BD CLED Agar

PRZEZNACZENIE

BD CLED Agar (Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient Agar – agar ubogi w cystynę, laktozę i elektrolity) jest różnicującym podłożem hodowlanym przeznaczonym do izolowania i analiz ilościowych bakterii z próbek moczu. Podłoże zapewnia wzrost patogenów i czynników zanieczyszczających występujących w układzie moczowym, zapobiegając jednocześnie nadmiernemu wzrostowi kolonii rodzaju *Proteus* ze względu na brak elektrolitów.

ZASADY I OBJAŚNIENIE PROCEDURY

Metoda mikrobiologiczna.
W 1960 r. Sandys opublikował informacje na temat opracowanej przez siebie nowej metody zapobiegania stopniowemu wzrostowi kolonii *Proteus* na podłożach stałych poprzez ograniczenie ilości elektrolitów w podłożu hodowlanym. Skład podłoża następnie kilkakrotnie zmodyfikowano w celu wykonywania posiewów z moczu[1-3]. Podłoże określane jako ubogie w cystynę, laktozę i elektrolity (CLED, Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient), zostało uznane za idealne do technik posiewów zanurzeniowych oraz do bakteriologicznych badań moczu w ogóle.
Składniki odżywcze zawarte w pożywce **BD CLED Agar** pochodzą z żelatyny i peptonów kazeiny, jak również z wyciągu wołowego. Podłoże zawiera również laktozę stanowiącą źródło energii dla organizmów zdolnych do jej wykorzystania w mechanizmie fermentacji. Jako wskaźnik pH, umożliwiający odróżnienie bakterii zdolnych i niezdolnych do fermentacji laktozy, stosuje się błękit bromotymolowy. Organizmy zdolne do fermentacji laktozy obniżają pH i zmieniają zabarwienie pożywki z zielonego na żółte. Cystyna umożliwia wzrost „kolonii karłowatych" pałeczek jelitowych.[3] Źródła elektrolitów zostały zredukowane w celu ograniczenia do minimum wzrostu kolonii gatunków *Proteus*. Dzięki temu podłoże umożliwia ilościowe badanie patogenów układu moczowego, w tym rodzaju *Proteus*, przy wykonywaniu posiewu za pomocą kalibrowanych ez.

ODCZYNNIKI

BD CLED Agar

Skład* w przeliczeniu na jeden litr wody oczyszczonej

Trzustkowy hydrolizat żelatyny	4,0 g
Trzustkowy hydrolizat kazeiny	4,0
Wyciąg wołowy	3,0
Laktoza	10,0
L-cystyna	0,128
Błękit bromotymolowy	0,02
Agar	15,0

pH 7,3 ± 0,2
*Skorygowany i (lub) uzupełniony zgodnie z wymaganiami mającymi na celu spełnienie kryteriów wydajności.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

IVD . Wyłącznie do zastosowań profesjonalnych.
Nie należy używać płytek, jeżeli są na nich widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia, pęknięcia lub inne zjawiska wskazujące na pogorszenie jakości.

Procedury aseptycznej techniki pracy z produktem, zagrożenia biologiczne oraz usuwanie zużytego produktu opisano w dokumencie **OGÓLNE INSTRUKCJE DOTYCZĄCE STOSOWANIA**.

PRZECHOWYWANIE I DOPUSZCZALNY OKRES PRZECHOWYWANIA

Po otrzymaniu, płytki należy przechowywać w ciemnym miejscu w temperaturze od 2 do 8° C, w ich oryginalnym opakowaniu izolującym do chwili użycia. Unikać zamrażania i przegrzewania. Posiewu na płytki można dokonywać aż do daty ważności (patrz etykieta na opakowaniu) i inkubować w zalecanych czasach inkubacji.
Płytek z otwartych stosów zawierających po 10 płytek można używać przez okres jednego tygodnia, przechowując w czystym miejscu w temperaturze od 2 do 8° C.

KONTROLA JAKOŚCI PRZEZ UŻYTKOWNIKA

Na płytki posiewa się próbki reprezentatywne niżej wymienionych szczepów (szczegółowe informacje – patrz dokument **OGÓLNE INSTRUKCJE DOTYCZĄCE STOSOWANIA**). Płytki inkubuje się w temperaturze 35 ± 2°C w atmosferze tlenowej.
Płytki należy badać po 18–24 godz., oceniając stopień wzrostu, barwę i wielkość kolonii oraz hamowanie wzrostu/rozsiewania kolonii *Proteus*.

Szczepy bakteryjne	**Wzrost**
Escherichia coli ATCC 25922	Wzrost; kolonie żółte; podłoże żółte
Proteus vulgaris ATCC 8427	Wzrost; kolonie bezbarwne do niebieskich; zahamowanie wzrostu kolonii; dopuszczalny niewielki rozsiew
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Wzrost; kolonie bezbarwne do żółtych; podłoże żółte
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Wzrost; kolonie małe, żółte; podłoże żółte
Staphylococcus saprophyticus ATCC 15305	Wzrost; kolonie małe, białe do żółtawych; podłoże żółte
Bez posiewu	Zielone do niebieskozielonego

PROCEDURA

Dostarczane materiały

Podłoże **BD CLED Agar** (płytki **Stacker** o śr. 90 mm). Sprawdzane pod kątem obecności mikroorganizmów.

Materiały niedostarczane

Pomocnicze pożywki hodowlane, odczynniki i wyposażenie laboratoryjne zgodnie z wymaganiami.

Typy próbek i pobieranie próbek

Opisywana pożywka służy wyłącznie do analizy ilościowej i różnicowania bakterii w moczu. Można stosować mocz ze strumienia środkowego lub z cewnika, bądź mocz pobrany drogą nakłucia nadłonowego (patrz także **CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW I OGRANICZENIA DOTYCZĄCE PROCEDURY**). Podczas pobierania próbek moczu należy przestrzegać zasad techniki aseptycznej. Mocz należy posiać bezpośrednio na podłożu nie później niż 2 godziny po pobraniu, bądź przechowywać w chłodziarce (nie dłużej niż przez 24 godziny), aby uniknąć nadmiernego wzrostu czynników zakaźnych i zanieczyszczających przed wykonaniem posiewu.[2-5]

Procedura testowa

Pobrać próbkę nierozcieńczonego, dobrze wymieszanego moczu za pomocą ezy kalibrowanej (0,01 lub 0,001 ml). Należy dopilnować, by na ezie znajdowała się właściwa ilość próbki. Wykonać posiew próbki pojedynczym pociągnięciem przez środek płytki, a następnie dodatkowo rozprowadzić tak zaszczepione inokulum.[4,5] Płytki inkubuje się na powietrzu, w naturalnym środowisku, w temperaturze 35 ± 2°C przez okres 24–48 godz.

Wyniki
Typowa morfologia kolonii otrzymywanych na podłożu **BD CLED Agar**:

Drobnoustroje	**Wzrost**
Escherichia coli	Kolonie żółte, matowe; podłoże żółte
Klebsiella, Enterobacter	Kolonie żółte do białawoniebieskich, często śluzowe; podłoże żółtawe
Proteus	Kolonie półprzezroczyste, niebieskie; podłoże niebieskozielone do niebieskiego
Pseudomonas aeruginosa	Kolonie zielone o typowej matowej powierzchni i nierównych brzegach; podłoże niebieskie
Enterokoki	Kolonie małe, żółte, o średnicy około 0,5 mm; podłoże żółte
Staphylococcus aureus	Kolonie głębokie, żółte, o jednolitym zabarwieniu; podłoże żółte
Gronkowce koagulazoujemne	Kolonie bladożółte, bardziej matowe niż w przypadku *Enterococcus faecalis*

Obliczanie i interpretacja wyników
Obliczyć ilość kolonii (CFU) na płytce. W przypadku użycia ezy 0,01 ml, każda kolonia oznacza 100 CFU/ml, natomiast w przypadku użycia ezy 0,001 ml, każda kolonia odpowiada 1000 CFU/ml moczu.[5]
Mocz ze środkowego strumienia i z cewnika: Według aktualnych wytycznych, pojedynczy wynik oznaczenia $\geq 10^5$ CFU/ml wskazuje na występowanie zakażenia, wynik $<10^5$ CFU/ml wskazuje na zanieczyszczenie cewki moczowej lub pochwy, a wynik z zakresu 10^4–10^5 CFU/ml wymaga ponownej oceny w oparciu o informacje kliniczne.[6]
Bakterie zanieczyszczające zwykle występują w niewielkich ilościach i wykazują zróżnicowaną morfologię kolonii.
Mocz pobierany drogą nakłucia nadłonowego: Ze względu na to, że w przypadku braku zakażenia zawartość pęcherza moczowego jest sterylna, wykrycie CFU jest równoznaczne z rozpoznaniem zakażenia.

Patogeny układu moczowego zwykle występują w dużych ilościach, wykazują jednolitą morfologię kolonii i wymagają wykonania kolejnych posiewów na rutynowe podłoża w celu przeprowadzenia identyfikacji i badania wrażliwości.[5,6]

CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW I OGRANICZENIA DOTYCZĄCE PROCEDURY
Podłoże **BD CLED Agar** jest przeznaczone do izolowania i oznaczania ilościowego wielu gatunków bakterii wykazujących wzrost w warunkach tlenowych, takich jak *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* i inne niefermentujące pałeczki Gram ujemne, enterokoki, gronkowce, grzyby rodzaju *Candida* i wiele innych drobnoustrojów występujących w próbkach moczu.

Opisywane podłoże niekiedy nie pozwala na skuteczną hodowlę paciorkowców i innych organizmów, które do wzrostu wymagają krwi lub surowicy; w takich przypadkach konieczna może być dłuższa inkubacja. W związku z tym w przypadku podejrzenia występowania organizmów tego typu próbkę należy zaszczepić także na podłożu agarowym z krwią.
Na podłożu tym nie wykazują wzrostu patogeny układu moczowego i płciowego, takie jak *Neisseria gonorrhoeae, Gardnerella vaginalis, Chlamydia, Ureaplasma* oraz inne organizmy o wysokich wymaganiach. Prawidłowe techniki wykrywania tych organizmów przedstawiono w odpowiednich publikacjach.[4-6]
Choć na opisywanej pożywce można wykonywać bezpośrednio różnicowanie na podstawie fermentacji laktozy i pewne inne testy diagnostyczne, jednak w celu przeprowadzenia pełnej identyfikacji konieczne jest wykonanie badania biochemicznego oraz, jeśli jest to wskazane, badania immunologicznego z użyciem czystych hodowli.

PIŚMIENNICTWO
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. Barry, A.L., P.B. Smith, and M. Turck. 1975. Cumitech 2, Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Coordinating ed., T.L. Gavan. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. 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. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. 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.

PAKOWANIE / DOSTĘPNOŚĆ

BD CLED Agar

Nr katalogowy 254003	Gotowe podłoża na płytkach hodowlanych, 20 płytek
Nr katalogowy 254070	Gotowe podłoża na płytkach hodowlanych, 120 płytek

DODATKOWE INFORMACJE

W celu uzyskania dodatkowych informacji należy się skontaktować z lokalnym przedstawicielem firmy BD.

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