bactérienne aux médicaments dans les laboratoires médicaux. L'exécution correcte et normalisée du test selon la méthode CLSI et l'obtention de résultats fiables nécessitent l'utilisation de cette méthode sans modification, y compris l'utilisation du milieu spécifié par CLSI.

Selon les procédures CLSI, la gélose Mueller Hinton II + 5% de sang de mouton est un moyen de déterminer le profil de sensibilité aux médicaments des bactéries fastidieuses, en particulier du genre *Streptococcus*. La gélose Mueller Hinton II + 5% de sang de mouton est recommandée pour tester la résistance aux antibiotiques de *Streptococcus pneumoniae* suivants : chloramphénicol, érythromycine, ofloxacine, tétracycline et vancomycine, en plus du dépistage de la sensibilité à la pénicilline.

Référence produit :	Type de milieu :	Emballage:
1172PD90/201172	Boîte de gélose précoulée	2 x 10 pièces (90 mm)

2. Principe de procédure

L'extrait de viande bovine est une source d'azote, de vitamines, de carbone et d'acides aminés. L'amidon absorbe les produits métaboliques toxiques. Le sang de mouton défibriné permet la croissance de bactéries fastidieuses. La gélose fournit un agent solidifiant.

Les tests de sensibilité microbienne aux médicaments doivent être effectués par la méthode du disque de diffusion conformément aux recommandations actuelles du CLSI.

La méthode du disque de diffusion est une méthode qui utilise le phénomène dans lequel un gradient de concentration d'un médicament antimicrobien se forme dans un milieu solide à la suite de sa diffusion à partir d'un disque de papier buvard. En conséquence, la croissance des micro-organismes inoculés sur le milieu est inhibée autour du disque. Le diamètre mesuré de la zone de croissance inhibée, exprimé en millimètres, est comparé à la valeur limite correspondante spécifiée dans les recommandations CLSI pertinentes. À la suite de cette comparaison, le microorganisme testé est classé dans la catégorie de sensibilité appropriée aux médicaments antimicrobiens spécifiques utilisés dans le test. Afin de déterminer le mécanisme de résistance, des disques contenant des antibiotiques / médicaments antimicrobiens spécifiques sont disposés sur le milieu. La taille et la forme caractéristiques des zones d'inhibition de la croissance bactérienne sur le milieu permettent de déterminer la présence et le type de mécanisme de résistance du pathogène testé.

3. Composition moyenne

En g/l d'eau distillée:		Suppléments/litre de milieu:	
Peptone de caséine	17,5 g	Sang de mouton	50 mL
Amidon de maïs	1,5 g		
Extrait de bœuf	2,0 g		
Agar	17,0 g		

pH 7,3± 0,1 à 25° C.

Aspect du milieu : Homogène, rouge.

4. Préparation du milieu

Le milieu est prêt à l'emploi. Porter le milieu à température ambiante immédiatement avant utilisation.

5. Équipement requis, non fourni

Équipement et réactifs nécessaires au test (Par exemple : solution saline, écouvillons stériles, disques de buvard imbibés d'antibiotiques) et équipement de laboratoire général, y compris un densitomètre ou un étalon de densité, un incubateur et une règle ou un autre système pour mesurer la taille des zones d'inhibition.

6. Précautions

- Le produit est destiné à un usage professionnel uniquement.
- Produit non automatisé.
- Le milieu contient des composants d'origine animale, qui peuvent être associés à la présence d'agents pathogènes biologiques, et doit être manipulé conformément aux règles de travail avec des matières biologiques potentiellement infectieuses.
- Ne pas utiliser le milieu si celui-ci présente des signes de contamination microbienne, de décoloration, de dessèchement, de fissuration ou d'autres signes de détérioration.
- Ne pas utiliser les boîtes endommagées.
- Ne pas utiliser les boîtes après la date d'expiration.
- La ré incubation de plaques préalablement inoculées n'est pas autorisée.
- Pour garantir des résultats de test corrects, suivre ces instructions et la procédure CLSI.
- Si la manipulation du milieu diffère de celle décrite dans le présent manuel, le laboratoire est tenu de valider la procédure adoptée.

7. Stockage et durée de conservation

Conserver les boîtes entre 2 et 12 °C jusqu'à la date de péremption. Entreposer les boîtes dans leur emballage d'origine en position inversée (côté gélose vers le haut), à l'abri des sources de lumière directe. Pour éviter la congélation de la gélose, ne pas ranger les boîtes près des murs du réfrigérateur. Pour éviter l'apparition de condensation d'eau sur le couvercle de la boîte, ne pas ouvrir le réfrigérateur plus souvent que nécessaire et ne pas stocker les substrats dans un réfrigérateur trop rempli.

8. Péremption

Le milieu stocké à 2-12°C conserve ses propriétés jusqu'à 45 jours à compter de la date de production.

9. Type d'échantillons

Utiliser des cultures pures et fraîches (Datées d'environ 16 à 24 heures) de souches pathogènes de bactéries fastidieuses isolées à partir d'échantillons cliniques humains ou d'autres échantillons inoculés sur des milieux solides.

10. Procédure de test

Afin de garantir des résultats corrects et fiables de l'antibiogramme bactérien par la méthode de diffusion sur disque, les procédures et les lignes directrices actuelles du CLSI doivent être strictement suivies.

1. Le milieu doit revenir à température ambiante avant utilisation.

2. Préparation de l'inoculum.

Préparer une suspension de la souche à tester à une densité de 0,5 sur l'échelle de McFarland en suspendant colonies de la souche en solution saline.

Prélever les colonies avec d'une anse stérile ou un écouvillon dans un milieu non sélectif, après 18 à 24 heures de culture. Sélectionner quelques colonies morphologiquement similaires. Déterminer la densité de l'inoculum à l'aide d'un densitomètre. La densité de la suspension peut également être déterminée en comparant macroscopiquement la densité de la suspension de la souche testée avec une norme de densité McFarland de 0,5. Dans ce cas, la turbidité de la suspension de la souche testée par rapport à la norme de densité doit être comparée sur un fond blanc avec des bandes noires.

La suspension préparée de la souche à tester doit être utilisée dans les 15 minutes, mais au plus tard 60 minutes après la préparation.

3. **Préparation de la pelouse bactérienne.** Tremper un coton-tige stérile dans la suspension préparée de la souche à tester. Pour les bactéries à Gram négatif, pour éviter une inoculation excessive, retirez l'excès de suspension de l'écouvillon en le pressant contre l'intérieur du tube, fou bactéries à Gram positif, il n'est pas nécessaire de presser l'écouvillon contre l'intérieur du tube. Les boîtes peuvent être inoculées manuellement ou avec un inoculateur automatique. Répartissez la suspension uniformément sur toute la surface de la gélose, en vous assurant qu'il n'y a pas d'espaces entre chaque bande, ce qui est particulièrement important pour les bactéries à Gram positif.

4. **Appliquez des disques antibiotiques.** Appliquer des disques antibiotiques sur la surface de la gélose. Les disques doivent être appliqués sur le milieu dans les 15 minutes suivant l'inoculation. Appuyer légèrement sur les disques, car ils doivent adhérer complètement à la surface de la gélose. Une fois appliqués, les disques ne doivent pas être déplacés en raison de la diffusion rapide de l'antibiotique du disque dans le milieu. Le nombre de disques sur la boîte doit être limité afin que les zones d'inhibition résultantes ne se chevauchent pas et que les antibiotiques individuels n'interagissent pas les uns avec les autres. Un maximum de 6 disques antibiotiques peut être appliqué sur une boîte de 90 mm de diamètre.

5. **Incubation.** Incuber les boîtes inoculées dans des conditions aérobies à la température et pendant la durée spécifiées dans les procédures CLSI en fonction du micro-organisme testé. Les boîtes doivent être inversées avec le milieu vers le haut, tout en s'assurant que les disques ne sont pas tombés de la surface de la gélose. L'incubation des boîtes doit commencer dans les 15 minutes suivant l'application des disques. Les boîtes ne doivent pas être incubées plus longtemps que recommandé.

Les procédures actuelles du CLSI définissent des lignes directrices détaillées pour la sélection des médicaments antibactériens et la réalisation d'antibiogrammes par la méthode de diffusion sur disque.

11. Lecture et interprétation

Après la période d'incubation requise, mesurer la taille des zones d'inhibition à l'aide d'un instrument calibré tel qu'une règle ou un autre instrument de mesure, ou utiliser des systèmes automatiques pour mesurer les diamètres des zones d'inhibition de la croissance. La mesure doit être exprimée en millimètres.

Interpréter les résultats obtenus lors de la mesure des diamètres des zones d'inhibition de la croissance conformément aux lignes directrices actuelles du CLSI.

Lors de la recherche de mécanismes de résistance chez un agent pathogène, il convient d'évaluer la taille et la forme caractéristique des zones d'inhibition bactérienne pour un type particulier de mécanisme de résistance.

12. Contrôle qualité

Effectuer un contrôle de la qualité du milieu à une fréquence et d'une manière conformes aux lignes directrices actuelles du CLSI pour le contrôle de la qualité de la méthode de diffusion du disque et des procédures de laboratoire.

Des souches de référence qui assurent l'uniformité des mesures conformément aux lignes directrices du CLSI doivent être utilisées pour effectuer les tests de contrôle de la qualité.

13. Limites de la méthode

- En raison de la variabilité des besoins nutritionnels, certaines souches peuvent mal se développer ou pas du tout sur la gélose Mueller Hinton II +5% de sang de mouton.
- De nombreux facteurs peuvent affecter les diamètres des zones d'inhibition et les résultats de l'étude.
- De nombreux facteurs peuvent affecter le diamètre des zones d'inhibition et les résultats des tests de sensibilité aux médicaments, tels que la densité de suspension bactérienne, le taux de croissance, la composition du milieu et le pH.

- L'antibiogramme par la méthode de diffusion sur disque ne doit être effectué qu'avec des cultures bactériennes fraîches et pures.
- Si la densité d'inoculum est trop élevée, elle peut réduire la zone de retard de croissance, et si elle est trop faible, elle peut augmenter les zones de retard de croissance et causer des difficultés à les mesurer.
- Laisser les boîtes inoculées à température ambiante pendant plus longtemps que la période recommandée avant d'appliquer les disques peut provoquer une prolifération microbienne, entraînant une diminution du diamètre des zones d'inhibition. Par conséquent, il est important de suivre la règle 15-15-15: la suspension doit être utilisée dans les 15 minutes suivant la préparation, les disques doivent être appliqués dans les 15 minutes suivant l'inoculation de la boîte et l'incubation de la boîte doit commencer dans les 15 minutes suivant l'application du disque.
- Un stockage inadéquat des disques d'antibiotiques peut affecter la stabilité des antibiotiques qu'ils contiennent, ce qui peut réduire le diamètre des zones d'inhibition et peut être une source d'erreurs d'interprétation dans l'évaluation de la sensibilité aux médicaments de l'agent pathogène à l'étude.
- Un facteur important affectant le résultat du test est la façon dont les empilements de boîtes sont disposés dans l'incubateur en raison d'un chauffage inégal. Un nombre maximum de boîtes dans une pile de 5 est recommandé.
- Un retrait excessif du milieu en raison d'un stockage inapproprié peut conduire à de faux résultats indiquant la présence de sensibilité.
- Une mauvaise disposition des disques antibiotiques pour tester la présence de mécanismes de résistance peut entraîner des résultats de test incorrects.

14. Caractéristiques de la méthode

Présenté dans les documents CLSI et la littérature disponible.

15. Élimination des matériaux usagés

Les matières usées et non utilisées doivent être éliminées conformément à la réglementation en vigueur sur la manipulation des déchets médicaux et aux procédures de laboratoire pour l'élimination des matières infectieuses et potentiellement infectieuses.

16. Déclaration des événements indésirables

Selon la réglementation en vigueur, les événements et incidents indésirables qui peuvent être directement liés au milieu décrit doivent être signalés au fabricant et aux autorités compétentes.

17. Références

1. Mueller and Hinton. 1941 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 48:330.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006 Approved Standard: M7-A7. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 7th ed. CLSI, Wayne,
3. Murray, Baron, Jorgensen, Landry and Pfaller (eds.). 2007. manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C..
4. Forbes, Sahm and Weissfeld. 2007. bailey & Scott's diagnostic microbiology, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis, Mo.
5. Isenberg and Garcia (eds.). 2004 (update, 2007). Clinical microbiology procedures handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C..
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006 Approved standard: M2-A9. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 9th ed. CLSI, Wayne, Pa.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement, M100-S18(M2). CLSI, Wayne, Pa.
8. Thornsberry, Gavan and Gerlach. 1977. Cumitech 6, New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Coord. ed., Sherris. American Society for Microbiology, Washington, DC.
9. World Health Organization. 1961. standardization of methods for conducting microbic sensitivity tests. Technical Report Series No. 210, Geneva, Switzerland.
10. U.S. Food and Drug Administration. 2001. bacteriological analytical manual, online. AOAC International, Gaithersburg, Md.

Historique des modifications apportées aux documents

Date du changement	Section	Description du changement
02/03/2023	Document entier	Adaptation aux exigences du règlement UE 2017/746

NOTE

L'historique des révisions du document n'inclut pas les modifications rédactionnelles.

SYMBOL	NOM DU SYMBOLE	DESCRIPTION	REF.
	Fabricant	Indique le fabricant de l'instrument médical.	5.1.1
	Date de fabrication	Indique la date après laquelle l'instrument médical ne doit plus être utilisé.	5.1.3
	N° de catalogue	Indique le numéro de catalogue du fabricant afin que le dispositif médical puisse être utilisé.	5.1.6
	Code de lot	Indique le code de lot du fabricant afin que le lot ou le lot puisse être identifié.	5.1.5
	Dispositif médical de diagnostic in vitro	Indique un instrument médical destiné à être utilisé comme instrument médical de diagnostic in vitro.	5.5.1
	Ne pas réutiliser	Indique un instrument médical destiné à un usage unique.	5.4.2
	Contient suffisamment de tests <n>	Indique le nombre total de tests pouvant être effectués avec l'instrument médical.	5.5.5
	Date limite d'utilisation	Indique la date après laquelle l'instrument médical ne doit plus être utilisé	5.1.4
	Limite de température	Indique que les limites de température doivent être indiquées à côté des lignes horizontales supérieure et inférieure.	5.3.7
	Symbole de sécurité (Respect des exigences de l'UE)	Le marquage CE sur un produit est une déclaration du fabricant attestant que le produit est conforme aux exigences essentielles des réglementations pertinentes de l'Union européenne en matière de santé, de sécurité et d'environnement.	Nd.
	Consultez le mode d'emploi ou consultez le mode d'emploi électronique	Indique la nécessité pour l'utilisateur de consulter le mode d'emploi.	5.4.3
	Stérilisé à l'aide de techniques de traitement aseptique	Indique un instrument médical qui a été fabriqué à l'aide de techniques aseptiques acceptées.	5.2.2
	Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter le mode d'emploi	Indique qu'un instrument médical qui ne devrait pas être utilisé si l'emballage a été endommagé ou ouvert et que l'utilisateur devrait consulter le mode d'emploi pour obtenir des renseignements sur la dépendance.	5.2.8
	Contient du matériel biologique d'origine animale	Indique un instrument médical qui contient des tissus biologiques, des cellules ou leurs dérivés d'origine animale	5.4.8




Gras Zenon Sobiecki
Cercle 4A; 830 Starogard Gdansk
www.grasbiotech.pl

Département de production
Forêt 1, Owidz
83-211 Jabłowo



