

## **CLED Agar / MacConkey II Agar (Biplate)**

### **VERWENDUNGSZWECK**

**CLED Agar / MacConkey II Agar (Biplate** = in geteilten Petrischalen) wird zur mikrobiologischen Urinanalyse verwendet. CLED Agar (Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient Agar, Elektrolytarmer Cystin-Lactose-Agar) ist ein Differenzierungsmedium zur Isolierung und quantitativen Bestimmung von Bakterien im Urin. Es unterstützt das Wachstum von im Urin vorhandenen Krankheitserregern und Kontaminanten, verhindert jedoch ein übermäßiges Schwärmen von *Proteus*-Stämmen aufgrund seines Mangels an Elektrolyten. MacConkey II Agar ist ein selektives Differenzierungsmedium zur Isolierung und Differenzierung von *Enterobacteriaceae* und verschiedenen anderen gramnegativen Stäbchen aus klinischen Proben und verschiedenen nicht klinischen Materialien.

### **GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS**

Mikrobiologische Methode.

CLED Agar: 1960 berichtete Sandys über die Entwicklung einer neuen Methode zur Vorbeugung des Schwärmens von *Proteus*-Stämmen auf festen Medien durch Begrenzung der Elektrolyten im Kulturmedium, welche später mehrfach für die Anwendung in Urinkulturen modifiziert wurde.<sup>1-3</sup> Es wurde als Elektrolytarmes Cystin-Lactose-Medium (CLED) bezeichnet und als ideal für Dip-Slide-Techniken und die Bakteriologie des Urins im Allgemeinen beschrieben.

Die Nährstoffe in CLED Agar werden durch die Gelatine- und Casein-Peptide sowie durch Rindfleischextrakt geliefert. Lactose wird als Energiequelle für Organismen hinzugefügt, die die Fähigkeit besitzen, diese durch Fermentation zu nutzen. Bromthymolblau ist ein pH-Indikator zur Differenzierung von Lactosefermentern und Nicht-Lactosefermentern. Lactosefermentierende Organismen erniedrigen den pH-Wert, wodurch sich das grüne Medium gelb färbt. Cystin ermöglicht das Wachstum von „Zwergkolonien“ coliformer Bakterien.<sup>3</sup> Das Medium ist elektrolytarm, wodurch das Schwärmen von *Proteus*-Spezies reduziert oder verhindert wird. Das Medium ermöglicht somit die quantitative Bestimmung von Krankheitserregern im Urin, einschließlich der *Proteus*-Spezies.

MacConkey II-Agar: Dieses Medium wurde bereits 1900 und 1905 zur Isolierung und Differenzierung von *Enterobacteriaceae* und verschiedenen Nonfermentern entwickelt.<sup>4,5</sup> Diese Rezeptur wurde mit dem Wissen konzipiert, dass Gallensalze von Säuren präzipitiert werden und dass bestimmte enterische Mikroorganismen Lactose fermentieren, während andere diese Fähigkeit nicht besitzen. Später wurde dieses Medium mehrmals modifiziert.<sup>6,7</sup>

MacConkey-Agar ist nur schwach selektiv, da die Konzentration an Gallensalzen, welche die grampositiven Mikroorganismen hemmen, im Vergleich zu anderen Medien niedrig ist. Dieses Medium wird zur Verwendung für klinische Proben empfohlen, welche voraussichtlich eine gemischte mikrobielle Flora enthalten, wie z.B. Urin, Proben aus dem Respirationstrakt, aus Wunden oder andere, da es eine Vorgruppierung von *Enterobacteriaceae* und anderen gramnegativen Bakterien in Lactose-fermentierende und nicht Lactose-fermentierende erlaubt.<sup>7-10</sup> Die MacConkey II-Agar-Rezeptur wurde konzipiert, um die Hemmung von schwärmenden *Proteus*-Spezies zu verbessern und damit eine bessere Differenzierung von Lactose-fermentierenden und nicht Lactose-fermentierenden Bakterien und ein verbessertes Wachstum von enterischen Bakterien zu erreichen.

Im MacConkey II-Agar liefern Peptide die Nährstoffe. Kristallviolett hemmt grampositive Bakterien, besonders Enterokokken und Staphylokokken. Die Differenzierung von enterischen Mikroorganismen wird durch die Kombination von Lactose und Neutralrot als pH-Indikator erreicht. In Abhängigkeit von der Fähigkeit des Isolates das Kohlenhydrat zu fermentieren, werden farblose oder rosa bis rote Kolonien gebildet.

Das Vorhandensein von CLED und MacConkey II-Agar in dieser zweigeteilten Platte erlaubt die Bestimmung der Gesamtkeimzahl und die Isolierung von grampositiven und gramnegativen Bakterien aus Urin.

## REAGENZIEN

Zusammensetzung\* pro Liter destilliertem Wasser

CLED Agar		MacConkey II Agar	
Pankreatisch abgebaute Gelatine	4,0 g	Pankreatisch abgebaute Gelatine	17,0 g
Pankreatisch abgebautes Casein	4,0	Pankreatisch abgebautes Casein	1,5
Rindfleischextrakt	3,0	Peptisch abgebautes Tiergewebe	1,5
Lactose	10,0	Lactose	10,0
L-Cystin	0,128	Gallensalze	1,5
Bromthymolblau	0,02	Natriumchlorid	5,0
Agar	15,0	Neutralrot	0,03
pH 7.3 ± 0.2		Kristallviolett	0,001
		Agar	13,5
		pH 7,1 ± 0,2	

\*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.

Hinweise zu Verfahren unter Einhaltung aseptischer 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 des Produktes mit den nachfolgend aufgeführten Stämmen inokulieren (detaillierte Informationen siehe **ALLGEMEINE GEBRAUCHSANLEITUNG**). Platten bei 35 ± 2 °C in einer aeroben Atmosphäre inkubieren. Platten nach 18 bis 24 Stunden auf Wachstum, Farbe, Koloniegroße und auf Hemmung des Schwärmens von *Proteus* überprüfen.

Teststämme	CLED Agar	MacConkey II Agar
<i>Escherichia coli</i> ATCC™ 25922	Wachstum; gelbe Kolonien; Medium gelb	Wachstum; pinkfarbene Kolonien, oft von trüben Zonen (Gallensalzpräzipitation) umgeben
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	Wachstum; Kolonien farblos bis blau; Schwärmen gehemmt; leicht aufgedehntes Wachstum einzelner Kolonien akzeptabel	Wachstum; farblose bis beigefarbene Kolonien; Schwärmen inhibiert
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Wachstum; Kolonien farblos bis gelb; Medium gelb	Teilweise bis vollständige Hemmung
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Wachstum; Kolonien klein, gelb; Medium gelb	Teilweise bis vollständige Hemmung
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> NCTC 10516	Wachstum; Kolonien klein, weiß bis gelblich; Medium gelb	Teilweise bis vollständige Hemmung
Umbeimpft	Grün bis blaugrün	Leicht pinkfarben; leicht opaleszent

## VERFAHREN

### Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

**CLED Agar / MacConkey II Agar (Biplate)**, in zweigeteilten 90 mm-Petrischalen  
Mikrobiologisch überprüft.

### Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

### Probenarten und Probenentnahme

Dieses Produkt ist ausschließlich zur quantitativen Bestimmung und Differenzierung von Bakterien im Urin vorgesehen. Als Probe eignet sich Mittelstrahl- oder Katheterurin, oder Urin, der mittels einer suprapubischen Blasenpunktion gewonnen wurde (siehe auch **LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN**). Bei der Gewinnung von Urinproben aseptische Kautelen beachten. Der Urin muss spätestens 2 Stunden nach der Probenentnahme direkt auf dem Medium ausgestrichen oder gekühlt aufbewahrt (nicht länger als 24 Stunden) werden, um ein Überwachsen der Erreger oder Kontaminanten vor der Inokulation des Mediums zu verhindern.<sup>8-11</sup>

### Testverfahren

Für jedes der beiden Medien in dieser zweigeteilten Platte eine Probe des unverdünnten, gut durchmischten Urins unter Verwendung einer kalibrierten Impföse (0,01 oder 0,001 ml) entnehmen. Auf die korrekte Füllung der Impföse mit der Probe achten. Als erstes eine Probe auf CLED Agar, danach eine zweite Probe auf MacConkey II-Agar ausstreichen. Platten aerob 24 – 48 Stunden lang bei  $35 \pm 2$  °C inkubieren. Nicht in CO<sub>2</sub>-angereicherter Atmosphäre inkubieren!

### Berechnung und Interpretation der Ergebnisse

Die Anzahl der Kolonien (KBE) auf dem CLED-Agar-Medium bestimmen. Bei Verwendung einer 0,01-ml-Impföse entspricht jede Kolonie 100 KBE/ml Urin; Bei Verwendung einer 0,001-ml-Impföse entspricht jede Kolonie 1000 KBE/ml Urin.<sup>8</sup>

Mittelstrahl- und Katheterurin: Nach aktuellen Richtlinien deutet eine Dichte von  $\geq 10^5$  KBE/ml eines Isolats auf eine Infektion hin, eine Dichte von  $< 10^5$  KBE/ml deutet auf eine Kontamination der Harnröhre oder der Vagina hin, und ein Wert zwischen  $10^4$  -  $10^5$  KBE/ml erfordert eine erneute Bewertung anhand der klinischen Informationen.<sup>8-11</sup>

Urin, der durch suprapubische Blasenpunktion gewonnen wurde: Da die Harnblase bei infektionsfreien Patienten steril ist, deutet jede nachgewiesene KBE auf eine Infektion hin.

Infektionserreger im Urin erbringen im Allgemeinen hohe Koloniezahlen mit einheitlicher Koloniemorphologie. Bei Kontamination durch die Urethral- oder Vaginalflora sind dagegen meist geringere Zahlen verschiedener Kolonieförmigkeiten und -größen vorhanden.

Während CLED-Agar das Wachstum von grampositiven und gramnegativen Bakterien erlaubt, werden grampositive Bakterien auf MacConkey II-Agar teilweise bis vollständig gehemmt. Das Vorhandensein von Kolonien auf dem MacConkey II-Agar-Medium deutet auf die Präsenz gramnegativer Stäbchenbakterien, z.B. *Enterobacteriaceae* (wie *E. coli* und viele andere) hin.

CLED und MacConkey II-Agar gestatten nur eine Vordifferenzierung der Kolonien anhand der Lactosefermentation. Auf diesen Medien isolierte Bakterien müssen zur endgültigen Identifizierung und zur Empfindlichkeitsprüfung weiteren Tests unterzogen werden.<sup>10-12</sup>

Das typische Aussehen häufiger Erreger auf diesen Medien ist wie folgt:

Organismus	CLED Agar	MacConkey II Agar
<i>E. coli</i> und andere stark lactose-fermentierende gramnegative Stäbchen	Gelbe Kolonien, opak; gelbes Medium	Pinkfarbene bis rote Kolonien (u.U. umgeben von einer Zone von Galle-Präzipitaten)
<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i>	Gelbe bis weißlich-blaue Kolonien, oftmals mukoid; gelbliches Medium	Mukoide, pinkfarbene Kolonien

<i>Proteus</i> spp.	Durchsichtige farblose bis blaue Kolonien; blau-grünes bis blaues Medium, Schwärmen unterdrückt	Farblose Kolonien, gehemmt Schwärmen um einzeln stehende Kolonien herum
Andere nicht lactose-fermentierende gramnegative Stäbchen	Durchsichtige farblose bis blaue Kolonien; blau-grünes bis blaues Medium	Farblose Kolonien; Medium orange bis bernsteinfarben
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Grüne Kolonien mit typisch mattierter Oberfläche und ungleichmäßiger Peripherie; blaues Medium	Unregelmäßige, farblose bis rosafarbene Kolonien
Enterokokken	Kleine gelbe Kolonien, Durchmesser ca. 0,5 mm; gelbes Medium	Teilweise bis vollständige Hemmung
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tiefgelbe Kolonien, einheitliche Färbung; gelbes Medium	Meist vollständige Hemmung
Koagulasenegative Staphylokokken	Hellgelbe Kolonien, opaker als <i>Enterococcus faecalis</i>	Meist vollständige Hemmung

## LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

**CLED Agar** eignet sich zur Isolierung und quantitativen Bestimmung einer Vielzahl von aerob wachsenden Mikroorganismen, z.B. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* und weitere nicht-fermentierende gramnegative Stäbchen, Enterokokken, Staphylokokken, *Candida*-Spezies, und viele andere Spezies aus Urinproben.

Streptokokken und andere Organismen, die Blut oder Serum zum Wachstum benötigen, können möglicherweise nur unzureichend auf diesem Medium wachsen oder erfordern unter Umständen eine verlängerte Inkubationszeit. Daher sollte die Probe bei Verdacht auf solche Organismen gleichzeitig auf einer Blutagarplatte kultiviert werden.

Erreger urogenitaler Infektionen wie *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia*, *Ureaplasma* oder andere anspruchsvolle Organismen wachsen nicht auf diesem Medium. Informationen über geeignete Nachweismethoden dieser Organismen sind der Literatur zu entnehmen.<sup>9,10,12</sup>

Obwohl eine Differenzierung anhand der Lactose-Fermentierung und bestimmte andere diagnostische Tests direkt auf diesem Medium durchgeführt werden können, sind für eine vollständige Identifizierung biochemische und, falls indiziert, serologische Tests unter Verwendung von Reinkulturen erforderlich.<sup>10-12</sup>

**MacConkey II Agar** ist eines der Standardmedien für das Anlegen primärer Plattenkulturen von klinischen Proben und verschiedenen nicht klinischen Materialien. Auf diesem Medium wachsen alle Organismen der *Enterobacteriaceae*-Familie sowie eine Vielzahl anderer gramnegativer Stäbchen, z.B. *Pseudomonas* und verwandte Gattungen. Nichtfermentierende gramnegative Stäbchenbakterien wachsen auf diesem Medium nur, wenn sie gegen die selektiven Bestandteile resistent sind. Bevor das Medium für spezifische Erreger verwendet wird, sollten die jeweiligen Literaturhinweise konsultiert werden.<sup>8,10</sup>

Berichten zufolge wird das Wachstum von einigen *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas aeruginosa* auf MacConkey-Agar gehemmt, wenn das Medium in einer CO<sub>2</sub>-angereicherten Atmosphäre inkubiert wird.<sup>13</sup>

Obwohl bestimmte diagnostische Tests direkt auf diesem Medium durchgeführt werden können, sind für eine vollständige Identifizierung biochemische und, falls indiziert, immunologische Tests unter Verwendung von Reinkulturen erforderlich. Die entsprechenden Literaturhinweise sind zu beachten.<sup>8,10,12</sup>

## LITERATUR

1. Sandys, G.H. 1960. 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. 17:224-233.
2. Mackey, J.P., and G.H. Sandys. 1965. Laboratory diagnosis of infection of the urinary tract in general practice by means of a dip-inoculum transport medium. Br. Med. J. 2:1286-1288.

3. Mackey, J.P., and G.H. Sandys. 1966. Diagnosis of urinary infections. *Br. Med. J.* 1:1173.
4. MacConkey, A.T. 1900. Note on a new medium for the growth and differentiation of the *Bacillus coli communis* and the *Bacillus typhi abdominalis*. *The Lancet*, Part II:20.
5. MacConkey, A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in faeces. *J. Hyg.* 5:333-379.
6. Levine, M., and H.W. Schoenlein. 1930. A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
7. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
8. Thomson, R.B., and J.M. Miller. 2003. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. *In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.*
9. Gatermann, S., et al. 1997. Harnwegsinfektionen. *In: Mauch, H, et al. (ed.). MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologischen Diagnostik, vol. 2. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena.*
10. Gallien, R. 1988. Mikrobiologische Diagnostik in der ärztlichen Praxis – ein Leitfaden. Fischer Verlag, Stuttgart.
11. Clarridge, J.E., M.T. Pezzlo, and K.L. Vosti. 1987. Cumitech 2A, Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. Mazura-Reetz, G., T.R. Neblett, and J.M. Galperin. 1979. MacConkey agar: CO<sub>2</sub> vs. ambient incubation, abstr. C 179, p. 339. Abstr. 79th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1979.

## LIEFERBARE PRODUKTE

### CLED Agar / MacConkey II Agar (Biplate),

Best.-Nr. 257562                      Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten  
 Best.-Nr. 257680                      Gebrauchsfertige Plattenmedien, 120 Platten



### 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 property of Becton, Dickinson and Company. © 2016 BD