



ISTRUZIONI PER L'USO

UREA AGAR BASE (CHRISTENSEN) UREA 40% SOLUTION

Terreno di coltura in polvere e supplemento liquido



Urea Agar
Da sinistra *E. coli* ureasi-, *Proteus* sp. ureasi+

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Terreno di base e supplemento urea per la differenziazione dei microrganismi sulla base della produzione dell'enzima ureasi.

2 - COMPOSIZIONE**UREA AGAR BASE (CHRISTENSEN)****FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA)***

Peptone	1,000 g
Glucosio	1,000 g
Sodio cloruro	5,000 g
Potassio fosfato monobasico	2,000 g
Rosso fenolo	0,012 g
Agar	12,00 g

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

UREA 40% SOLUTION (CONTENUTO DEL FLACONE)

	REF 42211601	REF 4240096
Urea	20 g	2 g
Acqua purificata q.b.	50 mL	5 mL

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Urea Agar Base è preparato in accordo alla modificazione di Christensen¹ della formula di Rustigian e Stuart² ed alla formulazione indicata da ISO 6579³ e FDA BAM⁴. Il test dell'ureasi viene utilizzato per determinare la capacità dei microrganismi di idrolizzare la molecola dell'urea, con la formazione di due moli di ammoniaca e conseguente viraggio del terreno all'alcalinità; l'aumento del pH viene rilevato dal cambiamento di colore dell'indicatore di pH da giallo (pH 6.8) a rosa brillante (pH 8.1).^{5,6}

L'aggiunta del peptone di carne e del glucosio e la riduzione della concentrazione del tampone fosfato della formulazione di Christensen, rendono il terreno utilizzabile non solo per la determinazione dell'enzima ureasi sulle colture delle specie che idrolizzano rapidamente l'urea (*Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, alcuni ceppi di *Providencia stuartii*), ma anche su quelle di altri microrganismi che idrolizzano più lentamente e più lievemente l'urea (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e batteri non appartenenti alle *Enterobacteriaceae*, es. alcune specie dei generi *Bordetella* e *Brucella* spp.). Questo test può essere utilizzato anche per la differenziazione tra i lieviti, di *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*: *C. neoformans* idrolizza rapidamente l'urea, mentre *C. albicans* è negativa al test.⁶

Il test dell'ureasi con Urea Agar è uno dei test raccomandati dalla norma ISO 6579³ per l'identificazione di *Salmonella* spp.

Il peptone fornisce gli elementi essenziali per la crescita microbica; il glucosio è una fonte di energia e consente una rapida crescita microbica e riduce l'incidenza di falsi negativi; il potassio fosfato monobasico alla concentrazione 0,2% rappresenta un sistema tampone più blando rispetto alla formulazione di Stuart e consente l'evidenziazione anche di piccole quantità di ioni ammonio prodotti; il sodio cloruro mantiene l'equilibrio osmotico del terreno, il rosso fenolo è un indicatore di pH.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 21 g di polvere in 950 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed aggiungere 50 mL di Urea 40% Solution (REF 42211601). Mescolare e distribuire 10 mL in provette sterili. Lasciare solidificare a becco di clarino (lungo becco ed un corto fondo).

5 - CARATTERISTICHE FISICHE**Urea Agar Base (Christensen)**

Aspetto della polvere
Aspetto del terreno in soluzione ed in provetta
pH (20-25°C)

Fine granulometria omogenea, rosata
rosa-arancio, limpido.
6,8 ± 0,2

Urea 40% Solution

Aspetto della soluzione

limpida incolore

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Urea Agar Base (Christensen)	Terreno di coltura in polvere	4021752	500 g (23,8 L)
Urea 40% Solution	Supplemento liquido	42211601 4240096	50 mL 10 x 5 mL





7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, provette, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

8 - CAMPIONI

Urea Agar non deve essere utilizzato per la semina diretta di campioni clinici. Il campione è costituito da colture pure di batteri isolati da campioni clinici o altri materiali.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Inoculare abbondantemente il becco di clarino (da una coltura pura di 18-24 ore) strisciando su tutta la superficie dell'agar. Non inoculare il fondo per infissione che servirà come controllo del colore.

Incubare le provette con i tappi allentati a 35-37°C ed osservare il cambiamento di colore del terreno dopo 2, 4, 6, 18, 24 ore e giornalmente per un tempo di incubazione totale di 6 giorni.

Procedura in accordo alla norma ISO 6579³: strisciare la superficie inclinata dell'agar ed incubare a 37°C fino a 24 h. La reazione positiva è spesso evidente dopo 2-4 ore.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare il colore del terreno. Il test positivo (idrolisi dell'urea) è indicato dallo sviluppo di colore rosa acceso (fucsia) sul clarino e che può estendersi anche nel fondo; qualsiasi tonalità di rosa è considerata come una reazione positiva. L'intensità del colore indica il tasso di idrolisi dell'urea:

- Reazione fortemente positiva: tutto il terreno vira al rosa (becco e fondo).
 - Reazione positiva: colore rosa sul becco di clarino e nessun viraggio nel fondo.
 - Reazione debolmente positiva: colore rosa solo sull'estremità superiore del clarino.
- Il test negativo (nessuna idrolisi dell'urea) è indicato dall'assenza di viraggio al rosa del terreno (es. *Salmonella* spp.).
- Riguardo ai tempi di sviluppo della reazione alcalina si osservano alcune categorie microbiche:
- Reazione positiva rapida, entro le 6 ore di incubazione: *Proteae* (*Proteus* spp., *Morganella morganii* e alcuni ceppi di *P. stuartii*)
 - Gli organismi con positività ritardata (Es. *Klebsiella* o *Enterobacter*) produrranno in genere una debole reazione positiva sul becco dopo 6 ore, ma la reazione si intensificherà e si diffonderà al fondo con un'incubazione prolungata (fino a 6 giorni).⁵⁻⁶
 - Per microrganismi diversi dalle *Enterobacteriaceae* (ad esempio *Bordetella*, *Brucella*, lieviti) il terreno inoculato deve essere incubato per 4-6 giorni prima di riportare il test come negativo.^{5,6}

Una volta che il test è stato registrato come positivo, eliminare le provette senza prolungare l'incubazione.

11 - CONTROLLO DI 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.

Controllo ureasi positivo: *P. vulgaris* ATCC 9484

Controllo ureasi negativo: *E. coli* ATCC 25922

Incubazione a 37°C per 24 h

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di terreno in polvere Urea Agar Base (Christensen), addizionato di 50 mL/L di Urea 40% Solution, viene testato per le caratteristiche prestazionali, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

Colonie pure coltivate su Tryptic Soy Agar di 4 ceppi che idrolizzano rapidamente l'urea (*P. mirabilis* ATCC 12453, *P. vulgaris* ATCC 9484, *P. rettgeri* ATCC 39944 e *P. morganii* d'isolamento clinico), 2 ceppi che idrolizzano lentamente l'urea (*K. pneumoniae* ATCC 27736 e *C. freundii* ATCC 43864) e 2 ceppi ureasi negativi (*S. Typhimurium* ATCC 14028 ed *E. coli* ATCC 25922) vengono inoculati per striscio sulla superficie del terreno in piastra. Dopo incubazione a 35-37°C per 2-6 ore e per 18-24 ore in aerobiosi, viene osservato il viraggio del colore del terreno. Tutti i ceppi mostrano una reattività secondo le specifiche.

13 - LIMITI DEL METODO

- Il test dell'urea è basato sulla alcalinizzazione del terreno di coltura e quindi non è specifico per l'enzima ureasi. L'utilizzo dei peptoni, soprattutto sul becco del clarino, per esempio da parte di *P. aeruginosa*, induce un aumento del pH e può portare a falsi positivi. Per questa ragione è consigliabile inoculare con il medesimo ceppo in esame anche una provetta con il terreno non addizionato di urea.
- *Proteus* spp. ureasi positivi inducono una alcalinizzazione rapida del terreno. Per considerare validi i risultati con i protei, la lettura deve essere fatta entro le 6 ore di incubazione. I ceppi ureasi positivi di *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* idrolizzano l'urea in 24-48 ore o più. Quindi questo terreno può essere impiegato come test rapido per l'ureasi solo per *Proteus* spp.
- Per facilitare la crescita microbica e l'utilizzo dell'urea non inoculare partendo da una crescita in brodo.
- Incubazioni prolungate potrebbero dare luogo a falsi positivi per fenomeni di autolisi dell'urea; quando si prevede una lunga incubazione, incubare anche una provetta non inoculata per verificare il fenomeno dell'idrolisi spontanea dell'urea.
- L'identificazione completa dei microrganismi esaminati sul terreno deve essere effettuata con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno 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 dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.

14- PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti sono diagnostici *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti devono essere usati congiuntamente in accordo al metodo di preparazione indicato.





- I terreni in polvere ed i supplementi devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime 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 di sicurezza 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in provetta.
- Il supplemento qui descritto è sottoposto a sterilizzazione con membrana filtrante.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura, supplemento o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno di base ed il supplemento non utilizzati ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti qui descritti sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- 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.

15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Terreno in polvere: conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Supplemento Urea: conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta; non utilizzare oltre questa data. Una volta aperto il flacone la soluzione deve essere usata immediatamente. Esaminare il prodotto e scartare se vi fossero segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione del terreno e della validazione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

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 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
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.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Lato superiore	Proteggere dall'umidità
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	09/2020
Revisione 6	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	02/2022
Revisione 7	Rimozione della classificazione obsoleta, precisazioni su metodo di semina e lettura	06/2023

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

