

**ISTRUZIONI PER L'USO****ChromArt****CHROMOGENIC URINE AGAR IV**

Terreno di coltura in polvere



ChromArt Chromogenic Urine Agar IV: *E.coli* (colonie rosa-magenta),
K.pneumoniae (colonie blu intenso), *Enterococcus* sp. (colonie blu
turchese), *S.aureus* (colonie bianche), *Proteus* sp. (colonie marroni)

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Terreno cromogeno per l'isolamento, il conteggio e l'identificazione presuntiva dei principali microrganismi del tratto urinario.

2 - COMPOSIZIONE**FORMULATIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA) ***

Peptoni e fattori di crescita	24,0 g
Miscela cromogena	0,4 g
Composto opacizzante	6,2 g
Agar	15,0 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Negli ultimi 25 anni, i terreni di coltura cromogenici hanno trovato applicazione diffusa nella microbiologia clinica diagnostica. Biolife nel 1997 ha proposto un mezzo cromogenico e fluorogenico per la diagnosi delle infezioni del tratto urinario chiamato Chromogenic Urine Agar, nel quale la differenziazione batterica era ottenuta con la determinazione della β -glucuronidasi, della β -glucosidasi e della β -xilosidasi. Questo primo terreno cromogeno è stato oggetto di miglioramenti successivi nel corso degli anni con lo sviluppo di terreni di nuova generazione. L'ultimo proposto da Biolife per la batteriologia urinaria è il Chromogenic Urine IV, terreno cromogeno destinato all'isolamento, all'enumerazione e all'identificazione rapida presuntiva degli agenti patogeni del tratto urinario come *E.coli*, *Enterobacter-Klebsiella-Serratia* - (KES), *Proteus-Morganella-Providencia*, enterococchi, stafilococchi, lieviti.

La differenziazione tra i diversi generi e specie microbiche è ottenuta con l'inserimento nel terreno di coltura di:

- Un substrato cromogeno sul quale agisce la β -galattosidasi (GAL) con il rilascio di un metabolita insolubile di colore rosa.
- Un substrato cromogeno sul quale agisce la β -glucosidasi (GLU) con il rilascio di un metabolita insolubile di colore verde blu.
- Triptofano, per evidenziare l'enzima triptofano deaminasi (TDA) ed utile per l'esecuzione del test rapido dell'indolo

I ceppi che producono la sola β -galattosidasi, come *E.coli* coltivano con colonie rosa-magenta, i ceppi che producono la sola β -glucosidasi, come gli enterococchi formano colonie da verde a blu turchese; i batteri del gruppo *Klebsiella/Enterobacter/Serratia* (KES), producono entrambi gli enzimi, β -glucosidasi e β -galattosidasi e formano colonie da blu intenso a blu-violetto. Il triptofano, presente nel terreno, è deaminato grazie all'enzima triptofano deaminasi da *Proteus-Morganella-Providencia* con formazione di colonie marroni con alone marrone. *E.coli* può essere confermato con il test dell'indolo con l'aggiunta alle colonie di una goccia di Reattivo di Kovacs (il reattivo vira al rosso in caso di positività).

Il terreno ha le seguenti caratteristiche: ottima fertilità grazie ad una base nutritiva preparata con peptoni selezionati e standardizzati ed agenti detossificanti, concentrazione dell'agar ottimizzata al fine di impedire la sciamatura e l'invasività delle colonie, lettura dei colori delle colonie facilitata dalla scelta di un fondo di contrasto originale, opaco di colore grigio.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sciogliere 45,6 g in 1000 ml di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Mantenendo il terreno in agitazione, raffreddare a circa 47°C-50°C e distribuire in piastre Petri. Il terreno si presenta di colore grigio, omogeneamente opaco. Conservare le piastre per non più di 10 giorni. Per conservazioni più prolungate, raffreddare il terreno a 47-50°C ed aggiungere 20 ml di siero di cavallo sterile prima della distribuzione in piastra.

5 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, grigia
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	grigio opaco
pH finale a 20-25 °C	7,2 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chromogenic Urine Agar IV CND: W0104010101; EDMA:14.01.01.01; RDM: 1858125/R	Terreno in polvere	409810G2	500 g (10,9 L)

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie, siero di cavallo.



**8 – CAMPIONI**

Chromogenic Urine Agar IV (CUA IV) è destinato all'esame microbiologico di campioni clinici come l'urina. Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici.^{1,2}

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno. Mescolare delicatamente l'urina per evitare la formazione di schiuma. Immergere l'estremità dell'ansa sterile (ad es. 1µL o 10µL) nell'urina appena sotto la superficie e rimuoverla verticalmente, facendo attenzione a non trasportare il campione sull'asta dell'ansa. Strisciare l'ansa dall'alto verso il basso con una linea verticale e di nuovo dall'alto verso il basso perpendicolarmente a questa linea. Disperdere l'inoculo in modo omogeneo su tutta la superficie dell'agar per semplificare il conteggio delle colonie dopo la crescita. Incubare a 35-37 °C in aerobiosi ed osservare dopo 18-24 e 48 ore.

Sebbene la maggior parte dei microrganismi coltivati entro le 24 ore di incubazione, vi possono essere nel campione microrganismi a crescita lenta o la presenza di antibiotici che inibisce la crescita (es. streptococchi) durante l'incubazione "overnight". Le urinocolture che risultano negative dopo le 24 ore dovrebbero essere sottoposte al test della leucocito-esterasi ed al test dei nitriti. In caso di positività ad uno o ad entrambi i test, re-incubare per 24 ore aggiuntive e/o seminare il campione su piastre di agar-sangue.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, contare le colonie sviluppate sulla piastra (UFC) e registrarne ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica. Se viene utilizzata un'ansa da 1µL, una colonia equivale a 1000 UFC/mL nel campione, se viene utilizzato un'ansa da 10µL, una colonia equivale a 100 UFC/mL. Gli studi condotti negli anni '50 rimangono la base per interpretare i risultati dell'urinocoltura: una conta microbica $\geq 10^5$ UFC/mL è indicativa di un'infezione in corso, conte al di sotto di questa soglia, di solito, indicano una contaminazione.² In specifici gruppi di pazienti possono però essere significativi conteggi compresi tra 10^5 CFU/mL e 10^2 CFU/mL; se un microrganismo è presente in coltura pura, con una carica compresa tra 10^4 e 10^5 UFC/mL, il risultato deve essere valutato sulla base delle informazioni cliniche o confermato da colture ripetute.² Per l'urina raccolta con puntura sovrapubica la presenza di una qualsiasi carica microbica è indice di un'infezione in corso.²

Consultare gli appropriati riferimenti bibliografici per i criteri completi di interpretazione dei risultati dell'urinocoltura.^{1,2} Le colonie coltivate sul terreno possono essere presuntivamente identificate con lo schema seguente:



Escherichia coli : colonie rosa-magenta (β -galattosidasi positive, β -glucosidasi negative)
Test dell'indolo positivo: *E.coli*
Test dell'indolo negativo: procedere all'identificazione con i metodi convenzionali.

Klebsiella – Enterobacter - Serratia (KES): colonie blu/blu-violetto (β -galattosidasi positive, β -glucosidasi positive) - Esame microscopico: bacilli gram negativi
Per la definizione del genere/specie, procedere all'identificazione con i metodi convenzionali

Enterococcus spp.: colonie blu turchese (β -galattosidasi neg. , β -glucosidasi pos.)
Esame microscopico: cocchi Gram positivi

Proteus-Morganella-Providencia: (colonie marrone con alone marrone: triptofano deaminasi positive, β -galattosidasi negative, β -glucosidasi negative)
Test dell'indolo negativo: *Proteus mirabilis*.
Test dell'indolo positivo: *Providencia* o *Morganella* o *Proteus* spp. indolo + (procedere

Stafilococchi e lieviti: colonie bianche (β -galattosidasi negative, β -glucosidasi negative)
Esame microscopico: cocchi Gram positivi o lieviti
Procedere all'identificazione con i metodi convenzionali

11 - CONTROLLO 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 responsabilità 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.³

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie rosa
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie verdi
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie bianche
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 27736	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie blu scuro
<i>P.mirabilis</i> ATCC 12453	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie bluastre non sciamate

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection





12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere Chromogenic Urine Agar IV sono testati per la produttività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento ed un lotto di Tryptic Soy Agar (TSA).

La produttività è saggiata con metodo quantitativo con il ceppo *S.aureus* ATCC 25923. Le piastre di CUA IV e di TSA sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina di una sospensione di colonie del ceppo target. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi vengono contate le colonie sviluppate sul lotto in esame e sul TSA e calcolato l'indice di produttività ($Pr=UFC_{CUA\ IV}/UFC_{TSA}$). Nel caso tale indice sia superiore a 0,5 e nel caso il colore delle crescite sia tipico (colonie bianche), i risultati sono giudicati conformi.

Inoltre la produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi: *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* ATCC 8739, *P.mirabilis* ATCC 12453, *E.aerogenes* ATCC 13048, *K.pneumoniae* ATCC 27736, *C.freundii* ATCC 8090, *C.diversus* ATCC 40738, *S.saprophyticus* ATCC 15305, *E.faecalis* ATCC 29212, *S.epidermidis* ATCC 12228, *C.albicans* ATCC 10231. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 h ore in aerobiosi si osservano le caratteristiche cromatiche dei ceppi e l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano colori tipici ed in accordo alle specifiche e buone crescite, comparabili nel lotto in esame e nel Lotto di Riferimento.

13 - LIMITI DEL METODO

- Effettuare la colorazione Gram e l'osservazione microscopica quando vi siano dubbi interpretativi.
- Con il terreno qui descritto alcuni ceppi di *Citrobacter* spp. possono essere identificati in via presuntiva come *E.coli* (colonie rosa-magenta) poiché sono positivi alla β -galattosidasi e negativi alla β -glucosidasi. L'esecuzione del test dell'indolo sulle colonie con una goccia di reattivo di Kovacs può eliminare molti di questi risultati falsi positivi per *E.coli*.⁴ Anche l'uso dei test di sensibilità ed il PYR test possono essere utili nel discriminare le colonie rosa magenta di *Citrobacter* spp. da *E.coli*.⁵
- All'interno del gruppo *Proteus-Morganella-Providencia*, *P.mirabilis* è indolo negativo e può essere facilmente differenziato.
- Per differenziare le diverse specie all'interno del gruppo *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, sono necessari test biochimici aggiuntivi.
- Per la differenziazione di *S.agalactiae* dagli enterococchi può essere impiegato il PYR test.
- *S.saprophyticus* e *S.xylosum* coltivano con piccole colonie rosa.
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, dei test dell'indolo o della colorazione Gram, 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.

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.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda 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 piastra o in flacone.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed 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








Conservare a +2°C /+8°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). L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione del terreno e della validazione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre/flaconi) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.270.
2. Public Health England UK Standards for Microbiology Investigations. Investigation of urine. Bacteriology, B 41, 2019
3. Guidelines for assuring quality of medical microbiological culture media. The Australian Society for Microbiology, 2nd edition, 2012.
4. Perry JD, Butterworth LA, Nicholson A, Appleby MR, Orr KE. J Clin Pathol 2003; 56(7): 528-531
5. Fallon D, Andrews N, Frodsham D, Gee B, Howe S, Iliffe A, Nye KJ, Warren RE. J Clin Pathol 2002; 55(7): 524-529



**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 6	Aggiornamento "Composizione-Formula tipica" e grammi per litro"	06/2021
Revisione 7	Modifiche a "precauzioni ed avvertenze" e "conservazione e validità"	01/2022

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

