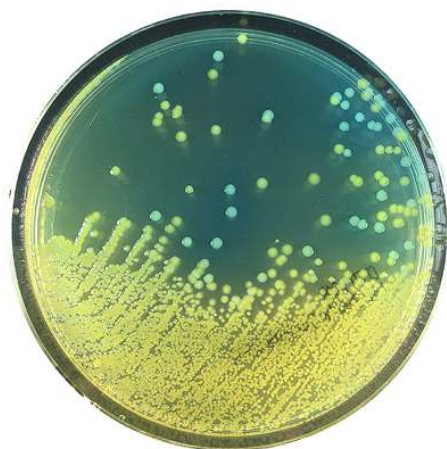


**ISTRUZIONI PER L'USO****CLED MEDIUM****Piastre pronte all'uso**

CLED Medium: *E.coli* (colonie gialle, lattosio fermentanti)
+ *S.Enteritidis* (colonie blu, lattosio non fermentanti)

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno di coltura differenziale per l'isolamento l'enumerazione e l'identificazione presuntiva dei microrganismi nelle urine.

2 - COMPOSIZIONE

Triptone	4,000 g
Digerito pancreatico di gelatina	4,000 g
Peptone	3,000 g
Lattosio	10,000 g
L-cistina	0,128 g
Blu di bromotimolo	0,020 g
Agar	15,000 g
Acqua purificata	1000 mL

*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

CLED Medium si basa sulla formula descritta da Sandys¹ nel 1960 per l'urinocoltura e sviluppata al fine di prevenire la sciamatura di *Proteus* spp. Il terreno fu successivamente modificato da Mackey e Sandys² che sostituirono il mannitolo con il lattosio ed il saccarosio e aumentarono le concentrazioni dell'indicatore e dell'agar. Mackey e Sandys³ modificarono ulteriormente il terreno eliminando il saccarosio ed incorporando la L-cistina, al fine di migliorare la crescita dei coliformi cistina dipendenti, che sviluppavano piccole colonie sul terreno originale. Questo terreno finale, denominato Cystine-Lactose-Electrolite-Deficient (CLED) medium, è risultato ideale per l'urinocoltura, sia utilizzato in piastra che su dip-slide poiché supporta la crescita di tutti i potenziali agenti patogeni urinari e consente una buona differenziazione delle colonie ed un loro facile riconoscimento³. Il terreno permette anche la crescita di una serie di contaminanti come difteroidi, lattobacilli e micrococchi e fornisce un'indicazione sull'entità della contaminazione; inoltre, pur non essendo un terreno selettivo, previene la sciamatura di *Proteus* spp.³

I peptoni animali forniscono carbonio, azoto, vitamine e oligoelementi per la crescita microbica; la cistina migliora la crescita dei coliformi³; il lattosio è presente nel terreno come carboidrato fermentabile: i batteri che lo fermentano producono acidi con conseguente viraggio del blu di bromotimolo da blu-verde a giallo.

4 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto blu-verde, limpido
pH finale a 20-25 °C 7,3 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
CLED Medium	Piastre pronte all'uso	541901	2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

CLED Medium è destinato all'esame microbiologico di campioni clinici come l'urina. Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici.^{4,5}

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno. Mescolare delicatamente l'urina per evitare la formazione di schiuma. Immergere l'estremità dell'ansa sterile (ad es. 1µL o 10µL) nell'urina appena sotto la superficie e rimuoverla verticalmente, facendo attenzione a non trasportare il campione sull'asta dell'ansa. Strisciare l'ansa dall'alto verso il basso con una linea verticale e di nuovo dall'alto verso il basso perpendicolarmente a questa linea. Disperdere l'inoculo in modo omogeneo su tutta la superficie dell'agar per semplificare il conteggio delle colonie dopo la crescita. Incubare a 35-37 °C in aerobiosi ed osservare dopo 18-24 e 48 ore.

Sebbene la maggior parte dei microrganismi coltivati entro le 24 ore di incubazione, vi possono essere nel campione microrganismi a crescita lenta o la presenza di antibiotici che inibiscono la crescita (es. streptococchi) durante l'incubazione "overnight". Le urinocolture che risultano negative dopo le 24 ore dovrebbero essere sottoposte al test della leucocito-esterasi ed al test dei nitriti. In caso di positività ad uno o ad entrambi i test, re-incubare per 24 ore aggiuntive e/o seminare il campione su piastre di agar-sangue.⁴





9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, contare le colonie sviluppate sulla piastra (UFC) e registrarne ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica.

Se viene utilizzata un'ansa da 1 μ L, una colonia equivale a 1000 UFC/mL nel campione, se viene utilizzato un'ansa da 10 μ L, una colonia equivale a 100 UFC/mL.

Gli studi condotti negli anni '50 rimangono la base per interpretare i risultati dell'urinocoltura: una conta microbica $\geq 10^5$ UFC/mL è indicativa di un'infezione in corso, conte al di sotto di questa soglia, di solito, indicano una contaminazione.⁵

In specifici gruppi di pazienti possono però essere significativi conteggi compresi tra 10⁵ CFU/mL e 10² CFU/mL; se un microrganismo è presente in coltura pura, con una carica compresa tra 10⁴ e 10⁵ UFC/mL, il risultato deve essere valutato sulla base delle informazioni cliniche o confermato da colture ripetute.⁵ Per l'urina raccolta con puntura sovrapubica la presenza di una qualsiasi carica microbica è indice di un'infezione in corso.⁵

Consultare gli appropriati riferimenti bibliografici per i criteri completi di interpretazione dei risultati dell'urinocoltura.^{4,5}

La morfologia tipica delle colonie che si sviluppano su CLED Medium è riassunta nella tabella che segue.⁶

<i>Escherichia coli</i>	Colonie gialle, opache, con il centro di colore più intenso
<i>Klebsiella/Enterobacter</i>	Colonie da gialle a biancastre-blu, mucoidi
<i>Salmonella</i>	Colonie piatte, blu
<i>Proteus</i>	Colonie blu, traslucide
<i>Pseudomonas</i>	Colonie verdi con la tipica rugosità sulla superficie ed in periferia
Enterococchi	Piccole colonie gialle
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonie giallo intense, con colore uniforme
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Colonie giallo pallido, più opache di quelle di <i>S.aureus</i>

10 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.⁷

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T°/ T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie gialle
<i>E. coli</i> ATCC 25922	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie gialle con alone giallo
<i>P. vulgaris</i> ATCC 8427	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie bluastre non sciamate

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre di CLED Medium e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere CLED Medium REF 4012901) sono testati per la produttività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento ed un lotto di Tryptic Soy Agar (TSA).

La produttività è saggiata con metodo quantitativo con il ceppo *E.faecalis* ATCC 19433. Le piastre di CLED Medium e di TSA sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina di una sospensione di colonie del ceppo target. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi vengono contate le colonie sviluppate sul lotto in esame e sul TSA e viene calcolato l'indice di produttività ($Pr=UFC_{CLED}/UFC_{TSA}$). Nel caso tale indice sia maggiore o uguale a 0,5 e nel caso il colore delle crescite sia tipico (colonie gialle), i risultati sono giudicati conformi.

Inoltre la produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi: *E.coli* ATCC 25922, *P.vulgaris* ATCC 9484, *P.vulgaris* ATCC 8427, *P.mirabilis* ATCC 10005, *E.aerogenes* ATCC 13048, *K.pneumoniae* ATCC 27736, *S.aureus* ATCC 25923, *C.albicans* ATCC 18804. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 h ore in aerobiosi si osservano le caratteristiche cromatiche dei ceppi e l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano colori tipici ed in accordo alle specifiche e buone crescite, comparabili nel lotto in esame e nel Lotto di Riferimento.

12 - LIMITI DEL METODO

- Se nel campione si sospetta la presenza di patogeni urogenitali (*Neisseria*, *Ureaplasma*, *Gardnerella*) che non si sviluppano su CLED Medium, seminare il campione anche sugli appropriati ed adatti terreni di coltura.
- Essendo povero di elettroliti, *Shigella* spp. normalmente non crescono su questo terreno.⁶
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni d'uso specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.





- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

15 - BIBLIOGRAFIA

- 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
- Mackey JP, Sandys GH. Laboratory diagnosis of infection of the urinary tract in general practice by means of a dip-inoculum transport medium *Br Med J* 1965; 2:1286-1288
- Mackey JP, Sandys GH. Correspondence. Diagnosis of urinary infections. *Br Med J* 1966; 1:1173
- Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. *Manual of clinical microbiology*, 11th ed. Washington,DC: American Society for Microbiology; 2015. p.270.
- Public Health England UK Standards for Microbiology Investigations. Investigation of urine. *Bacteriology*, B 41, 2019
- MacFaddin JF. *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- CLSI (formerly NCCLS) *Quality Control of Commercially Prepared Culture Media*. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Utilizzare entro
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Non riutilizzare	Fragile maneggiare con cura

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	06/2020
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	03/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

