

ISTRUZIONI PER L'USO

UREA AGAR

Provette pronte all'uso


Urea Agar

 Da sinistra: *E. coli* ureasi neg. e *Proteus sp.* ureasi pos.

1 - DESTINAZIONE D'USO

 Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno per la differenziazione dei microrganismi per mezzo del test dell'ureasi.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

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
Urea 40% solution	50 mL
Acqua purificata	950 mL

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

 Urea Agar 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 8.2).^{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.⁹

 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 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

 Aspetto del terreno in provetta
 pH (20-25°C)

 rosa-arancio, limpido.
 6,8 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Urea Agar	Provette pronte all'uso	552175	20 provette di vetro 17x125 mm, con fondo piatto e tappo a vite; terreno a becco di clarino. Confezionamento in scatola di cartone.

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - 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.

8 - 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 microorganismi 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 6-48 ore

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 provette pronte all'uso e delle materie prime impiegate per la loro produzione (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 24-48 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

- Il terreno qui descritto 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.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali 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 d'uso specifiche per i prodotti 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.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- La singola provetta del prodotto qui descritto è monouso.
- Fare attenzione quando si aprono le provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Urea Agar Base viene sterilizzato in autoclave e le provette vengono riempite con il terreno addizionato di urea, sterilizzata per filtrazione in condizioni di asepsi; le provette non possono essere considerate un "prodotto sterile", ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti delle specifiche definite riportate sul Certificato di Controllo Qualità.
- Sterilizzare le provette dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le provette non utilizzate e le provette seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- 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.

14 - 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 le provette oltre la data di scadenza. Dopo l'apertura della scatola, le provette possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere utilizzate immediatamente. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare le provette se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, colore alterato).

15 - 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	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Non riutilizzare	Imballaggio riciclabile 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
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	06/2021
Istruzioni per l'Uso (IFU)-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.

