

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

### **USO PREVISTO**

**BD CLED Agar / MacConkey II Agar (Biplate)** è utilizzato per l'analisi microbiologica delle urine. CLED Agar è un terreno di coltura differenziale per l'isolamento e la conta dei batteri nelle urine. MacConkey II Agar è un terreno differenziale e selettivo per l'isolamento e la differenziazione di *Enterobacteriaceae* e molteplici altri bacilli Gram-negativi da campioni clinici e non clinici.

### **PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA**

Metodica microbiologica.

Agar CLED: Nel 1960 Sandys riportò lo sviluppo di un nuovo metodo per impedire la sciamatura di *Proteus* sui terreni solidi riducendo gli elettroliti nel terreno di coltura; in seguito, il terreno è stato modificato a più riprese per consentirne l'uso con le colture di urina.<sup>1-3</sup>

Nell'Agar CLED, le sostanze nutritive sono fornite da peptoni ed estratto di carne bovina. Il lattosio fornisce una fonte di energia ai microrganismi capaci di utilizzarlo mediante un meccanismo di fermentazione. Il blu di bromotimolo è un indicatore di pH per differenziare i microrganismi fermentanti il lattosio dai non fermentanti. I microrganismi che fermentano il lattosio determinano una riduzione del pH e il viraggio del terreno dal verde al giallo. La cistina consente la crescita di "colonie nane" di coliformi.<sup>3</sup> Le fonti di elettroliti vengono ridotte per contenere al minimo la sciamatura delle specie di *Proteus*.

Agar MacConkey II: Uno dei primi preparati per la differenziazione delle *Enterobacteriaceae* fu allestito e documentato da MacConkey nel 1900 e nel 1905.<sup>4,5</sup> La preparazione di questo terreno è basata sulla conoscenza che i sali biliari vengono precipitati dagli acidi e alcuni enterobatteri fermentano il lattosio mentre altri non possiedono tale capacità. Il terreno è stato poi modificato a più riprese.<sup>6,7</sup>

L'agar MacConkey è scarsamente selettivo in quanto la concentrazione di sali biliari, che inibiscono i microrganismi Gram-positivi, è bassa rispetto ad altre tecniche di piastratura per enterobatteri. Il terreno è ideale per campioni clinici che presumibilmente contengono microflora mista, come urine e molti altri, in quanto consente di ripartire le *Enterobacteriaceae* e altri bacilli Gram-negativi in bacilli fermentanti e non fermentanti il lattosio.<sup>7-10</sup>

L'agar MacConkey II è stato allestito per inibire più efficacemente la sciamatura dei *Proteus*, rendere più evidente la differenziazione tra fermentanti e non-fermentanti del lattosio e stimolare la crescita.

In MacConkey II Agar, i peptoni forniscono i nutrienti. Il cristalvioletto inibisce i batteri gram-positivi, soprattutto enterococchi e stafilococchi. La differenziazione dei microrganismi enterici si ottiene mediante combinazione del lattosio con l'indicatore di pH rosso neutro. Vengono prodotte colonie incolori o rosa-rosse, a seconda della capacità dell'isolato di fermentare il carboidrato.

La presenza di Agar CLED e Agar MacConkey II in questa piastra doppia consente la determinazione della conta batterica totale e dell'isolamento di batteri Gram-negativi e Gram-positivi da campioni di urine.

### **REAGENTI**

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

Formula\* per litro di acqua purificata

| <b>CLED Agar</b>                 |       | <b>MacConkey II Agar</b>            |        |
|----------------------------------|-------|-------------------------------------|--------|
| Digerito pancreatico di gelatina | 4,0 g | Digerito pancreatico di gelatina    | 17,0 g |
| Digerito pancreatico di caseina  | 4,0   | Digerito pancreatico di caseina     | 1,5    |
| Estratto di carne bovina         | 3,0   | Digerito peptico di tessuto animale | 1,5    |

|                 |       |                  |       |
|-----------------|-------|------------------|-------|
| Lattosio        | 10,0  | Lattosio         | 10,0  |
| L-cistina       | 0,128 | Sali biliari     | 1,5   |
| Blu bromotimolo | 0,02  | Cloruro di sodio | 5,0   |
| Agar            | 15,0  | Rosso neutro     | 0,03  |
| pH 7,3 ± 0,2    |       | Cristalvioletto  | 0,001 |
|                 |       | Agar             | 13,5  |
|                 |       | pH 7,1 ± 0,2     |       |

\*Formulazione aggiustata e/o supplementata per soddisfare i criteri prestazionali.

## PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro **IVD**. Solo per uso professionale.   
non usare le piastre se presentano segni di contaminazione microbica, discromia, essiccamento, crepe o altri segni di deterioramento.

## CONSERVAZIONE E VITA UTILE

Alla consegna, conservare le piastre **al buio** a 2 – 8 °C nella confezione originaria fino a immediatamente prima dell'uso. Evitare congelamento e surriscaldamento. Le piastre possono essere inoculate sino alla data di scadenza (vedere l'etichetta della confezione) e incubate per i tempi di incubazione raccomandati.

Le piastre prelevate da confezioni da 10 già aperte possono essere usate per una settimana, se conservate in luogo pulito a 2 – 8 °C.

## CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Inoculare i campioni rappresentativi con i ceppi di seguito elencati (per informazioni più dettagliate vedere il documento **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**). Incubare le piastre a 35 ± 2°C in atmosfera aerobia.

Esaminare le piastre dopo 18 – 24 ore per valutare il livello di crescita, la colorazione, le dimensioni delle colonie e impedire la sciamatura/diffusione del *Proteus*.

| Ceppi                                             | CLED Agar                                                                                    | MacConkey II Agar                                         |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922             | Crescita; colonie gialle, terreno giallo                                                     | Crescita, colonie rosa                                    |
| <i>Proteus vulgaris</i><br>ATCC 8427              | Crescita; colonie da incolori a blu; inibizione della sciamatura; lieve sciamatura tollerata | Crescita, colonie da incolori a beige, sciamatura inibita |
| <i>Enterococcus faecalis</i><br>ATCC 29212        | Crescita; colonie da incolori a giallo; terreno giallo                                       | Inibizione da parziale a completa                         |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923        | Crescita; colonie piccole e gialle; terreno giallo                                           | Inibizione da parziale a completa                         |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i><br>NCTC 10516 | Crescita; colonie piccole, da bianche a giallastre; terreno giallo                           | Inibizione da parziale a completa                         |
| Non inoculati                                     | Da verdi a verdazzurre                                                                       | Rosa chiaro, lievemente opalescenti                       |

## PROCEDURA

### Materiali forniti

**BD CLED Agar / MacConkey II Agar** (piastre doppie, 90 mm). Microbiologicamente controllate.

### Materiali non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti e apparecchiature di laboratorio necessarie.

### Tipologia e raccolta dei campioni

Il terreno è utilizzato esclusivamente per la conta e la differenziazione dei batteri nelle urine. Si può usare l'urina della minzione o del catetere, o quella raccolta mediante puntura vescicale ipogastrica (v. anche **CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI E LIMITI DELLA PROCEDURA**). Osservare le tecniche aseptiche per la raccolta dei campioni urinari. Strisciare l'urina direttamente sul terreno non oltre 2 ore dopo la raccolta o conservarla in frigorifero (non oltre 24

ore) per evitare l'eccessiva crescita di agenti infettivi o contaminanti prima dell'inoculo del terreno.<sup>7 8-11</sup>

### Procedura del test

Prelevare un campione di urina miscelata e non diluita usando un'ansa calibrata (0,01 o 0,001 mL) per ciascuno dei due terreni di questa piastra doppia. Verificare il corretto caricamento dell'ansa con il campione. Strisciare un primo campione di urina sul CLED Agar, quindi un secondo campione sul MacConkey II Agar. Incubare le piastre in aerobiosi a  $35 \pm 2$  °C per 24 - 48 h. Non incubare in atmosfera arricchita con CO<sub>2</sub>.

### Calcolo e interpretazione dei risultati

Contare il numero di colonie (UFC) sulla piastra. Se è stata usata un'ansa da 0,01 mL, ogni colonia risultante rappresenta 100 UFC/mL; se è stata usata un'ansa da 0,001 mL, ogni colonia corrisponde a 1000 UFC/mL di urina.<sup>8</sup>

Urina della minzione e del catetere - Relativamente a un isolato, le direttive vigenti stabiliscono che una densità di  $\geq 10^5$  UFC/mL indica la presenza di infezione, una densità di  $< 10^5$  UFC/mL indica contaminazione uretrale o vaginale, mentre una densità tra  $10^4$  e  $10^5$  UFC/mL rende necessario un riesame alla luce dei dati clinici.<sup>8-11</sup>

Urina prelevata mediante puntura vescicale ipogastrica - poiché la vescica è sterile nei soggetti non infetti, le UFC eventualmente osservate indicano la presenza di un'infezione.

In genere, i patogeni dell'urina presentano conte elevate e colonie dall'aspetto uniforme, mentre i batteri contaminanti appaiono in numero ridotto e in colonie a morfologia varia.

Mentre il CLED Agar consente la crescita di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, i batteri Gram-positivi sono parzialmente o completamente inibiti sul MacConkey II-Agar.

La crescita sul terreno MacConkey II Agar indica la presenza di bacilli Gram-negativi, es. *Enterobacteriaceae* (come *E. coli* e molti altri).

CLED Agar e MacConkey II Agar consentono solamente una differenziazione di colonie presuntiva secondo la fermentazione del lattosio. Per una identificazione completa e per la determinazione della sensibilità agli antibiotici, sono necessari test supplementari.<sup>10-12</sup>

La morfologia tipica delle colonie su **BD CLED Agar / MacConkey II Agar (Biplate)** è la seguente.

| Microrganismi                    | CLED Agar                                                                 | MacConkey II Agar                                         |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>          | Colonie gialle, opache; terreno giallo                                    | Crescita, colonie rosa                                    |
| <i>Klebsiella, Enterobacter</i>  | Colonie da giallo a giallo-blu, spesso mucoidi; terreno giallo            | Colonie mucoidi e rosa                                    |
| <i>Proteus</i>                   | Colonie blu traslucido; terreno da verdazzurro a blu                      | Crescita, colonie da incolore a beige, sciamatura inibita |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | Colonie verdi con tipica superficie opaca e periferia ruvida; terreno blu | Colonie irregolari, da incolore a rosa                    |
| Enterococchi                     | Colonie piccole e gialle, terreno di coltura giallo                       | Inibizione da parziale a completa                         |
| <i>Staphylococcus aureus</i>     | Colonie gialle profonde, colorazione uniforme; terreno giallo             | Inibizione da parziale a completa                         |
| Stafilococchi coagulasi-negativi | Colonie giallo pallido, più opache degli enterococchi                     | Inibizione da parziale a completa                         |

### CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

CLED Agar è ideale per l'isolamento e la conta di numerosi microrganismi a crescita aerobica, quali *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* e altri bacilli Gram-negativi non fermentanti, enterococchi, stafilococchi, le specie di *Candida* e molti altri ancora presenti nei campioni urinari.

Gli streptococchi e gli altri organismi che richiedono sangue o siero per crescere sono difficilmente coltivabili su questo terreno o possono richiedere un'incubazione protratta. Il campione, pertanto, deve essere coltivato anche su una piastra di agar sangue se si prevede la presenza di tali organismi.

I patogeni genitourinari, quali *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia*, *Ureaplasma* o altri organismi esigenti non crescono su questo terreno. Consultare la bibliografia per individuare le tecniche di isolamento più adatte per questi organismi.<sup>9,10,12</sup>

Benché sia possibile eseguire la differenziazione direttamente sul terreno, sfruttando la fermentazione del lattosio e altri test diagnostici, per completare l'identificazione sono necessari test biochimici e, all'occorrenza, immunologici usando colture pure.<sup>10-12</sup>

MacConkey II Agar è uno dei terreni standard utilizzati per la piastratura primaria di campioni clinici e altri materiali non clinici. Su questo terreno crescono tutti i microrganismi della famiglia *Enterobacteriaceae* e molteplici altri bacilli Gram-negativi, quali *Pseudomonas* e generi correlati. I batteri non fermentanti crescono su questo terreno se sono resistenti agli ingredienti selettivi. Consultare i rispettivi capitoli della bibliografia prima di usare il terreno per microrganismi specifici.<sup>8,10</sup>

Alcuni ceppi di *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa* vengono inibiti su agar MacConkey allorché incubati in atmosfera arricchita di CO<sub>2</sub>.<sup>13</sup>

Benché alcuni test diagnostici possano essere eseguiti direttamente sul terreno, per completare l'identificazione sono necessari test biochimici e, all'occorrenza, immunologici, eseguiti usando colture pure. Consultare le relative voci della bibliografia.<sup>8,10,12</sup>

## BIBLIOGRAFIA

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.

## CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

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

N. di cat. 257562

Terreni su piastra pronti all'uso, conf. da 20

N. di cat. 257680

Terreni su piastra pronti all'uso, conf. da 120



**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, il logo BD e tutti gli altri marchi sono proprietà di Becton, Dickinson and Company.

©2016 BD