



CLED Agar

Differential medium for detection of urinary pathogens.

INTENDED PURPOSE

Differential medium for the isolation, enumeration and differentiation of pathogenic bacteria in urine specimens. This medium is intended as an aid in the diagnosis, requiring further tests to complete the diagnostic results.

DESCRIPTION

CLED (Cysteine-, Lactose-, Electrolyte-Deficient) Agar is a medium for urine culture supporting the growth of urinary microorganisms and providing good colony differentiation while the swarming of *Proteus* is inhibited.

TYPICAL FORMULA*

(g/litre)

Enzymatic Digest of Gelatin	4.0
Enzymatic Digest of Casein	4.0
Beef Extract	3.0
Lactose	10.0
L-Cystine	0.128
Bromothymol Blue	0.02
Agar	15.0
Final pH 7.3 ± 0.2 at 25°C	

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.

METHOD PRINCIPLE

Enzymatic digest of gelatin, enzymatic digest of casein and beef extract provide amino acids, nitrogen, carbon, vitamins and minerals required for organisms growth. Lactose is the fermentable carbohydrate. L-cystine is a growth supplement for cystine-dependent organisms. Bromothymol blue is the pH indicator changing color from green to yellow when lactose fermentation lowers the pH. Agar is the solidifying agent. Lack of electrolytes suppresses the swarming of *Proteus* and *Shigella* species.

PREPARATION

Dehydrated medium

Suspend 36.1 g of the powder in 1 liter of distilled or deionized water. Mix well. Heat to boil shaking frequently until completely dissolved. Sterilize in autoclave at 121°C for 15 minutes.

Medium in bottles

Melt the content of the bottle in a water bath at 100°C (loosing the cap partially removed) until completely dissolved. Then screw the cap and check the homogeneity of the dissolved medium, if it is the case turning the bottle upside down. Cool at 45-50°C, mix well avoiding foam formation and aseptically distribute into Petri dishes.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Standard microbiological supplies and equipment such as: Autoclave, water bath, sterile Petri plates, test tubes, inoculating loops, swabs, incubator, quality control organisms.

SPECIMENS

Urine specimens should be sampled before antimicrobial therapy (where possible) and examined as soon as possible after collection. Good laboratory practices for collection, transport and storage of clinical specimens should be applied. Refer to specific guidelines for more information about specimen collection and preparation.

TEST PROCEDURE

Urine must be directly streaked over the agar surface no later than 2 h after collection or must be kept at 2-8°C (not longer than 24 h) to avoid microbial overgrowth.

Use a calibrated loop (1 µl, 2µl or 10 µl) to inoculate the medium with the undiluted, well-mixed urine sample. Incubate aerobically at 35 ± 2°C for 18-48 h.

For more details, consult appropriate guidance.

INTERPRETING RESULTS

After incubation, count the number of colonies on the plate.

If a 1 µl loop is used, one colony equals 1000 CFU/ml (i.e., 1×10^6 CFU/litre). Using a 10 µl loop each colony corresponds to 100 CFU/ml of urine.

Observe the color and the morphology of the colonies for presumptive identification according to the following table.

Microorganism	Typical Colony
<i>Escherichia coli</i>	Yellow, opaque
<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> spp.	Yellow to whitish-blue, mucoid
<i>Proteus</i> spp.	Translucent blue
<i>Salmonella</i> spp.	Flat blue
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Green, matt surface and rough periphery
<i>Enterococcus</i> spp.	Yellow, about 0.5 mm in diameter
<i>Staphylococcus aureus</i>	Deep yellow
Coagulase negative <i>staphylococci</i>	Pale yellow

Note: Further testing should be conducted to confirm the presumptive identification of organisms isolated on this medium.

STORAGE

The powder is very hygroscopic, store the powder at 10-30°C, in a dry environment, in its original container tightly closed. Store bottles and prepared plates at 10-25°C away from light. Do not use the product beyond its expiry date on the label or if product shows any evidence of contamination or any sign of deterioration.

SHELF LIFE

Dehydrated medium: 4 years.

Medium in bottles: 2 years.

Ready-to-use plates: 6 months.

QUALITY CONTROL

Appearance of Dehydrated Medium: Free-flowing, homogeneous, pale green or straw.

Appearance of Prepared Medium: Slightly opalescent, green to blue-green.

Expected Cultural Response:

Control strain		Inoculum	Incubation	Criteria	Specification
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 29212	50-100 CFU	18-24 h / 35 ± 2°C	Good growth ($P_R \geq 0.7$)	Yellow colonies
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922				Yellow colonies
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 12453				Blue colonies, no swarming
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 25933				Blue colonies, no swarming
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923				Yellow colonies

A productivity ratio (P_R) of 0.7 is equivalent to a recovery rate of 70%.

Please refer to the actual batch related Certificate of Analysis (CoA).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Performance testing of CLED Agar was carried out using the QC strains listed above. The results obtained met the established criteria.

LIMITATIONS

Invalid results can be caused by poor specimen quality, improper sample collection, improper transportation, improper laboratory processing, or a limitation of the testing technology. The operator should understand the principles of the procedures, including its performance limitations, in advance of operation to avoid potential mistakes.

Due to nutritional variation, some strains may result in poor growth or fail to grow on this medium.

Observe aseptic techniques for urine specimen collection. Urine must be streaked directly onto the ground no later than 2 hours after harvesting or must be stored in the refrigerator (no longer than 24 hours) to avoid excessive growth of infectious agents or any contamination before inoculation of the medium.

CLED Agar is intended as an aid in the diagnosis of infectious diseases, requiring further tests to complete the diagnostic results. All identification tests should ideally be performed from non-selective agar.

WARNING AND PRECAUTIONS

- 1) **For *in vitro* diagnostic use (IVD).**
- 2) **For laboratory professional use only.**
- 3) Operators must be trained and have certain experience. Please read the instructions carefully before using the product. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this document.
- 4) Consult the Safety Data Sheet (SDS) for information regarding hazards and safe handling practices.
- 5) Do not use if the product or packaging appears to be damaged.
- 6) Follow standard precautions. All patient specimens should be considered potentially infectious and handled accordingly.
- 7) Handle all specimens as if infectious using safe laboratory procedures. Dispose of hazardous or biologically contaminated materials according to the practices of your institution.
- 8) Avoid cross-contamination of samples by using disposable tips and changing them after each sample.
- 9) Do not mix reagents of different batches. Please use the product within the validity period.
- 10) Do not eat, drink, smoke, apply cosmetics or handle contact lenses in areas where reagents and human specimens are handled
- 11) Results should be interpreted by a trained professional in conjunction with the patient's history and clinical signs and symptoms, and epidemiological risk factors.
- 12) Ensure laboratory equipment is calibrated and maintained in accordance with the laboratory's procedure.
- 13) When test results are transmitted from the laboratory to an informatics centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.

DISPOSAL OF WASTE

Disposal of waste must be carried out according to national and local regulations in force.

BIBLIOGRAPHY

See the references at the end of this document.

TABLE OF SYMBOLS

See the table of symbols at the end of this document.

The product is available in the various configurations listed below. There may be additional product ref. numbers as well. For an updated listing of available products, visit liofilchem.com

Product	Format	Packaging	Ref.
CLED Agar	Plate 90 mm	20 plates	10026
		100 plates	10026*
	Bottle	6 x 100 ml	402180
		6 x 200 ml	412180
		6 x 500 ml	470110
	Dehydrated media	100 g	620012
		500 g	610012
		5 kg	6100125

Revision History

Revision	Release Date	Change Summary
1	2023-11-08	Updated layout and content in compliance with IVDR 2017/746

This IFU document and the SDS are available from the online Support Center:

liofilchem.com/ifu-sds



CLED Agar

Terreno differenziale per la rilevazione di agenti patogeni urinari

USO PREVISTO

Terreno differenziale per l'isolamento, la conta e la differenziazione di batteri patogeni in campioni urinari. Il terreno è inteso come ausilio alla diagnosi, e sono necessari ulteriori test per completare i risultati diagnostici.

DESCRIZIONE

CLED Agar è un terreno utilizzato per l'analisi microbiologica delle urine in quanto supporta la crescita di tutti i potenziali patogeni urinari con buona differenziazione delle colonie e inibizione della sciamatura di *Proteus*.

FORMULA TIPICA*

(g/litro)

Digerito Enzimatico di Gelatina	4.0
Digerito Enzimatico di Caseina	4.0
Estratto di Manzo	3.0
Lattosio	10.0
L-Cistina	0.128
Blu di Bromotimolo	0.02
Agar	15.0
pH Finale 7.3 ± 0.2 a 25°C	

*Adattata e/o integrata per soddisfare le specifiche di performance richieste.

PRINCIPIO DEL METODO

Il digerito enzimatico di gelatina, il digerito enzimatico di caseina e l'estratto di manzo forniscono aminoacidi, azoto, carbonio, vitamine e minerali necessari per la crescita degli organismi. Il lattosio è il carboidrato fermentabile. La L-cistina è un integratore per la crescita degli organismi dipendenti dalla cistina. Il blu di bromotimolo è l'indicatore di pH che cambia colore dal verde al giallo quando la fermentazione del lattosio abbassa il pH. L'agar è l'agente solidificante. La mancanza di elettroliti sopprime la sciamatura delle specie *Proteus* e *Shigella*.

PREPARAZIONE

Terreno disidratato

Sospendere 36,1 g di polvere in 1 litro di acqua distillata. Mescolare bene. Portare ad ebollizione agitando spesso fino a completo scioglimento. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Terreno in flaconi

Sciogliere il contenuto di un flacone a bagnomaria a 100°C (con il tappo leggermente svitato) fino a completa dissoluzione del terreno. Verificare, una volta fuso, la buona omogeneità del terreno capovolgendo il flacone dopo averne avvitato il tappo. Raffreddare a $45-50^{\circ}\text{C}$, mescolare bene evitando la formazione di bolle. Versare in piastre Petri in condizioni di asepsi.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Forniture e apparecchiature microbiologiche standard come: autoclave, bagnomaria, piastre Petri sterili, provette, anse da inoculo, tamponi, incubatore, microrganismi per il controllo qualità.

CAMPIONI CLINICI

I campioni di urina devono essere prelevati prima della terapia antimicrobica (ove possibile) ed esaminati il prima possibile dopo la raccolta. Dovrebbero essere applicate buone pratiche di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici.

Fare riferimento alle linee guida specifiche per maggiori informazioni sulla raccolta e la preparazione dei campioni.

PROCEDURA DEL TEST

L'urina deve essere strisciata direttamente sulla superficie dell'agar entro e non oltre 2 ore dalla raccolta o deve essere conservata a $2-8^{\circ}\text{C}$ (non più di 24 ore) per evitare la proliferazione microbica. Utilizzare un'ansa calibrata (1 μl , 2 μl o 10 μl) per inoculare il terreno con il campione di urina non diluito e ben miscelato.

Incubare in aerobiosi a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 18-48 h. Per maggiori dettagli consultare le indicazioni appropriate.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Al termine dell'incubazione, contare le colonie sulla piastra.

Se si utilizza un'ansa da 1 μl , una colonia equivale a 1.000 CFU/ml (ovvero, 1×10^6 CFU/litro). Utilizzando un'ansa da 10 μl ogni colonia corrisponde a 100 CFU/ml di urina.

Osservare il colore e la morfologia delle colonie per l'identificazione presuntiva in accordo alla seguente tabella.

Microrganismo	Colonia tipica
<i>Escherichia coli</i>	Colonie gialle, opache
<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> spp.	Colonie da gialle a biancastre-blu, mucoidi
<i>Proteus</i> spp.	Colonie blu traslucide
<i>Salmonella</i> spp.	Colonie piatte, blu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonie Verdi, superficie opaca e periferia ruvida
<i>Enterococcus</i> spp.	Colonie gialle, circa 0.5 mm di diametro
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonie giallo intenso
Coagulase negative staphylococci	Colonie giallo pallido

Nota: Sono necessari ulteriori test per confermare l'identificazione presunta dei microrganismi isolati su questo terreno.

CONSERVAZIONE

La polvere è fortemente igroscopica, conservare la polvere a $10-30^\circ\text{C}$, in un ambiente asciutto, nel suo contenitore originale ben chiuso. Conservare i flaconi e le piastre preparate a $10-25^\circ\text{C}$ al riparo dalla luce. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata in etichetta o se il prodotto presenta segni di contaminazione o di deterioramento.

VALIDITÀ

Terreno disidratato: 4 anni.

Terreno in flaconi: 2 anni.

Piastre pronte all'uso: 6 mesi.

CONTROLLO QUALITÀ

Aspetto del terreno disidratato: Omogeneo, fine granulometria, verde pallido o paglierino.

Aspetto del terreno preparato: Leggermente opalescente, da verde a blu-verde.

Expected Cultural Response:

Ceppi di controllo		Inoculo	Incubazione	Criteri	Specifiche
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 29212	50-100 UFC	18-24 h / $35 \pm 2^\circ\text{C}$	Buona crescita ($P_R \geq 0.7$)	Colonie gialle
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922				Colonie gialle
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 12453				Colonie blu, nessuna sciamatura
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 25933				Colonie blu, nessuna sciamatura
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923				Colonie gialle

Un rapporto di produttività (P_R) di 0.7 è equivalente ad un tasso di recupero del 70%.

Fare riferimento al certificato di analisi (CoA) relativo al lotto effettivo.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

I test di performance per CLED Agar sono stati effettuati utilizzando i ceppi CQ sopra elencati. I risultati ottenuti hanno soddisfatto i criteri stabiliti.

LIMITAZIONI

Risultati non validi possono essere causati da una scarsa qualità del campione, da una raccolta impropria del campione, da un trasporto improprio, da un processamento improprio in laboratorio o da una limitazione della

tecnologia di analisi. L'operatore deve comprendere i principi delle procedure, compresi i limiti nelle prestazioni, prima delle singole operazioni per evitare potenziali errori.

A causa delle variazioni nutrizionali, alcuni ceppi potrebbero presentare una crescita scarsa o non riuscire a crescere su questo terreno.

Osservare le tecniche asettiche per la raccolta dei campioni di urina. L'urina deve essere seminata direttamente sul terreno entro e non oltre 2 ore dalla raccolta o deve essere conservata in frigorifero (non più di 24 ore) per evitare un'eccessiva crescita di agenti infettivi o qualsiasi contaminazione prima dell'inoculazione del terreno.

CLED Agar è inteso come ausilio nella diagnosi di malattie infettive, che richiedono ulteriori test per completare i risultati diagnostici. Tutti i test di identificazione dovrebbero idealmente essere eseguiti su agar non selettivo.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- 1) Per uso diagnostico in vitro (IVD).**
- 2) Solo per uso professionale di laboratorio.**
- 3) Gli operatori devono essere formati e avere una certa esperienza. Si prega di leggere attentamente le istruzioni prima di utilizzare il prodotto. L'affidabilità dei risultati del test non può essere garantita in caso di deviazioni dalle istruzioni contenute in questo documento.
- 4) Consultare la scheda di sicurezza (SDS) per informazioni sui pericoli e sulle pratiche di manipolazione sicure.
- 5) Non utilizzare se il prodotto o la confezione sembrano danneggiati.
- 6) Seguire le precauzioni standard. Tutti i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infetti e maneggiati di conseguenza.
- 7) Maneggiare tutti i campioni come infetti utilizzando procedure di laboratorio sicure. Smaltire materiali pericolosi o biologicamente contaminati secondo le pratiche del proprio istituto.
- 8) Evitare la contaminazione incrociata dei campioni utilizzando puntali monouso e sostituendole dopo ogni campione.
- 9) Non mescolare reagenti di lotti diversi. Si prega di utilizzare il prodotto entro il periodo di validità.
- 10) Non mangiare, bere, fumare, applicare cosmetici o maneggiare lenti a contatto nelle aree in cui vengono manipolati reagenti e campioni umani.
- 11) I risultati devono essere interpretati da un professionista qualificato insieme alla storia del paziente, ai segni e sintomi clinici e ai fattori di rischio epidemiologici.
- 12) Assicurarsi che le apparecchiature di laboratorio siano calibrate e mantenute in conformità con la procedura del laboratorio.
- 13) Quando i risultati dei test vengono trasmessi dal laboratorio a un centro informatico, è necessario prestare attenzione per evitare trasferimenti di dati errati.

SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

Lo smaltimento dei rifiuti deve essere effettuato in conformità alle normative nazionali e locali in vigore.

BIBLIOGRAFIA

Vedere i riferimenti alla fine di questo documento.

TABELLA DEI SIMBOLI

Vedere la tabella dei simboli alla fine di questo documento.

Il prodotto è disponibile in diverse configurazioni. Vedere l'elenco nella lingua inglese.












Questo documento IFU e la SDS sono disponibili dal Support Center online:

lioofilchem.com/ifu-sds

References / Riferimenti

1. Public Health England 2019 UK SMI B 41 (issue 8.7): investigation of urine.
https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/770688/B_41i8.7.pdf
2. EN ISO 11133:2014+Amd1:2018+Amd2:2020. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
3. CLSI 2004 Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard -Third Edition. CLSI document M22-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
4. Mackey J.P. and G.H. Sandys 1966 Diagnosis of urinary tract infections. Br. Med. J. 1:1173.
5. Sandys G.H. 1960 A new method for preventing swarming of *Proteus* spp. with a description of a new medium suitable for use in routine laboratory practice. J. Med. Lab. Technol. 17:224.

Table of Symbols / Tabella dei Simboli

	Batch code / Codice lotto
	Catalogue number / Numero di catalogo
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device / Dispositivo Medico Diagnostico <i>in vitro</i>
	Manufacturer / Fabbrikante
	Use by / Utilizzare entro
	Fragile, handle with care / Fragile, maneggiare con cura
	Temperature limitation / Limiti di temperatura
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi
	Consult instructions for use / Consultare le istruzioni per l'uso
	Do not reuse / Non riutilizzare
	Keep away from sunlight / Tenere al riparo dalla luce solare



Liofilchem® s.r.l.

Via Scozia, 64026 Roseto degli Abruzzi (TE) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330

www.liofilchem.com

liofilchem@liofilchem.com

