



ANVÄNDNINGSPROSEDUR

UREA AGAR BAS (CHRISTENSEN) UREA 40 % SOLUTION

Dehydrerat odlingsmedium och supplement



Urea Agar

Från vänster: *E. coli* urease -, *Proteus* sp. urease+**1 – AVSEDD ANVÄNDNING**

In vitro-diagnostik. Basmedium och ureasupplement för differentiering av mikroorganismer på grundval av ureasaktivitet.

2 – TYPISK SAMMANSÄTTNING**UREA AGAR BASE**

(EFTER REKONSTITUERING MED 1 LITER VATTEN) *

Pepton	1,000 g
Glukos	1,000 g
Natriumklorid	5,000 g
Kaliumdivätefosfat	2,000 g
Fenolrött	0,012 g
Agar	12,000 g

* Formeln kan justeras och/eller kompletteras för att uppfylla de prestandakriterier som krävs.

UREA 40% SOLUTION (INNEHÅLL I FLASKA)

	REF 42211601	REF 4240096
Urea	20 g	2 g
Renat vatten	50 ml	5 ml

3 – METODENS PRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Ureaagarbasen framställs enligt Christensens¹ modifiering av Rustigian och Stuarts formel² och enligt den formulering som rekommenderas i ISO 6579³ och FDA BAM⁴. Ureas-testet används för att fastställa en organisms förmåga att dela upp urea genom produktion av enzymet ureas. Två enheter ammoniak bildas med resulterande alkalinitet i närvaro av enzymet, och det ökade pH-värdet påvisas genom att pH-indikatorn ändrar färg från gul (pH 6,8) till ljusrosa (pH 8,1).^{5,6} Tillsatsen av pepton och glukos och minskningen av fosfatbuffertkoncentrationen i Christensens formulering gör det möjligt att skilja mellan snabba (1–6 timmar) ureaspositiva organismer (*Proteae*) och fördröjda (24 timmar–6 dagar) ureaspositiva bakterier (vissa *Klebsiella*-, *Enterobacter*- och *Citrobacter*stammar) och andra bakterier än Enterobacteriaceae (t.ex. vissa *Bordetella*- och *Brucella*-arter).⁵ Testet kan användas för att skilja mellan jästsvamparna *Candida albicans* och *Cryptococcus neoformans*: en presumtiv identifiering av *C. neoformans* baseras på snabb ureasproduktion, medan *C. albicans* inte producerar ureas.⁶

Ureas-testet med ureaagar är ett av de tester som rekommenderas av ISO 6579³ för identifiering av *Salmonella* spp.

Pepton ger de viktigaste beståndsdelarna för mikrobiell tillväxt; glukos är en energikälla och möjliggör snabb mikrobiell tillväxt och eliminerar eventuella falskt negativa reaktioner; kaliumdivätefosfat i en koncentration på 0,2 %, lägre än i Stuart-formuleringen, gör det möjligt att påvisa små mängder alkali. Natriumklorid upprätthåller den osmotiska balansen i mediet och fenolrött är en pH-indikator.

4 – ANVISNINGAR FÖR BEREDNING AV MEDIUM

Lös upp 21 g i 950 ml kallt renat vatten. Värm upp till kokning med frekvent omrörning, sterilisera genom autoklivering vid 121 °C i 15 minuter. Kyl ner till cirka 47–50 °C och tillsätt, under aseptiska förhållanden, 50 ml 40 % Solution av urinämne (REF 42211601). Blanda väl och fördela det kompletta mediet i mängder om 10 ml i sterila rör. Kyl i snett läge (lång sned/kort stöt).

5 – FYSISKA EGENSKAPER**Urea Agar Base (Christensen)**

Utseende på dehydratiserat medium

Utseende av lösningen och de preparerade rören

Slutligt pH vid 20–25 °C

Urea 40 % lösning

Utseende på lösningen

rosaaktigt, fint, homogent, fritt flytande pulver

rosa-orange, klar

6,8 ± 0,2

färglös, klar

6 – MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING

Produkt	Typ	REF	Förpackning
Urea Agar Base (Christensen)	Dehydrerat medium	4021752	500 g (23,8 L)
Urea 40 % lösning	Flytande supplement	42211601 4240096	50 ml 10 x 5 ml





7 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS

Autoklav, vattenbad, sterila ögilor, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, Erlenmeyer-kolvar, rör med skruvlock, kompletterande odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonierna.

8 – PROVER

Urea Agar får inte användas för direkt inokulering av kliniska prover. Proverna består av isolat från renkultur som har odlats på fast medium.

9 – TESTFÖRFARANDE

Inokulera lutningen kraftigt (från en 18-24 timmars renodlad kultur) över hela ytan genom att strecka agarytan. Stryk inte rumpan; den tjänar som färgkontroll.

Inkubera det inokulerade röret med löst lock vid 35–37 °C och observera mediets färgförändring till rödviolett efter 2, 4, 6, 18, 24 timmar och dagligen under en total inkubationstid på 6 dagar.

Metod som rekommenderas enligt ISO 6579³: stryk ut över agarytan och inkubera vid 34–38 °C i upp till 24 timmar. En positiv reaktionen är ofta tydlig efter 2 till 4 timmar.

10 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubation observerar du färgförändringen i mediet. Ett positivt test (hydrolys av urea) indikeras av en rosa (fuchsia) färg på slanten som kan sträcka sig in i kolven. Varje grad av rosa anses vara en positiv reaktion.⁶

Färgningen visar hur snabbt hydrolysen av urea sker⁵:

- Starkt positiv: hela röret är rosa
- Positiv: rosa lutning, ingen förändring i änden
- Svagt positiv: toppen av den snedställda delen är rosa, resten är oförändrat
- Negativa resultat: ingen färgförändring i agarslant (t.ex. *Salmonella* spp.)

När det gäller utvecklingstiden för den rosa alkaliska reaktionen kan vissa mikrobiella kategorier observeras:

- Snabbt positiv: 1–6 timmar för alla positiva *Proteae*-mikroorganismer (*Proteus* spp., *Morganella morganii* och vissa *Providencia stuartii*-stammar).
- Fördröjda positiva organismer (t.ex. *Klebsiella* eller *Enterobacter*) ger vanligtvis en svag positiv reaktion på slanten efter 6 timmar, men reaktionen intensifieras och sprids till rumpan vid förlängd inkubation (upp till 6 dagar).⁵⁻⁶
- För andra bakterier än *Enterobacteriaceae* (t.ex. *Bordetella*- och *Brucella*-arter, jäst) bör den inokulerade slanten inkuberas ytterligare i upp till 4–6 dagar innan den anses vara negativ.^{5,6}

När testet har registrerats som positivt ska rören kasseras utan att inkubationen förlängs.

11 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av produkterna släpps för försäljning efter att kvalitetskontrollen har utförts för att kontrollera att specifikationerna uppfylls. Det är dock slutanvändarens ansvar att utföra kvalitetskontrolltester i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskrav och laboratoriets erfarenhet. Här nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontrollen.

Ureaspositiv kontroll: *P. vulgaris* ATCC 9484

Ureasnegativ kontroll: *E. coli* ATCC 25922

Inkubation: 35 ± 37 °C i 18–24 timmar

ATCC är ett varumärke som tillhör American Type Culture Collection

12 – PRESTANDAEGENSKAPER

Innan produkten släpps ut till försäljning testas ett representativt prov av alla partier av dehydratiserad Urea Agar Base kompletterad med 50 ml/L Urea 40 % Solution för att kontrollera prestanda och jämföra resultaten med ett tidigare godkänt referensparti. Rena kolonier odlade på Tryptone Soy Agar av fyra snabba ureaspositiva stammar (*P. mirabilis* ATCC 12453, *P. vulgaris* ATCC 9484, *P. rettgeri* ATCC 39944 och ett kliniskt isolat av *P. morganii*), 2 fördröjda ureaspositiva stammar (*K. pneumoniae* ATCC 27736 och *C. freundii* ATCC 43864) och 2 ureasnegativa stammar (*E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028,) inokuleras genom att man sprutar ut dem på den lutande ytan. Efter inkubation vid 35–37 °C i 2–6 och 24–48 timmar aerobt observeras och registreras färgförändringen till rosa. Alla stammar uppvisar en reaktivitet enligt specifikationerna.

13 – METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Urea-testet bygger på alkalisering av kulturmediet och är därför inte specifikt för enzymet ureas. Utnyttjandet av peptoner, särskilt i slutningen, t.ex. av *P. aeruginosa*, kan höja pH-värdet till alkalinitet, vilket leder till falskt positiva reaktioner. För att eliminera eventuella falska positiva reaktioner, gör ett kontrolltest med samma stam och testmedium utan urea.⁵
- Ureaspositiva *Proteus* spp. orsakar en snabb alkalisering av mediet. För att resultaten skall vara giltiga för detektion av *Proteae* måste resultaten avläsas inom de första 2–6 timmarna av inkubationen. *C. freundii* och *K. pneumoniae* omvandlar Urea Agar inom 24–48 timmar. Detta medium upptäcker snabb ureasaktivitet endast hos ureaspositiva *Proteae*.⁵
- Imputera inte Urea Agar slopes med kulturer som erhållits från flytande medier.
- Långa inkubationer kan ge upphov till falskt positivt resultat på grund av autolys av urea. Om en lång inkubation förväntas, inkubera även ett oinokulerat rör för att kontrollera förekomsten av autolys av urea.
- Även om mikroorganismkolonierna differentieras på basis av ureahydrolys rekommenderas att biokemiska, immunologiska, molekylära eller masspektrometriska tester utförs på isolat från ren odling för fullständig identifiering. Om det är relevant, utför test av antimikrobiell känslighet.
- Odlingsmediet och supplementet är avsedda som ett hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar; tolkningen av resultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten av andra diagnostiska tester.

14 – FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

- Mediumbasen och supplementet är kvalitativa *in vitro*-diagnostiska produkter, endast avsedda för professionellt bruk. De ska användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal, som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- Mediumbasen och supplementen ska användas tillsammans i enlighet med beskrivna anvisningar.
- Dehydrerade medier och supplement måste hanteras med lämpligt skydd. Konsultera säkerhetsdatabladet före användning.





- Detta odlingsmedium innehåller råmaterial av animaliskt ursprung. Kontroller av djuren *före* och *efter slakt* samt under produktions- och distributionscykeln för råvarorna kan inte helt garantera att produkten inte innehåller några överförbara patogener. Det rekommenderas därför att kulturmediet behandlas som potentiellt smittsamt och hanteras med iakttagande av de vanliga särskilda försiktighetsåtgärderna: förtär inte, andas inte in och undvik kontakt med hud, ögon eller slemhinnor. Ladda ner TSE Statement från webbplatsen www.biolifeitaliana.it, som beskriver de åtgärder som Biolife Italiana har vidtagit för att minska riskerna i samband med smittsamma djursjukdomar.
- Tillämpa god tillverkningsssed vid beredningen av rörmedier.
- Ureasupplementet steriliseras genom membranfiltrering.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar såsom mediepulver och supplement eller mikrobiella agens.
- Sterilisera allt biologiskt riskavfall innan det kasseras. Kassera oanvänt medium och supplement samt de inokulerade plattorna med prover eller mikrobiella stammar i enlighet med gällande lokal lagstiftning.
- Använd inte odlingsmediet och supplementen som aktiva ingredienser i farmaceutiska preparat eller som produktionsmaterial avsett för konsumtion av människor och djur.
- Analyscertifikaten och säkerhetsdatabladet finns tillgängliga på webbplatsen www.biolifeitaliana.it.
- Meddela Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) och berörda myndigheter om allvarliga incidenter som inträffar i samband med användningen av *in vitro*-diagnostiken.
- Informationen i detta dokument har definierats efter bästa kunskap och förmåga och utgör en riktlinje för korrekt användning av produkten men utan förpliktelse eller ansvar. I alla fall måste gällande lokala lagar, förordningar och standardförfaranden följas vid undersökning av prover som tagits från mänskliga och djurska organ, miljöprover och produkter avsedda för konsumtion av människor eller djur. Vår information befriar inte våra kunder från deras ansvar att kontrollera att våra produkter är lämpliga för det avsedda ändamålet.

15 – FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

Dehydrerat medium: efter mottagandet, förvara vid +10 °C /+30 °C på en torr plats, skyddad från direkt ljus. Vid korrekt förvaring kan produkten användas fram till utgångsdatum. Använd inte produkten efter detta datum. Undvik att öppna flaskan på fuktiga platser. Efter användning måste behållaren stängas ordentligt. Kassera produkten om behållaren och/eller locket är skadat, om behållaren inte är ordentligt försluten eller om pulvret uppvisar tydliga tecken på försämring (färgförändringar, hårdning, stora klumpar).

UREASUPPLEMENT : EFTER MOTTAGANDET förvaras produkten i originalförpackningen vid +2 °C /+8 °C, bort från direkt ljus. Om produkten förvaras på rätt sätt kan den användas fram till utgångsdatumet som anges på etiketten. Använd inte produkten efter detta datum. När flaskan har öppnats ska lösningen användas omedelbart. Innan användning ska produkt en kontrolleras och produkten kasseras om det finns tydliga tecken på försämring (t.ex. kontaminering, onormal färg eller andra onormala egenskaper).

Användaren är ansvarig för tillverkningen och kvalitetskontrollen av de beredda medierna och för valideringen av deras hållbarhetstid, i enlighet med den förvaringsmetod som används (temperatur och förpackning).

16 – REFERENSER

1. Christensen WB. J Bact 1946; 52:461-466
2. Stuart CA, Von Stratum E, Rustigian R. J Bact 1945; 48:437
3. ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp. — Amendment 1: Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC
4. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: *Salmonella*. Rev 07/2020
5. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985..
6. Public Health England. UK Standards for Microbiology Investigations. Urease test. TP 36, Issue n° 4, 04/2019.

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

 REF Katalognummer	eller RFF	 LOT Batch-kod	 IVD Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> ...	 Tillverkare	 Den här ..	 Förvaras torrt
 Temperaturbegrensning		 Innehållet räcker till <n> tester	 Se bruksanvisningen	 Använd senast	 Ömtåligt	 Förvara skyddat från direkt ljus

REVIDERINGSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringarna	Datum
Revidering 2	Uppdaterad layout och innehåll	2020/09
Revidering 3	Uppdatering av "försiktighetsåtgärder och varningar" och "förvaringsförhållanden och hållbarhet"	2022/02
Revidering 4	Borttagning av föråldrad klassificering, förtydligande om inokulerings- och avläsningsmetoder	2023/04

Anmärkning: mindre typografiska, grammatiska och formateringsändringar inkluderas inte i granskningshistoriken.

