



## BD CLED Agar (Bevis)

### USO PREVISTO

**BD CLED Agar (Bevis)** è una versione modificata dell'agar CLED (Cystine-Lactose-Electolyte-Deficient) [con cistina, lattosio e deficit di elettroliti]. Si tratta di un terreno di coltura differenziale per l'isolamento e la conta dei batteri nelle urine.

### PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodo microbiologico.

Sandys descrisse nel 1960 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> Il terreno viene identificato con la sigla CLED (Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient) ed è ideale per le tecniche di inoculo in immersione e la batteriologia urinaria in generale. Bevis ha modificato il terreno aggiungendo l'indicatore Andrade (fucsina acida).<sup>4</sup> L'abbinamento dei due indicatori del pH, blu bromotimolo e fucsina acida, consente di migliorare la differenziazione degli organismi sfruttando la colorazione delle colonie e del terreno.<sup>4,5</sup>

**BD CLED Agar (Bevis)** utilizza i peptoni di gelatina e caseina come fonti di azoto e l'estratto di carne bovina per fornire ulteriori nutrienti. Viene aggiunto anche il lattosio come fonte energetica per gli organismi in grado di utilizzarlo attraverso la fermentazione. La cistina consente la crescita di "colonie nane" di coliformi. Il blu bromotimolo e la fucsina acida costituiscono un sistema indicatore del pH che permette di differenziare i batteri fermentanti dai non fermentanti il lattosio. La concentrazione di elettroliti viene ridotta per impedire la sciamatura di *Proteus* spp.

### REAGENTI

#### BD CLED Agar (Bevis)

Formula\* per litro di acqua purificata

Peptone di gelatina	4,0 g
Peptone di caseina	4,0
Estratto di carne bovina	3,0
Lattosio	10,0
L-cistina	0,13
Blu bromotimolo	0,02
Indicatore Andrade (fucsina acida)	0,1
Agar	15,0

pH 7,5 ± 0,2

\*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

### PRECAUZIONI

**IVD** . Solo per uso professionale.

Non usare le piastre se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazioni cromatiche, essiccamento, fissurazioni o altri segni di deterioramento.

Per maneggiare i prodotti in condizioni asettiche, riconoscere i rischi biologici e smaltire i prodotti usati, consultare le **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**.

### 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 (v. l'etichetta sulla confezione) e incubate per i tempi di incubazione raccomandati.

Le piastre prelevate dalle 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 seguenti ceppi (per informazioni più dettagliate, v. **INFORMAZIONI GENERALI PER L'USO**). Incubare le piastre a 35 ± 2 °C in atmosfera aerobica.

Esaminare le piastre dopo 18 – 24 h per valutare il livello di crescita, la colorazione, le dimensioni delle colonie e l'inibizione della sciamatura/diffusione di *Proteus*.

Ceppi	Risultati della crescita
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Colonie medio-grandi rosso-arancioni con alone da rosa a rosso
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	Colonie medio-grandi, da incolore a grigio-blu, con sciamatura, da parzialmente a completamente inibite
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Colonie medio-piccole, da bianche a gialle, con alone da rosa a rosso
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Colonie medie, color oro, con alone rosa
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	Colonie medio-piccole, da bianche ad appena rosate, con alone rosa
Non inoculate	Blu

## PROCEDURA

### Materiali forniti

**BD CLED Agar (Bevis)** su piastre impilate **Stacker** da 90 mm. Microbiologicamente controllate.

### Materiali non forniti

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

### Tipologia e prelievo dei campioni

Il terreno è utilizzato esclusivamente per la conta e la differenziazione dei batteri nelle urine. Si può utilizzare l'urina della minzione o del catetere, o quella raccolta mediante puntura vescicale sovrapubica (v. anche **PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**). Osservare le tecniche aseptiche per il prelievo dei campioni urinari. Strisciare l'urina direttamente sul terreno non più tardi di 2 h dopo il prelievo o conservarla in frigorifero (non oltre 24 h) per evitare l'eccessiva crescita di agenti infettivi o contaminanti prima dell'inoculazione del terreno.<sup>6,7</sup>

### Procedura del test

Prelevare un campione di urina ben miscelata e non diluita usando un'ansa calibrata (0,01 o 0,001 mL). Verificare che l'ansa sia caricata correttamente con il campione. Inoculare il campione a metà della piastra con una sola strisciata da cui espandere ulteriormente l'inoculo.<sup>6,7</sup> Incubare le piastre in aria ambiente a 35 ± 2 °C per 18 – 24 h.

### Risultati

Il tipico aspetto delle colonie su **BD CLED Agar (Bevis)** è il seguente:

Organismi	Risultati della crescita
<i>Escherichia coli</i>	Colonie da rosso-arancioni a rosse, con alone da rosa purpureo a rosa
<i>Proteus mirabilis</i>	Colonie verdazzurre, trasparenti
<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i>	Colonie mucoidi, da grigioverdi o arancioni a blu
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonie lisce, opache, color oro, con alone rosa purpureo
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Colonie lisce, da bianche ad appena rosate, con alone rosa
<i>Enterococcus faecalis</i>	Piccole colonie opache da gialle ad arancioni, con piccolo alone da rosa purpureo a rosa

### 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 rappresenta 100 UFC/mL; se è stata usata un'ansa da 0,001 mL, ogni colonia corrisponde a 1000 UFC/mL di urina.<sup>6,7</sup>

Urina della minzione e del catetere: le direttive vigenti stabiliscono che se un singolo isolato ha una densità di  $\geq 10^5$  UFC/mL è presente infezione, se la densità è  $< 10^5$  UFC/mL si ha 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>6,7</sup>

I batteri contaminanti in genere appaiono in numero ridotto e in colonie di differenti forme.

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

I patogeni dell'urina presentano conte elevate e colonie dall'aspetto uniforme e le subcolture devono essere trasferite direttamente sui terreni adatti per i test di identificazione e sensibilità.<sup>6,7,9</sup>

### PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

**BD CLED Agar (Bevis)** è usato per l'isolamento e la conta di numerosi microrganismi a crescita aerobica, ad es. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* e altri bacilli Gram-negativi non fermentanti, enterococchi, stafilococchi, *Candida* spp. e molti altri presenti nei campioni urinari.

#### Risultati delle prestazioni

**BD CLED Agar (Bevis)** è stato testato con ceppi di *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus agalactiae* e *Candida albicans* nell'ambito di un'indagine valutativa interna.<sup>8</sup> Sono stati usati prevalentemente ceppi ATCC, ma con l'aggiunta di diversi isolati clinici. **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** è stato usato come terreno di riferimento per la crescita. Dopo 20 h di incubazione a  $35 \pm 2$  °C, tutte le *Enterobacteriaceae* e le *C. albicans* si sono sviluppate molto bene sul terreno, dando le reazioni cromatiche attese. La crescita di *S. agalactiae* è stata soddisfacente, con formazione di colonie da minuscole a piccole. Risultati più dettagliati sono riportati di seguito.

Specie	Risultati su BD CLED Agar (Bevis)
<i>Candida albicans</i>	Colonie biancastre da minuscole a piccole su terreno blu
<i>Citrobacter freundii</i>	Colonie rosse su terreno rosso
<i>Enterobacter cloacae</i>	Colonie rosse su terreno rosso
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Colonie rosse su terreno rosso
<i>Proteus mirabilis</i>	Colonie grigiastre su terreno blu, sciamatura parzialmente inibita
<i>Proteus vulgaris</i>	Colonie grigiastre su terreno blu, sciamatura parzialmente inibita
<i>Providencia stuartii</i>	Colonie celesti su terreno blu
<i>Salmonella typhimurium</i>	Colonie trasparenti celesti su terreno blu
<i>Serratia liquefaciens</i>	Colonie bianco-grigie su terreno blu
<i>Shigella sonnei</i>	Colonie trasparenti celesti su terreno blu
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Colonie arancioni da minuscole a piccole, con alone da rosa purpureo a rosa su terreno rosso

#### Limitazioni della procedura

Streptococchi e altri organismi che richiedono sangue o siero per svilupparsi possono essere isolati con estrema difficoltà su questo terreno o richiedere un'incubazione protratta. Se si sospetta la presenza di tali organismi, pertanto, coltivare i campioni anche su una piastra di agar sangue.

Su questo terreno non crescono i patogeni urogenitali, come *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia*, *Ureaplasma* o altri organismi esigenti. Consultare la bibliografia per individuare le tecniche di isolamento più adatte agli organismi.<sup>6</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>9</sup>

Non incubare l'agar CLED (Bevis) più di 24 h, in quanto il colore delle reazioni potrebbe risultare alterato.

## **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. Bevis, T.D. 1968. A modified electrolyte deficient culture medium. Med. Lab. Technol. 25: 38-41.
5. MacFaddin, J. D. 1985. Media for isolation – cultivation – identification - maintenance of medical bacteria, vol. 1, p. 65-68. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
6. 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. Tenenbaum (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. 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.
8. Data on file. BD Diagnostic Systems Europe. Heidelberg, Germany.
9. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

## **CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ**

### **BD CLED Agar (Bevis)**

N. di cat. 255529 Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 20

## **ULTERIORI INFORMAZIONI**

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.



### **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 the property of Becton, Dickinson and Company. © 2012 BD