

ISTRUZIONI PER L'USO

UREA BROTH BASE (STUART)

UREA 40% SOLUTION

Terreno di coltura in polvere e supplemento liquido



Urea Broth – da sinistra:
provetta non inocolata, *P.vulgaris*, *E.coli*

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostici *in vitro*. Terreno di base e supplemento urea per la determinazione dell'enzima ureasi, quale ausilio per la differenziazione dei membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

2 - COMPOSIZIONE
UREA BROTH BASE (STUART) REF 4021802
FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA)*

Estratto di lievito	0,10 g
Potassio fosfato monobasico	9,10 g
Sodio fosfato bibasico	9,50 g
Rosso fenolo	0,01 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 Broth Base, preparato in accordo alla formulazione di Rustigian e Stuart¹, è un terreno per la determinazione dell'enzima ureasi (urea amididrolasi), quale ausilio per la differenziazione dei membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Il terreno fornisce risultati positivi anche per *Proteus* spp., per la maggior parte delle specie *Morganella* e per alcuni ceppi di *Providencia stuartii*.² Urea Broth è impiegato soprattutto per differenziare *Proteus* spp. (ureasi positivo) da *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (ureasi negative) e da altri enterobatteri che idrolizzano lentamente l'urea e risultano negativi su questo terreno.

L'estratto di lievito a basse concentrazioni (0,01%) fornisce gli elementi essenziali richiesti per la crescita dei ceppi di *Proteus* fortemente produttori di ureasi e che utilizzano gli ioni ammonio prodotti dall'idrolisi dell'urea come unica fonte di azoto; gli enterobatteri che idrolizzano lentamente l'urea possono fare affidamento per la crescita solo sulla limitata concentrazione di estratto di lievito e quindi risultano negativi al test dell'urea su questo terreno. Inoltre il forte sistema tampone tende a ridurre le variazioni di pH in presenza di bassi livelli di produzione di ioni ammonio.³

L'urea, addizionata al terreno di base, è idrolizzata dai microrganismi con la formazione di ioni ammonio e conseguente reazione alcalina che induce il viraggio al rosso-viola del rosso fenolo quando il pH del terreno supera il valore di 8,1.³

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 18,7 g di polvere in 950 mL di acqua purificata fredda. Sciogliere il terreno sotto agitazione scaldando se necessario; autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed aggiungere 50 mL di una soluzione di urea al 40% sterilizzata per filtrazione (REF 42211601). Distribuire in provette con le precauzioni dell'asepsi.

5 - CARATTERISTICHE FISICHE
Urea Broth Base (Stuart)

Aspetto della polvere

Fine granulometria omogenea, rosata

Aspetto del terreno in soluzione ed in provetta

arancio, limpido.

pH (20-25°C)

6,8 ± 0,1

Urea 40% Solution

Aspetto della soluzione

limpida incolore

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Urea Broth Base (Stuart)	Terreno di coltura in polvere	4021802	500 g (26, 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 Broth Base (Stuart) addizionato di Urea 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 da altri materiali.





9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Inoculare pesantemente il brodo con tre ansate di crescita batterica in coltura pura del ceppo in esame ottenuta su TSI o altro terreno appropriato. Agitare lievemente il brodo per sospendere bene l'inoculo. Incubare con i tappi allentati a 35-37°C in bagnomaria o termostato ed osservare il viraggio del colore del terreno al rosso-viola dopo 2, 4, 6, 18, 24, 48 ore.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare il colore del terreno.

Il test positivo (idrolisi dell'urea) è indicato da un intenso sviluppo di colore rosso-viola nel brodo.

Il test negativo è indicato dal colore non modificato del brodo.

Proteus spp. inducono una alcalinizzazione rapida del terreno. *P. vulgaris* e *P. mirabilis* risultano positivi dopo circa 8 ore di incubazione, *P. rettgeri* dopo circa 12 ore; *M. morganii* può richiedere fino a 36 ore di incubazione e se vi fossero dubbi interpretativi comparare il colore con una provetta non inocolata o incubare per ulteriori 24 ore.

Comunque entro 48 ore di incubazione questi ceppi svilupperanno una reazione positiva.²

I batteri con una modesta e ritardata attività ureasica (ad es. *Enterobacter*) non risulteranno positivi al test dell'ureasi a causa dell'elevata capacità tampone del terreno.

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 Broth Base (Stuart), 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 10005, *P. vulgaris* ATCC 9484, *P. rettgeri* ATCC 39944 e *P. morganii* d'isolamento clinico), 3 ceppi che idrolizzano lentamente l'urea (*K. pneumoniae* ATCC 27736, *E. aerogenes* ATCC 13048 e *C. freundii* ATCC 8090) e 4 ceppi ureasi negativi (*S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. flexnei* ATCC 12022, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 14027) vengono inoculati nel terreno in provetta. Il viraggio del colore del terreno viene osservato dopo 6, 24, 48 ore di incubazione a 35-37°C: solo i 4 ceppi di *Proteus* sviluppano una reazione positiva per l'ureasi.

13 - LIMITI DEL METODO

- Urea Broth un mezzo altamente tamponato che richiede grandi quantità di ammoniaca per aumentare il pH a 8,1 con conseguente cambiamento di colore. I ceppi lentamente e debolmente ureasi positivi, a causa della bassa concentrazione di estratto di lievito e di un sistema tampone energetico, appaiono come negativi all'ureasi su Urea Broth (Stuart).^{2,3}
- Il viraggio al rosso-viola si realizza quando il pH raggiunge il valore di 8,1; l'inoculo influenza in modo significativo il tempo richiesto dal ceppo batterico per sviluppare tali valori di alcalinità e quindi una reazione positiva.³
- La velocità di reazione dell'ureasi è influenzata anche dal volume del terreno liquido in provetta; Stuart e coll.¹ riportano che con volumi crescenti di 1,5 ml, 3 ml, 4,5 ml, 6 ml, a parità di inoculo, crescono i tempi dello sviluppo della reazione positiva e che il volume minimo per il test è 1,5 ml.
- Le provette di Urea Broth non sono idonee per una valutazione quantitativa dell'idrolisi dell'urea.
- Le crescite microbiche anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura 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 di altri test diagnostici.
- Il terreno ed il supplemento qui descritti sono 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. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- I terreni in polvere ed i supplementi devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza.
- 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 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 liquido: dopo il ricevimento, 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 se vi fossero segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

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

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Rustigian R, Stuart A. Decomposition of urea by *Proteus*. Proc Soc Exp Biol Med. 1941; 47:108-112
2. Public Health England. UK Standards for Microbiology Investigations. Urease test. TP 36, Issue n° 4, 04/2019
3. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985..

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o 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 2	Aggiornamento del contenuto e del layout	02/2022
Revisione 3	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

