

**MODE D'EMPLOI**

CLED MEDIUM

Milieu de culture déshydraté



Cled Medium :
E. coli fermentant le lactose (colonies jaunes) et *Salmonella* ne fermentant pas le lactose (colonies bleues).

1 - UTILISATION PRÉVUE

Diagnostic *in vitro*. Milieu de culture différentiel pour l'isolement, le dénombrement et l'identification présumée de micro-organismes à partir de l'urine.

2 - COMPOSITION - FORMULE TYPE *
(APRES RECONSTITUTION AVEC 1 L D'EAU)

Tryptone	4.000 g
Pancreatic digest of gelatin	4.000 g
Peptone	3.000 g
Lactose	10.000 g
L-cystine	0.128 g
Bromothymol blue	0.020 g
Agar	15.000 g

*la formule peut être ajustée et/ou complétée pour répondre aux critères de performance requis.

3 - PRINCIPE DE LA METHODE ET EXPLICATION DE LA PROCEDURE

La Cled Medium est basée sur le "milieu déficient en électrolytes" décrit pour la première fois par Sandys¹ pour la bactériologie urinaire afin d'empêcher l'essaimage de *Proteus* spp et modifié ensuite par Mackey et Sandys² en remplaçant le mannitol par 1 % de lactose et 0.2 % de saccharose et en augmentant l'indicateur de pH et les concentrations de gélose. Mackey et Sandys³ ont encore modifié le milieu en incorporant de la L-cystine afin d'améliorer la croissance des coliformes "colonie naine" dépendants de la cystine et en supprimant le saccharose. Ce milieu final Cystine - Lactose - Electrolyte - Déficient (C.L.E.D.) s'est avéré idéal pour l'inoculation par dip-slide et pour la bactériologie urinaire en général, une bonne différenciation coloniale et une reconnaissance facile étant des caractéristiques particulières.³ Il permet la croissance de tous les pathogènes urinaires potentiels. Il favorise également la croissance d'un certain nombre de contaminants essentiels tels que les diphtéroïdes, les lactobacilles et les microcoques, ce qui donne une indication de l'étendue de la contamination, et tout en étant non inhibiteur, il empêche l'essaimage de *Proteus* sp.³

Les peptones animales fournissent du carbone, de l'azote, des vitamines et des oligo-éléments pour la croissance microbienne ; la cystine favorise la croissance des coliformes "colonie naine"³ ; le lactose est présent dans le milieu en tant qu'hydrate de carbone fermentable : les bactéries fermentant le lactose acidifient le milieu, ce qui entraîne un changement de couleur du bleu de bromothymol, qui passe du bleu-vert au jaune.

4 - MODE D'EMPLOI POUR LA PREPARATION DU MILIEU

Suspendre 36.2 g dans 1000 mL d'eau purifiée froide. Porter à ébullition en agitant fréquemment et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Refroidir à 47-50°C, bien mélanger et verser dans des boîtes de Pétri stériles.

5 - CARACTERISTIQUES PHYSIQUES

Aspect du milieu déshydraté	poudre vert-gris, fine, homogène, fluide
Aspect moyen de la solution et des plaques	bleu-vert, limpide
pH final à 20-25 °C	7.3 ± 0.2

5 - MATERIEL FOURNI - EMBALLAGE

Produit	Type	REF	Emballage
CLED MEDIUM	Milieu déshydraté	40129012	500 g (13.8L)
		40129014	5 kg (138L)

7 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Autoclave, bain-marie, boucles et écouvillons stériles, incubateur et matériel de laboratoire nécessaire, boîtes de Petri, fioles d'Erlenmeyer, milieux de culture auxiliaires et réactifs pour l'identification des colonies.

8 - SPECIMENS

Cled Medium est destinée au traitement microbiologique d'échantillons cliniques tels que l'urine. Prélever les échantillons avant la thérapie antimicrobienne si possible. Il convient d'appliquer les bonnes pratiques de laboratoire pour la collecte, le transport et le stockage des échantillons cliniques.^{4,5}

9 - PROCEDURE DE TEST

Laisser les plaques atteindre la température ambiante et sécher la surface du support.
Mélanger doucement l'urine pour éviter la formation de mousse. Plonger l'extrémité d'une boucle calibrée stérile (par exemple 1µL ou 10µL) dans l'urine jusqu'à ce qu'elle soit juste en dessous de la surface et la retirer verticalement, en veillant à ne pas en emporter sur la tige. Utiliser cette urine pour inoculer la plaque de Cled Medium de haut en bas en ligne verticale et de nouveau de haut en bas.





perpendiculairement à cette ligne dans un mouvement de va-et-vient. L'inoculum d'urine est réparti sur toute la surface de la gélose afin de simplifier le comptage des colonies après la croissance.

Incuber à 35-37°C dans l'air pendant 24 à 48 heures.

Bien que la plupart des agents pathogènes des voies urinaires se développent facilement, les agents pathogènes à croissance lente et ceux qui sont inhibés par la présence d'antimicrobiens dans l'échantillon du patient peuvent ne pas apparaître après une incubation d'une nuit (16 h). Effectuer des tests d'estérase leucocytaire et de nitrite pour déterminer quelles cultures doivent être incubées pendant 48 heures. Les cultures d'urine qui sont négatives après une incubation d'une nuit mais dont l'un ou les deux tests enzymatiques sont positifs doivent être incubées pendant un jour supplémentaire ou ré-inoculées sur une plaque de gélose au sang.⁴

10 - LECTURE ET INTERPRÉTATION

Après incubation, observer la croissance bactérienne, compter le nombre de colonies (UFC) sur la plaque et noter les caractéristiques morphologiques, chromatiques, des colonies.

Si une boucle de 1µL est utilisée, une colonie équivaut à 1000 UFC/mL, si une boucle de 10µL est utilisée, une colonie équivaut à 100 UFC/mL.

Des études menées dans les années 1950 restent la base de l'interprétation des résultats des cultures d'urine. Elles montrent qu'une numération bactérienne de $\geq 10^5$ CFU/mL indique une infection et qu'une numération inférieure à cette valeur indique généralement une contamination.⁵

Dans certains groupes de patients, des numérations comprises entre 10^5 CFU/mL et 10^2 CFU/mL peuvent être significatives ; un isolat pur présentant des numérations comprises entre 10^4 et 10^5 CFU/mL doit être évalué sur la base d'informations cliniques ou confirmé par des cultures répétées.⁵ Pour l'urine recueillie par ponction vésicale sus-pubienne, toute UFC détectée indique une infection.⁵

Consulter les références appropriées pour connaître les critères d'interprétation complets de la numération microbienne.^{4,5}

La morphologie coloniale typique sur la gélose CLED est la suivante :⁶ :

<i>Escherichia coli</i>	Colonies jaunes, opaques, au centre d'un jaune légèrement plus foncé
<i>Klebsiella/Enterobacter</i>	Colonies jaunes à bleu blanchâtre, mucoides
<i>Salmonelle</i>	Colonies bleues et plates
<i>Proteus</i>	Colonies bleues, translucides
<i>Pseudomonas</i>	Colonies vertes, avec une surface et une périphérie typiquement rugueuses (mattes)
Entérocoques	Petites colonies jaunes
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonies de couleur jaune foncé, uniformes
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Colonies jaune pâle, plus opaques que <i>S.aureus</i>

11 - CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DE L'UTILISATEUR

Tous les lots fabriqués du produit sont mis en vente après que le contrôle de qualité a été effectué pour vérifier la conformité aux spécifications. Toutefois, l'utilisateur final peut effectuer son propre contrôle de qualité conformément aux réglementations locales applicables, aux exigences d'accréditation et à l'expérience du laboratoire. On trouvera ci-dessous une liste de souches d'essai utiles pour le contrôle de la qualité.⁷

SOUCHES DE CONTRÔLE	INCUBATION T° / T / ATM	EXPECTED RESULTS
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	35-37°C / 18-24H / A	Bonne croissance, colonies jaunes
<i>E.coli</i> ATCC 25922	35-37°C / 18-24H / A	Bonne croissance, colonies jaunes avec halo jaune
<i>P.vulgaris</i> ATCC 8427	35-37°C / 18-24H / A	Bonne croissance, colonies bleuâtres non essaimées

A : incubation aérobie ; ATCC est une marque déposée de l'American Type Culture Collection.

12- CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Avant la mise en vente, un échantillon représentatif de tous les lots de Cled Medium déshydratée est soumis à un test de productivité en comparant les résultats à ceux d'un lot de référence préalablement approuvé et à ceux de la gélose tryptique au soja.

La productivité est testée par un test quantitatif avec la souche cible *E.faecalis* ATCC 19433 ; des plaques CLED Medium sont inoculées avec des dilutions décimales dans une solution saline d'une suspension de colonies et incubées à 35-37°C pendant 18-24 heures. Les colonies sont dénombrées sur les plaques CLED et TSA et le ratio de productivité est calculé ($Pr = CFU_{CLED} / CFU_{TSA}$). Si Pr est ≥ 0.5 et si la morphologie et la couleur des colonies sont typiques (colonies jaunes), les résultats sont considérés comme acceptables et conformes aux spécifications. En outre, les caractéristiques de productivité sont testées par une technique écométrique semi-quantitative avec les souches suivantes : *E.coli* ATCC 25922, *P.vulgaris* ATCC 9484, *P.mirabilis* ATCC 10005, *E.aerogenes* ATCC 13048, *K.pneumoniae* ATCC 27736, *S.aureus* ATCC 25923, *C.albicans* ATCC 18804. Après incubation, les colonies, la couleur du milieu et la quantité de croissance sont évaluées et enregistrées. Toutes les souches présentent une bonne croissance avec des couleurs typiques.

13 - LIMITES DE LA MÉTHODE

- Le milieu est fondamentalement non sélectif mais, en raison de l'exclusion des électrolytes, les *Shigella* spp. ne poussent généralement pas sur le milieu.⁶
- Si l'on soupçonne la présence dans l'échantillon d'agents pathogènes génito-urinaires tels que *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma*, des milieux de culture spécifiques doivent être inoculés.
- Même si les colonies microbiennes sur les plaques sont différenciées sur la base de leurs caractéristiques morphologiques et chromatiques, il est recommandé d'effectuer des tests biochimiques, immunologiques, moléculaires ou de spectrométrie de masse sur les isolats, à partir d'une culture pure, pour une identification complète. Si nécessaire et pertinent, effectuer un test de sensibilité aux antimicrobiens.
- Ce milieu de culture est destiné à faciliter le diagnostic des maladies infectieuses ; l'interprétation des résultats doit se faire en tenant compte de l'histoire clinique du patient, de l'origine de l'échantillon et des résultats d'autres tests diagnostiques.

14 - PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- Ce produit est un diagnostic qualitatif *in vitro*, réservé à un usage professionnel ; il doit être utilisé par un personnel de laboratoire dûment formé et qualifié, en respectant les précautions contre les risques biologiques et les techniques d'asepsie approuvées.
- Les milieux déshydratés doivent être manipulés avec une protection adaptée. Avant toute utilisation, consulter la fiche de données de sécurité.





- Appliquer les bonnes pratiques de fabrication dans le processus de production des milieux préparés.
- Ce milieu de culture contient des matières premières d'origine animale. Les contrôles *ante* et *post mortem* des animaux et ceux effectués au cours du cycle de production et de distribution des matières premières ne peuvent garantir totalement que ce produit ne contient pas d'agent pathogène transmissible. Par conséquent, il est recommandé de traiter le milieu de culture comme potentiellement infectieux et de le manipuler en observant les précautions spécifiques habituelles : ne pas ingérer, inhaler ou laisser entrer en contact avec la peau, les yeux ou les muqueuses. Télécharger la déclaration EST sur le site www.biolifeitaliana.it, qui décrit les mesures mises en œuvre par Biolife Italiana pour réduire les risques liés aux maladies animales infectieuses.
- Tous les échantillons de laboratoire doivent être considérés comme infectieux.
- La zone du laboratoire doit être contrôlée pour éviter les contaminants tels que le milieu de culture ou les agents microbiens.
- Stériliser tous les déchets à risque biologique avant de les éliminer. Éliminer le milieu non utilisé et les plaques stérilisées inoculées avec des échantillons ou des souches microbiennes conformément à la législation locale en vigueur.
- Ne pas utiliser le milieu de culture comme ingrédient actif de préparations pharmaceutiques ou comme matériel de production destiné à la consommation humaine et animale.
- Les certificats d'analyse et la fiche de données de sécurité du produit sont disponibles sur le site web www.biolifeitaliana.it.
- Notifier à Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) et aux autorités compétentes tout incident grave lié à l'utilisation du diagnostic *in vitro*.
- Les informations fournies dans ce document ont été définies au mieux de nos connaissances et de nos capacités et représentent une ligne directrice pour l'utilisation correcte du produit, mais sans obligation ni responsabilité. Dans tous les cas, les lois, réglementations et procédures standard locales en vigueur doivent être respectées pour l'examen des échantillons prélevés dans les districts organiques humains et animaux, pour les échantillons environnementaux et pour les produits destinés à la consommation humaine ou animale. Nos informations ne dispensent pas nos clients de leur responsabilité de vérifier l'adéquation de notre produit à l'usage auquel il est destiné.

15 - CONDITIONS DE STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver à +10°C /+30°C à l'abri de la lumière et dans un endroit sec. S'il est correctement stocké, il peut être utilisé jusqu'à la date de péremption. Ne pas utiliser au-delà de cette date. Éviter d'ouvrir le flacon dans un endroit humide. Après utilisation, le récipient doit être fermé hermétiquement. Jeter le produit si le récipient et/ou le bouchon sont endommagés, ou si le récipient n'est pas bien fermé, ou en cas de détérioration évidente de la poudre (changement de couleur, durcissement, gros morceaux).

L'utilisateur est responsable des processus de fabrication et de contrôle de la qualité des milieux préparés et de la validation de la durée de conservation des produits finis, en fonction du type (plaques/tubes/bouteilles) et de la méthode de stockage (température et emballage).

15 - RÉFÉRENCES

1. Sandys GH. A new method of preventing swarming of *Proteus* sp with a description of a new medium suitable for use in routine laboratory practice. J Med Lab Technol 1960;17:224-233
2. Mackey JP, Sandys GH. Diagnostic de laboratoire de l'infection des voies urinaires en pratique générale au moyen d'un milieu de transport de l'inoculum par immersion Br Med J 1965 ; 2:1286-1288
3. Mackey JP, Sandys GH. Correspondance. Diagnostic des infections urinaires. Br Med J 1966 ; 1:1173
4. Baron EJ. Collecte, transport et traitement des échantillons : Bacteriology. Dans Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. éditeurs. Manual of clinical microbiology, 11e éd. Washington, DC : American Society for Microbiology ; 2015. p.270.
5. Public Health England UK Standards for Microbiology Investigations (normes britanniques pour les analyses microbiologiques). Investigation de l'urine. Bactériologie, B 41, 2019
6. MacFaddin JF. Milieux pour l'isolement, la culture, l'identification et la maintenance des bactéries médicales. Baltimore : Williams & Wilkins ; 1985.
7. CLSI (anciennement NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Norme approuvée, 3ème édition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004

TABEAU DES SYMBOLES APPLICABLES

REF ou REF Numéro de catalogue	LOT Code du lot	IVD Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	 Fabricant	 Utiliser avant
 Limitation de la température	 Contenu suffisant pour <n> tests	 Consulter le mode d'emploi	 Tenir à l'écart de la lumière directe	 Stocker dans un endroit sec

HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Version	Description des changements	Date
Révision 2	Mise à jour de la présentation et du contenu	2020/05
Révision 3	Mise à jour des rubriques "précautions et avertissements" et "conditions de stockage et durée de conservation".	2022/02
Révision 4	Suppression de la classification obsolète	2023/04

Note : les modifications typographiques, grammaticales et de formatage mineures ne sont pas incluses dans l'historique des révisions.

