

Finalidade:

Meio de cultura nutritivo, não seletivo e diferencial destinado a cultura de urina. Este meio de cultura promove o crescimento de agentes patogênicos e contaminantes urinários e reduz a formação de *swarming* (véu) de espécies de *Proteus* spp., devido a baixa concentração de eletrólitos.

Registro ANVISA:

10097010-137

Apresentação:

530125 - CLED-AGAR-FR 100mL
540177 - CLED-AGAR-20mL-PL 90X15-PC 10PL
540205 - BIPLACA-CLED-AGAR-2X10mL-10PL

LB 172069
Rev. 07 – 07/2022

1. INTRODUÇÃO

Em 1960, Sandys referiu o desenvolvimento de um novo método para evitar a proliferação de *Proteus* spp. em meios sólidos, limitando os eletrólitos no meio de cultura que foi posteriormente modificado para ser utilizado em culturas de urina. Este meio foi designado como meio de cistina lactose deficiente em eletrólitos (CLED) e demonstrou ser ideal para técnicas de imersão do inóculo e para a bacteriologia urinária em geral. Os nutrientes contidos no meio CLED são fornecidos pelas peptonas de caseínas e gelatina e extrato de carne bovina. A lactose foi incluída para fornecer uma fonte de energia para os organismos com capacidade para utilizá-la através de um mecanismo fermentativo. É utilizado o azul de bromotimol como um indicador de pH para diferenciar os fermentadores da lactose dos não fermentadores da lactose. Os organismos que fermentam a lactose irão reduzir o pH e alterar a cor do meio de verde para amarelo. As fontes de eletrólitos são reduzidas para minimizar a proliferação de espécies de *Proteus* spp. (o "véu" que tende a se sobrepor sobre outros microrganismos). Deste modo, o meio permite a determinação quantitativa de agentes patogênicos urinários incluindo o *Proteus* spp., quando são utilizadas alças calibradas para inoculação.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/L
Hidrolisado pancreático de gelatina	4,0
Extrato de carne bovina	3,0
Hidrolisado pancreático de caseína	4,0
Lactose	10,0
L-Cistina	0,128
Azul de Bromotimol	0,02
Ágar Base	15,0
Água deionizada	1L
pH 7,3 ±0,2 a 25°C	

A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho do produto.

3. AMOSTRA

a- Tipos de amostras

A amostra deve ser coletada impreterivelmente antes do início de qualquer terapia antimicrobiana para que o exame tenha real significado clínico.

A urina de jato médio é o tipo de amostra mais comum, também sendo possível a realização do exame com amostras de cateterismo vesical, sonda de alívio, punção suprapúbica, urina de primeiro jato ou qualquer jato.

Em lactentes, em que não se consegue coletar através do jato médio, pode-se usar o saco coletor, porém a troca deve ser realizada a cada 30 a 45 minutos e, ao trocar o coletor, refazer a assepsia.

- Preparo do paciente

Para urina de jato médio, deve ser coletada preferencialmente a primeira urina da manhã, podendo, quando necessário, retê-la por 2

a 4 horas. Deve ser realizada higienização prévia da região genital com água e sabão ou clorexidina aquosa a 2%. Desprezar o primeiro jato, coletando o jato médio em pote estéril e com boca larga, sem interromper a micção até a metade do frasco. O restante da micção deve ser desprezado. Orientar o paciente não toque acidentalmente nas bordas do frasco, ou a critério médico. Após a coleta, fechar o frasco e levar imediatamente ao laboratório.

- Armazenamento e estabilidade da amostra

As amostras de urina podem ser transportadas a temperatura ambiente (20 a 25°C), devendo ser processadas em até 2 horas. Caso não seja possível o processamento neste tempo, podem ser refrigeradas (2 a 8°C) e processadas em até 24 horas.

- Critérios de rejeição

Este produto se destina a semeadura primária de amostras de urina. Rejeitar as amostras coletadas em recipientes inapropriados ou que contenham sujidades visíveis (principalmente no caso de coleta realizada em crianças). Igualmente urinas contaminadas por fluxo menstrual devem ser rejeitadas.

O laboratório deve estabelecer critérios de coleta, rejeição e conservação das amostras, conforme sua política da qualidade. Sugere-se que não sejam aceitos materiais clínicos com tempo de coleta superior a 24 horas, particularmente de urina para o isolamento de micobactérias, devido a possível contaminação do material, mesmo conservados sob refrigeração.

b- Precauções e cuidados especiais

- Produto destinado ao uso diagnóstico *in vitro*;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado.
- Antes de descartar o material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Para acondicionamento do material usado, recomendamos o uso do Detrilab.

4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

a- Princípio

Os nutrientes no ágar Cled são fornecidos por peptonas, hidrolisado pancreático, caseína e extrato de carne bovina. A lactose está incluída como fonte de energia para organismos capazes de utilizá-la por um mecanismo fermentativo. O azul de bromotimol é usado como indicador de pH para diferenciar os bacilos gram negativos capazes ou não de fermentar a lactose. Microrganismos que fermentam a lactose reduzirão pH, causando mudança do meio verde para amarelo. As fontes de eletrólitos são reduzidas para restringir a formação de *swarming* das espécies de *Proteus*.

b- Armazenamento e estabilidade

Para fins de transporte, o produto pode permanecer em temperatura ambiente por até 72h. No laboratório as placas devem ser armazenadas em temperatura de 2 a 25°C, condições em que se mantém estáveis até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação de qualquer natureza. O uso de refrigerador tipo *frost-free* não é recomendado para meios de cultura devido ao efeito desidratante deste tipo de equipamento.

Considerando que este produto é gelatinoso e sua composição pode apresentar até 80% de água, ao sofrer variações de temperatura (quente-frio ou frio-quente) todo meio de cultura pode gerar condensação, de pouca a muita, acumulando água na placa. Recomenda-se guardar as placas com os meios de cultura virados para cima e, quando necessário, desprezar a água acumulada e deixar o meio de cultura estabilizar a temperatura antes de sua utilização.

Conforme descrito em literatura, o laboratório deve retirar da refrigeração apenas a quantidade de produto que deverá ser utilizada em sua rotina e deixar estabilizar a temperatura, ou secar a água condensada, antes de sua utilização, em temperatura ambiente, podendo utilizar a incubação em estufa ($\pm 35^{\circ}\text{C}$) para redução do tempo de secagem ou estabilização. A repetição do processo de refrigeração/estabilização não é recomendada, a constante troca de temperatura pode levar a desidratação do meio, expor o produto a contaminações ou gerar um acúmulo de água excessivo.

A água acumulada por condensação, ocasionada por alguma variação de temperatura, não influencia no desempenho do produto, desde que este não apresente ressecamento ou diminuição de espessura.

Devido a presença de substratos sensíveis, recomenda-se manter o produto protegido de incidência direta de luz (natural ou artificial) e evitar grandes variações de temperatura até a utilização.

d- Precauções e cuidados especiais

- O produto destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não utilizar placas com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para "Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A" para o manuseio seguro;
- O procedimento de descarte do produto se baseia na RDC 222 (ANVISA) de 28 de março de 2018, que regulamenta as boas práticas de gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde.
- Para acondicionamento do material a ser autoclavado, recomendamos o uso dos sacos para autoclavagem - Detrilab.
- Contate o serviço de vigilância sanitária de sua região para garantir o cumprimento correto da legislação de descarte de produtos potencialmente contaminantes.

5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Estufa bacteriológica;
- Alças bacteriológicas;
- Bico de Bunsen;
- Placas de Petri estéreis (para uso com o frasco de 100 mL);
- Banho-Maria (para uso com o frasco de 100 mL).

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

Placas prontas para uso:

- a- Retirar o pacote da refrigeração e, em ambiente asséptico, separar as placas a serem usadas, devolvendo o restante ao refrigerador;
- b- Colocar as placas em estufa bacteriológica entre 35-37°C pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura, ou deixar estabilizar/secar em temperatura ambiente;
- c- Usando procedimentos adequados, proceder a inoculação do material diretamente na superfície do meio;
- d- Incubar o material em estufa bacteriológica entre 35-37°C por 18-24h;
- e- Após a incubação, avaliar o padrão de crescimento, aspectos morfológicos e a fermentação ou não da lactose;
- f- Devido a exigências especiais, alguns microrganismos podem necessitar de um período maior de incubação, se não ocorrer o

crescimento nas primeiras 24 horas, ou caso o crescimento apresentado não seja o suficiente, incubar o material em estufa bacteriológica entre 35-37°C, por mais 18-24h;

g- Após o total desenvolvimento das colônias, proceder com os processos de identificação conforme estabelecido em seu laboratório;

h- A avaliação microscópica de colorações de Gram da amostra e, se necessário da colônia analisada, pode elucidar dúvidas e oferecer um melhor direcionamento para o processo de identificação.

Meio em frascos com 100 mL:

- a- Levantar o frasco ao banho-maria fervente até obter a liquefação do meio (sem ferver o meio);
- b- Distribuir de forma asséptica todo o conteúdo do frasco nas placas de Petri estéreis (20 mL por placa 90x15 mm diâmetro);
- c- Submeter as placas ao controle de esterilidade e qualidade;
- d- As placas após preparadas terão sua validade estabelecida pelo usuário, e podem ser usadas conforme procedimento descrito no item "Placas prontas para uso".

7. RESULTADOS

Relatório

- Não houve crescimento:

"Ausência de crescimento microbiano na amostra analisada após 24/48h de incubação a 35°C";

- Havendo crescimento:

"Nome do microrganismo (indicar bactéria identificada) Contagem de colônias (indicar resultado) UFC/mL". (apenas quando aplicável).

Morfologias típicas das colônias em ágar CLED:

Microrganismo	Características
<i>Escherichia coli</i>	Em geral, colônias amarelas, meio pode ficar amarelo, dimensão grande.
<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i>	Maioria das vezes se apresenta mucóide, colônias amarelas a azuis esbranquiçadas, meio assume tonalidade amarela no entorno das colônias dimensão grande.
<i>Proteus spp.</i> , <i>Morganella spp.</i> , <i>Providencia spp.</i>	Colônias incolores a azuladas, a proliferação em torno de colônias isoladas é inibida total ou parcialmente (swarming), dimensão grande.
<i>Enterococcus spp.</i>	Colônias amarelas, aspecto seco, meio amarelado no entorno das colônias, dimensão pequena.
<i>Pseudomonas spp.</i>	Colônias irregulares, verde a cinza, superfície plana a achatada, dimensão variável.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colônias amarelas, normalmente, escuras, meio amarelado no entorno das colônias, dimensão média
Estafilococos coagulase negativa	Colônias amarelas pálidas, mais opacas que o <i>Enterococcus faecalis</i> , aspecto seco, dimensão de pequena a média.
<i>Streptococcus spp.</i>	Colônias incolores, habitualmente brilhantes e úmidas, dimensão pequena.
Outros microrganismos Gram negativos	Habitualmente incolores a levemente brancas, muitas vezes mucóides, dimensão e bordas variáveis.
<i>Candida spp.</i>	Colônias brancas, redondas, de opaca a brilhante, côncavas, dimensão grande.
Outros Fungos	Colônias com características, formas e dimensões variáveis conforme gênero e espécie.

Os bacilos gram negativos são direcionados a identificação inicialmente com base na fermentação ou não da glicose. Na rotina laboratorial a diferenciação inicial pode utilizar características da colônia para decisão do processo de identificação, juntamente com o teste de oxidase. A utilização do Sistema BacTray, kit de enterobactérias ou provas bioquímicas (TSI, LIA, SIM, MIO) é necessária para a conclusão da identificação do microrganismo. Para microrganismos gram positivos, sugere-se avaliação microscópica e testes de identificação de gênero e, quando necessário, espécie, conforme orientado em literatura.

Para análises com presença de fungos, recomendamos nova sementeira em meios específicos (agar Candida cromogênico, agar Sabouraud, agar Micobiotic, ...) para o correto isolamento.

- Contaminação cruzada por uso de acessórios não esterilizados corretamente ou ambiente não asséptico

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 36/2015)

- A utilização de corantes na formulação pode acarretar leve foto sensibilidade, recomenda-se proteger o produto da incidência direta da luz.

- Meios de cultura apresentam grande quantidade de água em sua formulação, deste modo, variações de temperatura devem ocasionar a condensação e, conseqüentemente, o acúmulo de água na placa. O cuidado com o acondicionamento e exposição do meio a estas variações de temperatura são fundamentais para a manutenção da qualidade do produto.

- Algumas variações de coloração na colônia, morfologia ou tamanho podem ocorrer, devido a características únicas da cepa analisada.

- A presença de mais de uma variante genética intrínseca a cepa analisada, pode interferir nas características de crescimento. É possível que características únicas ou mutadas da cepa possam interferir no desempenho do meio de cultura afetando ou retardando o total desenvolvimento das colônias.

- Inóculos com excesso de carga bacteriana podem interferir na avaliação de resultados.

- A presença de mais de um microrganismo na amostra pode ocasionar sobreposição de colônias na superfície do meio de cultura, dificultando sua identificação, para estes casos, recomenda-se o isolamento das colônias diferentes, mantendo a contagem da placa inicial.

- A qualidade dos resultados de análises microbiológicas é intimamente ligada à qualidade da amostra, as melhores práticas pré-analíticas, como cuidados extremos com a assepsia do processo ou paciente, garantem um melhor resultado.

- Alguns microrganismos fastidiosos ou anaeróbios, gram-negativos ou não, não apresentam crescimento neste meio de cultura (*Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium* spp., *Legionella* spp., *Bordetella* spp. por exemplo). Para a recuperação destas espécies, utilizar meios de cultura apropriados.

- As cepas de *Streptococcus* spp. e outros microrganismos que precisam de sangue para se desenvolver poderão apresentar crescimento retardado ou insuficiente neste meio de cultura, podendo necessitar uma incubação prolongada ou ser submetido a sementeira em ágar sangue.

- Embora as características das colônias sugiram a possibilidade de serem realizados alguns testes de diagnóstico diretamente neste meio de cultura, é indispensável a realização de testes bioquímicos para uma completa identificação de gênero e espécie e, se indicado, a realização de testes imunológicos usando culturas puras. Consultar a bibliografia apropriada para mais informações.

- Os resultados falso-negativos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Técnica de coleta inadequada
- Incubação em temperatura inadequada
- Uso de antimicrobiano prévio
- Utilização de alça flambada não resfriada
- Tempo de incubação insuficiente
- Infecção crônica (infecção pouco ativa)
- Armazenamento ou transporte de amostra inadequado
- Agentes etiológicos exigentes com relação aos meios de cultura
- Necessidade de meios especiais para o crescimento de um agente infeccioso específico

- Os resultados falso-positivos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Técnica de assepsia inadequada
- Erro na conservação do material
- Tempo longo entre a coleta e análise
- Tempo excessivo de incubação
- Interpretação equivocada de colônias não patogênicas
- Utilização de material vencido, contaminado ou em condições inadequadas

9. CONTROLE DA QUALIDADE

- *Materiais necessários*

Cepas padrão: ATCC® (*American Type Culture Collection*) ou derivadas).

- Controle de qualidade recomendado:

Cepas	Resultado esperado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crescimento bom – Lactose positiva – Colônias amarelas
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	Crescimento bom – Lactose negativa – Colônias azuis translúcidas, com inibição do <i>swarming</i>
Meio não inoculado	Meio sólido levemente opaco, com coloração esverdeada, livre de precipitados ou partículas visíveis.

- *Periodicidade*

Testar a cada novo lote recebido ou em periodicidade estabelecida pelo próprio laboratório.

- *Análise dos resultados*

As cepas inoculadas no material devem apresentar características de crescimento esperados. Caso se constate algum problema ou diferença, os resultados de amostras clínicas não devem ser liberados até que as causas tenham sido apuradas devidamente e os problemas constatados sanados.

- Este produto apresenta sensibilidade e especificidade $\geq 98\%$ frente aos principais microrganismos não fastidiosos.

Microrganismo	Sensibilidade % (Intervalo de confiança de 95%)	Especificidade % (Intervalo de confiança de 95%)
<i>Escherichia coli</i>	293/295 99,3% (97,9 – 100%)	317/317 100,0% (99,1 – 100%)
<i>Proteus mirabilis</i>	187/188 99,5% (98,6 – 100%)	317/317 100,0% (99,1 – 100%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	202/206 98,1% (97,4 – 99,9%)	297/298 99,7% (98,9 – 100%)

10. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário:

- que o usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;

- que os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;

- que os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site www.laborclin.com.br. Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail sac@laborclin.com.br. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

11. REFERÊNCIAS

1. Association of Official Analytical Chemists. 1995. Bacteriological analytical manual, 8th ed., App. 3.08-3.09. AOAC International, Gaithersburg, MD.
2. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
3. Chapin, K.C., and T.-L. Lauderdale. 2003. Reagents, stains, and media: 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.
4. 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.
5. Difco Manual, 2^o ed., 2009.
6. Ellner, P.D., C.J. Stoessel, E. Drakeford, and F. Vasi. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. Am. J. Clin. Pathol. 45: 502-504.
7. Farmer III, J.J. 2003. Enterobacteriaceae: introduction and identification. 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.
8. Isenberg, H. D. (ed.). 1992. Interpretation of aerobic bacterial growth on primary culture media, Clinical microbiology procedures handbook, vol.1, p. 1.6.1-1.6.7. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Koneman, Elmer; *et al.* Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 6 ed., 2010.
10. Levine, M., and H.W. Schoenlein. 1930. A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
11. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
12. 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.
13. Mackey, J.P., and G.H. Sandys. 1966. Diagnosis of urinary infections. Br. Med. J. 1:1173.
14. Mahon, Connie, Manuseles, George Jr. Diagnostic Microbiology. Saunders, USA, 1995.
15. Murray, P.R. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 7th ed, American Society for Microbiology 1999.
16. 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.
17. 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.
18. Silva, de Neusely; *et al.* Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água, 4^o ed., 2010.
19. 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.












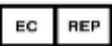
















Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda

CNPJ 76.619.113/0001-31
Insc. Estadual 1370012926
Rua Casimiro de Abreu, 521
Pinhais/PR CEP 83.321-210
Telefone 041 36619000
www.laborclin.com.br

Responsável Técnico:

Daniela Fialho – CRF/PR-37492
Serviço de Assessoria ao Cliente
SAC 0800-0410027
sac@laborclin.com.br

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Europeia.
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando oxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso
	Controle		Controle negativo
	Controle positivo		Manter seco
	Manter afastado de luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho de IVD
	Não reutilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Segunda edição (28.07.2015)