

**ISTRUZIONI PER L'USO****UREA 40% SOLUTION**
Supplemento liquido**1- DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostico *in vitro*. La soluzione di urea, aggiunta ai terreni Urea Broth Base o Urea Agar Base, viene utilizzata per la determinazione dell'enzima ureasi come ausilio per la differenziazione dei microrganismi.

2 - COMPOSIZIONE - CONTENUTO DEL FLACONE

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Urea 40% Solution è utilizzato come supplemento di Urea Broth Base o Urea Agar Base. Il terreno completo Urea Broth è conforme alla formulazione di Rustigian e Stuart.^{1,2} Il terreno completo Urea Agar è conforme alla modifica di Christensen³ della formula di Rustigian e Stuart^{1,2} e alla formulazione raccomandata da ISO 6579⁴ e FDA BAM⁵.

Entrambi i terreni sono destinati alla determinazione dell'enzima ureasi (urea amidoidrolasi), come ausilio per la differenziazione dei membri delle *Enterobacteriaceae* (Urea Broth) e delle *Enterobacteriaceae* e di altri microrganismi (Urea Agar)^{6,7}.

L'urea, aggiunta al terreno di base, viene idrolizzata dai microrganismi con formazione di ioni ammonio e successiva reazione alcalina che induce il viraggio al rosso porpora del rosso fenolo quando il pH del mezzo supera 8.1.⁶

4- METODO DI PREPARAZIONE

Preparare 950 mL di Urea Broth Base (Stuart), REF 402180 o 950 mL di Urea Agar Base (Christensen), REF 402175, sterilizzati in autoclave e raffreddati a 47-50°C. In condizioni asettiche aggiungere 50 mL di Urea 40% Solution (REF 42211601 o 4240096).

Urea Broth completo: mescolare bene e dispensare il terreno in quantità di 3-5 mL in provette sterili, in condizioni asettiche.

Urea Agar completo: mescolare bene e dispensare il terreno in quantità di 10 mL in provette sterili in condizioni asettiche. Raffreddare in posizione obliqua (clarino lunga/fondo corto).

5- CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della soluzione incolore limpida

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Urea 40% Solution	Supplemento liquido	42211601	50 mL
		4240096	10 x 5 mL

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Urea Broth Base (REF 402180), Urea Agar Base (REF 402175), autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, provette sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

8 - CAMPIONI

Urea Broth Base ed Urea Agar Base, addizionati con soluzione di urea, non devono essere utilizzati per l'inoculazione diretta di campioni clinici. I campioni sono costituiti da microrganismi isolati in coltura pura, cresciute su terreno solido.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI**Urea Broth**

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.

Urea Agar

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 incubazione, osservare il cambiamento di colore del terreno.

Il test positivo (idrolisi dell'urea) è indicato dallo sviluppo di un colore rosa brillante (fucsia).

Il test negativo è indicato dal colore inalterato del terreno (es. *Salmonella* spp.).

Consultare anche le Informazioni per l'Uso di Urea Broth Base (REF 402180) e Urea Agar Base (REF 402175).

11 - CONTROLLO QUALITA' 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

A: aerobiosi; 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 Urea 40% Solution aggiunta al terreno Urea Broth Base (REF 402180) e Urea Agar Base (REF 402175) viene testato per le caratteristiche prestazionali confrontando i risultati con un Lotto di Riferimento precedentemente approvato. Ceppi testati con Urea Broth: *P. mirabilis* ATCC 10005, *P. stuarti* ATCC 33672, *P. rettgeri* ATCC 39944, *K. pneumoniae* ATCC 27736, *E. coli* ATCC 25926; ceppi testati con Urea Agar: *P. morgani* CB 118, *P. vulgaris* ATCC 9484, *K. pneumoniae* ATCC 27736, *S. Typhimurium* ATCC 14028. La variazione di colore è osservata dopo 2, 6, 24, 48 ore di incubazione a 35-37°C. Ceppi ureasi positivi in Urea Broth: *P. mirabilis*, *P. stuarti*, *P. rettgeri*; ceppi ureasi positivi in Urea Agar: *P. morgani*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*.

13 - LIMITI DEL METODO

Urea Broth

- Urea Broth è 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).^{6,7}
- 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.⁶
- 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.

Urea Agar

- 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.⁶
- 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.⁶
- 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 inocolata per verificare il fenomeno dell'idrolisi spontanea dell'urea.
- Anche se le colonie microbiche sono differenziate sulla base dell'idrolisi dell'urea, si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sui ceppi isolati in coltura pura, per una completa identificazione. Se pertinente, eseguire test di sensibilità antimicrobica.
- 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

- Urea 40% Solution è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Urea 40% Solution ed il terreno di base devono essere usati in associazione secondo le indicazioni sopra descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Urea 40% Solution è sottoposto a sterilizzazione con membrana filtrante.
- Porre molta attenzione nell'apertura della ghiera metallica per evitare lesioni.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il supplemento, i terreni di coltura e con gli agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione; smaltire il supplemento non utilizzato ed i terreni di coltura seminati con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare Urea 40% Solution come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano e animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto 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

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°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 della correttezza del ciclo di produzione e di controllo dei terreni preparati in provetta e della validazione della loro shelf life, in funzione delle condizioni di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 – BIBLIOGRAFIA

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

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Lato superiore	
 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 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2022
Revisione 4	Rimozione della classificazione obsoleta, precisazioni su metodo di semina e lettura	04/2023

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

