

**ANVÄNDNINGSANVISNING****UREA 40 % SOLUTION****Flytande tillskott****1 - AVSEDD ANVÄNDNING**

In vitro-diagnostik. Urea-lösning, tillsatt till Urea Broth Base eller Urea Agar Base, används för bestämning av ureasenzymet som ett hjälpmedel för differentiering av mikroorganismer.

2 – SAMMANSÄTTNING – FLASKANS INNEHÅLL

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

3 - METODENS PRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Urea 40 %-lösning används som tillskott till urea buljongbas eller urea agarbas. Det kompletta mediet urea-buljong överensstämmer med Rustigians och Stuarts formulering.^{1,2} Det kompletta mediet urea-agar överensstämmer med Christensens² modifiering av Rustigians och Stuarts^{1,2} formel och med den formulering som rekommenderas av ISO 6579⁴ och FDA BAM⁵

Båda medierna är avsedda för bestämning av ureasenzymet (ureaamidohydrolas) som ett hjälpmedel för differentiering av medlemmar av *Enterobacteriaceae* (ureabuillon) och *Enterobacteriaceae* och andra mikroorganismer (ureage)^{6,7}

Ureas-testet med urea-agar är ett av de test som rekommenderas av ISO 6579⁴ för identifiering av *Salmonella* spp.

Urea, som tillsätts till basmediet, hydrolyseras av mikroorganismerna med bildning av ammoniumjoner och efterföljande alkalisk reaktion som inducerar fenolröda färgförändring när mediets pH överstiger 8,1.⁶

4- ANVISNINGAR

Bered 950 ml urea-buljongbas (Stuart), REF 402180 eller 950 ml urea-agarbas (Christensen), REF 402175, autoklavera och kyl till 47–50 °C. Under aseptiska förhållanden tillsätt 50 ml urea 40 %-lösning (REF 42211601 eller 4240096).

Färdig urea-buljong: blanda väl och fördela mediet i mängder om 3–5 ml i sterila rör under aseptiska förhållanden.

Komplett ureaagar: blanda väl och håll mediet i mängder om 10 ml i sterila rör under aseptiska förhållanden. Kyl i lutande läge (lång lutning/kort botten).

5 - FYSISKA EGENSKAPER

Lösningens utseende färglös, klar

6 - MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING

Produkt	Typ	REF	Förpackning
Urea 40 % Solution	Flytande tillskott	42211601	50 ml
		4240096	10 x 5 ml

7 - MATERIAL SOM KRÄVS MEN SOM INTE MEDFÖLJER

Urea Broth Base (REF 402180), Urea Agar Base (REF 402175) autoklav, vattenbad, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, sterila öglor och svabbprover, sterila rör, Erlenmeyerkolvar, kompletterande odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonierna.

8 – PROVER

Urea-buljong och urea-agar, kompletterade med urea-lösning, får inte användas för direkt inokulering av kliniska prover. Proverna består av isolat från ren odling på fast medium.

9 – TESTFÖRFARANDE**Ureabuillon**

Inokulera buljongen rikligt med 3 slingor (2 mm slinga) från en 18-24 timmars ren odling erhållen på TSI eller annat lämpligt medium. Skaka röret försiktigt för att suspendera kolonierna. Inkubera rören med luckade lock vid 35–37 °C i en inkubator eller ett vattenbad i 8–48 timmar. Undersök buljongen för färgförändringar efter 2, 4, 6, 18, 24 och 48 timmars inkubation.

Ureaagar

Inokulera slutningen kraftigt (från en 18–24 timmars ren odling) över hela ytan genom att stryka ytan på agaren. Stick inte i botten, den fungerar som färgkontroll.

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

Metod rekommenderad av ISO 6579⁴ : stryka agarens lutande yta och inkubera vid 34–38 °C i upp till 24 timmar. Den positiva reaktionen är ofta tydlig efter 2 till 4 timmar.

10 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubation observeras färgförändringen hos mediet.

Positivt testresultat (ureahydrolysis) indikeras av en ljusrosa (fuchsia) färg.

Negativt test indikeras av oförändrad färg på mediet (t.ex. *Salmonella* spp.).

Se även användningsinformationen för urea-buljongbas (REF 402180) och urea-agarbas (REF 402175).

11 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av produkten släpps ut för försäljning efter att kvalitetskontroll har utförts för att kontrollera att specifikationerna uppfylls. Slut användaren kan dock utföra egna kvalitetskontroller i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskrav och laboratoriets erfarenhet. Nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontroll.⁷





Ureaspositiv kontroll: *P. vulgaris* ATCC 9484

Ureasnegativ kontroll: *E. coli* ATCC 25922

A: aerob inkubation; ATCC är ett varumärke som tillhör American Type Culture Collection

12 - PRESTANDAEGENSKAPER

Innan produkten släpps ut på marknaden testas ett representativt prov av alla partier av urea 40 %-lösning tillsatt till dehydrerad urea-buljongbas (REF 402180) och urea-agarbas med avseende på prestandaegenskaper genom att resultaten jämförs med en tidigare godkänd referensbatch med följande stammar. Urea-agar: *P. mirabilis* ATCC 10005, *P. stuardi* ATCC 33672, *P. rettgeri* ATCC 39944, *K. pneumoniae* ATCC 27736 och *E. coli* ATCC 25922; Ureaagar: *P. morgani* CB 118, *P. vulgaris* ATCC 9484, *K. pneumoniae* ATCC 27736, *S. Typhimurium* ATCC 14028. Färgförändring av mediet observeras efter 2, 6, 24, 48 timmars inkubation vid 35-37 °C. Ureaspositiva stammar i ureabouillon: *P. mirabilis*, *P. stuardi*, *P. rettgeri*; ureaspositiva stammar i ureaegel: *P. morgani*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae* ATCC 27736.

13 - METODENS BEGRÄNSNINGAR

Urea-buljong

- Urea-buljong är ett starkt buffrat medium som kräver stora mängder ammoniak för att höja pH-värdet till 8,1, vilket resulterar i en färgförändring. Långsamma och svagt ureaspositiva stammar, på grund av den låga koncentrationen av jästextrakt och ett starkt buffertsystem, framträder som ureanegativa på urea-buljong (Stuart).^{6,7}
- En purpurröd färgförändring inträffar när pH-värdet når 8,1. Inokulering påverkar avsevärt den tid som bakterie stammen behöver för att utveckla dessa alkalinitetsvärden och därmed en positiv reaktion.⁶
- Ureasreaktionens hastighet påverkas också av volymen av flytande medium i röret; Stuart et al.¹ rapporterar att med ökande volymer på 1,5 ml, 3 ml, 4,5 ml, 6 ml, för samma inokulum, ökar tiden för utveckling av den positiva reaktionen och att den minsta volymen för testet är 1,5 ml.
- Urea Broth-rör är inte lämpliga för kvantitativ utvärdering av ureahydrolys.

Ureaagar

- Ureaprovningsen baseras på alkaliseringen av odlingsmediet och är därför inte specifik för ureasenzymet. Användningen av peptoner, särskilt på slutningen, till exempel av *P. aeruginosa*, kan höja pH-värdet till alkalitet, vilket resulterar i falskt positiva reaktioner. För att eliminera möjliga falskt positiva resultat, utför ett kontrolltest med samma stam och testmediet utan urea.⁶
- Ureaspositiva *Proteus* spp. orsakar en snabb alkalisering av mediet. För att resultaten ska vara giltiga för detektion av *Proteae* måste resultaten avläsas inom de första 2–6 timmarna av inkubationen. *C. freundii* och *K. pneumoniae* omvandlar ureaagar inom 24–48 timmar. Detta medium detekterar endast snabb ureaseaktivitet hos urease-positiva *Proteae*.⁶
- Inokulera inte ureaagar-slutningar med odlingar som erhållits från flytande medier.
- Långvarig inkubation kan ge upphov till falskt positiva resultat på grund av ureautolys. Om lång inkubation förväntas, inkubera även ett oinokulerat rör för att verifiera förekomsten av ureautolys.
- 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 relevant, utför antimikrobiell känslighetstestning.
- Odlingsmediet och tillskottet är avsedda som ett hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar. Tolkingen av resultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten av andra diagnostiska tester.

14 - FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

- Tillägget är ett kvalitativt *in vitro*-diagnostiskt medel, endast avsett för professionellt bruk. Det måste användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal, som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- Tillsatsen är inte klassificerad som farlig enligt gällande europeisk lagstiftning.
- Tillägget och mediet ska användas tillsammans enligt anvisningarna ovan. Tillämpa god tillverkningssed vid framställningen av beredda medier.
- Tillsatsen steriliseras genom membranfiltrering.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar såsom mediumpulver och tillskott eller mikrobiella agens.
- Sterilisera allt biologiskt farligt avfall före bortskaffande. Bortskaffa oanvända tillskott och steriliserade medier som inokulerats med prover eller mikrobiella stammar i enlighet med gällande lokal lagstiftning.
- Använd inte tillskottet som aktiva ingredienser i farmaceutiska preparat eller som produktionsmaterial avsett för konsumtion av människor och djur.
- Analyscertifikaten och säkerhetsdatabladet för produkten 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 sammanställts efter bästa kunskap och förmåga och utgör en riktlinje för korrekt användning av produkten, men utan skyldighet eller ansvar. I alla fall måste gällande lokala lagar, förordningar och standardförfaranden följas vid undersökning av prover som samlats in från mänskliga och djuriska organiska distrikt, för miljöprover och för produkter avsedda för konsumtion av människor eller djur. Vår information befriar inte våra kunder från deras ansvar att kontrollera att vår produkt är lämplig för det avsedda ändamålet.

15 – FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

Vid mottagandet ska produkten förvaras i originalförpackningen vid 2–8 °C och skyddas från direkt ljus. Om produkten förvaras på rätt sätt kan den användas fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Använd inte produkten efter detta datum. När flaskan har öppnats ska lösningen användas omedelbart. Kontrollera lösningen före användning och kassera den om det finns tydliga tecken på försämring (t.ex. kontaminering, onormal färg eller andra onormala egenskaper).

Användaren ansvarar för tillverknings- och kvalitetskontrollprocesserna för beredda medier och valideringen av deras hållbarhetstid, i enlighet med de tillämpade förvaringsförhållandena (temperatur och förpackning).



**16 - REFERENSER**

1. Rustigian R, Stuart CA. Decomposition of urea by *Proteus*. Proc Soc Exp Biol Med. 1941; 47:108-112
2. Stuart CA, Van Stratum E, Rustigian R. Further Studies on Urease Production by *Proteus* and Related Organisms. J Bact 1945; 48:437
3. Christensen WB. Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. J Bact 1946; 52:461-466
4. 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
5. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: *Salmonella*. Rev 07/2020
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins;
7. Public Health England. UK Standards for Microbiology Investigations. Urease test. TP 36, Issue n° 4, 04/2019

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

REF eller REF Katalognummer	LOT Batchkod	IVD In vitro- diagnostisk medicintek nisk	Tillverkare	Denna sida	
Temperaturbeg ränsning	Innehåll som räcker till <n> tester	Se bruksanvisni ngen	Använd före	Förvaras skyddat från direkt ljus	Omtåligt

REVISIONSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringar	Datum
Revision 1	Uppdaterad layout och innehåll	2022/03
Revision 2	Borttagande av föråldrad klassificering, förtydligande av inokulations- och avläsningsmetoder	2023/04

Obs: mindre typografiska, grammatiska och formateringsändringar ingår inte i revisionshistoriken.

