

URIFAST 2

Schneller Antibiotika-Empfindlichkeitstest von Enterobakterien im Urin

20 Tests (REF 22297)

CPB 0138_DE-2023-10

Nur für die *In-vitro*-Diagnostik, nur für den professionellen Gebrauch
Einwegtest



1 - ZIEL

Die URIFAST 2-Kits ermöglichen einen schnellen Antibiotika-Empfindlichkeitstest in 4,5 bis 6,5 Stunden bei Harnwegsinfektionen, indem sie die wichtigsten Antibiotika testen, die bei der Behandlung von bakteriellen Harnwegsinfektionen eingesetzt werden. Ein Kit reicht für die Durchführung von 20 Tests.

2 - EINFÜHRUNG

Harnwegsinfekte sind nach Atemwegsinfekten der zweithäufigste Grund für eine Konsultation in der allgemeinmedizinischen Praxis. In Krankenhäusern machen Harnwegsinfektionen den Großteil der im Krankenhaus erworbenen Infektionen aus und stellen ein erhebliches Problem in Bezug auf ihre Behandlung und Prävention dar. Harnwegsinfektionen sind in der Regel mild. Unter bestimmten Bedingungen, abhängig vom Ort der Infektion, ihrer wiederkehrenden Natur oder ihrem Auftreten in geschwächtem Zustand, können Harnwegsinfektionen zu schweren Komplikationen wie chronischer Zystitis oder Prostatitis sowie Pyelonephritis führen. Eine genaue bakteriologische Diagnose sowie eine frühzeitige und angemessene antibiotische Therapie sind unerlässlich, um sowohl das Fortschreiten von Harnwegsinfektionen zu komplizierten Formen zu verlangsamen als auch die Heilungschancen bei schweren Infektionen zu erhöhen.

Die Diagnose von Harnwegsinfektionen basiert auf der klinischen Untersuchung und der zytobakteriologischen Untersuchung des Urins. Dazu gehört die Isolierung und Identifizierung der verantwortlichen Bakterien und die anschließende Prüfung ihrer Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika. Methoden zur Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen (MHK) durch Agardiffusion und Flüssigmikrodilution sind zeitaufwendig und für die Routinediagnostik oder Notfallsituationen ungeeignet.

3 - PRINZIP

Die URIFAST 2-Methode besteht in der Untersuchung der Empfindlichkeit von Enterobacteriaceae gegenüber verschiedenen Antibiotika in flüssigem Medium.

Der Test wird an einer auf Agar isolierten und mit dem PRESTO ABG-Inokulator (1) standardisiert suspendierten Bakterienkolonie in modifiziertem Mueller-Hinton-Medium mit Farbindikator (Bromthymolblau) durchgeführt. Die resultierende Bakterien suspension wird gleichmäßig in den Wells eines URIFAST 2-Assays mit den zu testenden Antibiotika verteilt.

Nach 4,5 und 6,5 Stunden Inkubation bei 34-37 °C zeigt das Ausbleiben eines Farbwechsels in den Wells eine Wachstumshemmung und damit die Empfindlichkeit des Keims gegenüber dem getesteten Antibiotikum (ATB) an (2).

Die im URIFAST 2-Assay enthaltenen Moleküle werden bei einer kritischen Konzentration getestet, die vom EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) und dem Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) definiert wurde (3).

4 - REAGENZIEN

Verpackung

Reagenzien	Menge	Beschreibung
URIFAST 2	10	Assay mit 2x10 Wells, die die Antibiotika in einer Konzentration enthalten und einzeln in Folie mit Trocknungsmittel verpackt sind. Jeder abtrennbare Assay ermöglicht die Durchführung von 2 Tests. Jeder halbe Assay ist ein Einwegprodukt.
M4H+	20	5-mL-Fläschchen mit modifiziertem Mueller-Hinton-Medium mit Bromothymolblau. Reagenz zum Einmalgebrauch
R4H+	1	Flasche mit 5 mL Tensidlösung zur Verwendung mit <i>Proteus mirabilis</i> -Stämmen. Das Reagenz kann bis zum Verfallsdatum wiederverwendet werden, wenn es bei 2-25 °C gelagert wird
PRESTO ABG	25	Impfgerät aus Edelstahl zur Standardisierung des Inokulums
Closing System	20	Transparente Kunststoffabdeckung zum Schutz des Assays oder des halben Assays

Zusammensetzung des URIFAST 2-Assays:

- Well 1 (C+): Wachstumskontrolle
- Well 2 (AMX): Amoxicillin 8 µg/mL
- Well 3 (AMC): Amoxicillin + Clavulansäure 8/2 µg/mL
- Well 4 (XCM): Cefuroxim 8 µg/mL
- Well 5 (CPD): Cefpodoxim 1 µg/mL

- Well 6 (ETP): Ertapenem 0,5 µg/mL
- Well 7 (CIP): Ciprofloxacin 0,25 µg/mL
- Well 8 (FOS): Fosfomycin 8 µg/mL
- Well 9 (NIT): Nitrofurantoin 64 µg/mL
- Well 10 (SXT) : Trimthoprim / Sulfamethoxazol 2/38 µg/mL

Zusammensetzung in g/L des Mediums M4H+

Dosierte Mueller-Hinton-Bouillon-Kationen (Rinderinfusion, Kaseinhydrolysat, Stärke)	22
Hefeextrakt.....	1,5
Glucose	10
Bromothymolblau	0,1
pH : 7,7 +/- 0,1	

5 - VORSICHTSMASSNAHMEN FÜR DEN GEBRAUCH

Die Reagenzien in diesem Kit sind nur für den In-vitro-Gebrauch bestimmt und müssen von autorisiertem Personal gehandhabt werden.

Proben und geimpfte Reagenzien sind potentiell infektiös. Sie sollten mit den üblichen Vorsichtsmaßnahmen behandelt werden.

Reagenzien, die Rohstoffe tierischen Ursprungs enthalten, müssen mit den üblichen Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden. Verwenden Sie keine beschädigten oder unsachgemäß gelagerten Reagenzien.

Verwenden Sie die Reagenzien in diesem Kit nicht nach Ablauf des Verfallsdatums. Wechseln Sie den Pipettenkonus für jede Probe.

6 - SAMMLUNG UND VERARBEITUNG VON PROBEN

Die Empfindlichkeitsprüfung sollte an einer auf Agarmedium (TSA, chromogener Agar, Schafsbloodagar, CLED, Mac Conkey) isolierten Kolonie nach maximal 18 bis 24 Stunden Inkubationszeit durchgeführt werden.

7 - VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Das M4H+-Medium und die Assays, die bei 2-8 °C gelagert werden sowie R4H+, das bei 2-25 °C in der Originalverpackung gelagert wird, sind bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum stabil.

Wenn eine Hälfte des URIFAST 2-Assays verwendet wird, muss die nicht verwendete Hälfte in der dicht verschlossenen Originalverpackung aufbewahrt werden. Der halbe Assay ist bei 2-8 °C 6 Tage lang stabil.

Frieren Sie die Reagenzien im Kit nicht ein.

8 - ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN

Densitometer und NaCl-Medium mit 0,9 % Paraffinöl

Auf 34-37 °C erwärmen.

Behälter für kontaminierte Abfälle

Pipette mit einstellbarem Volumen von 10 bis 100 µL und sterile Konen

9 - VORGEHENSWEISE

9.1 a) Vorbereitung des Inokulums mit dem Inokulator von PRESTO ABG

Mit dem Inokulator von PRESTO ABG erhalten Sie in einem Arbeitsgang ein für den Test geeignetes, standardisiertes Inokulum.

Wählen Sie eine Well identifizierbare Kolonie von mittlerer Größe (Minstdurchmesser 1 mm).

Stechen Sie mit dem Inokulator von PRESTO ABG senkrecht in der Mitte der Kolonie zum Boden der Petrischale, wobei Sie den Inokulator immer senkrecht zur Agarebene halten.

Ziehen Sie den Inokulator zügig und ohne Ruckeln heraus.

Geben Sie das Inokulum sofort in ein Fläschchen mit M4H+-Medium und unter kräftigem Schütteln des Inokulators für 5 bis 10 Sekunden soll eine vollständige Suspension erreicht werden.

Verschließen Sie das M4H+-Fläschchen und schütteln Sie es kräftig durch wiederholtes Umdrehen. Entsorgen Sie den Inokulator in einem Behälter für kontaminierte Abfälle.

Hinweise

Inokulatoren sollten vor dem Gebrauch nicht abgeflammt werden. Sie dürfen nicht nass werden.

Inokulatoren von PRESTO ABG sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Unter keinen Umständen sollte eine zweite Dosis des Inokulums mit einem bereits benutzten Inokulator hergestellt werden.

9.1 b) Vorbereitung des Inokulums mit einem Densitometer

Stellen Sie aus 2 oder 3 isolierten Kolonien ein Inokulum her, das 2 +/- 0,1 Mac Farland in einem Fläschchen mit 0,9 % NaCl entspricht. Beimpfen Sie ein Fläschchen mit M4H+-Medium mit 35 µL Suspensionsmedium, das auf 2 +/- 0,1 Mac Farland eingestellt ist.

9.2 Beimpfen des Assays

Öffnen Sie vorsichtig den Assaybeutel, nehmen Sie den Assay heraus, trennen Sie ggf. die 2 Tests und legen Sie den unbenutzten Test zurück in den Beutel, wobei Sie darauf achten, diesen möglichst dicht zu verschließen.

Fahren Sie dann mit den folgenden Schritten fort:

- Identifizieren Sie den halben Assay
- Beimpfen Sie jeden der 10 Assay-Wells mit 100 µL beimpftem M4H+-Medium

Geben Sie zwei Tropfen Paraffinöl in das NIT-Wel

- Geben Sie für Proteus mirabilis 25 µL des Reagenzes R4H+ in die Wells AMX, AMC, CXM, CPD, ETP.
- Bringen Sie einen Deckel auf dem beimpften Assay an, um ein nachträgliches Verschütten des Inhalts der Wells zu vermeiden
- Inkubieren Sie 4,5 bis 6,5 Stunden lang bei 34-37 °C.

Hinweis: Sobald es beimpft wurde, kann das Inokulum in M4H+ bis zu einer Stunde bei Raumtemperatur auf dem Labortisch gelagert werden.

10 - ABLESEWERTE UND INTERPRETATION

Am Ende des URIFAST 2-Tests können in den Wells drei Hauptfarben und deren Zwischenstufen unterschieden werden: - Blau zeigt kein Bakterienwachstum an

- Dunkelgrün, Grün oder Gelb zeigen Bakterienwachstum an

10.1 - Validierung (Kontroll-Well)

Siehe die im Kit enthaltene Farbkarte (CPD 0138)

Prüfen Sie, ob das der Wachstumskontrolle entsprechende Medium gelb, grün oder dunkelgrün geworden ist. Dieser Farbwechsel zeigt an, dass die verwendeten Reagenzien richtig funktionieren und der Test korrekt durchgeführt wurde. Wenn das Medium blau oder dunkelblau geblieben ist, setzen Sie die Inkubation für weitere 2 Stunden fort, aber überschreiten Sie nicht die Inkubationszeit von 6,5 Stunden. Wenn keine gelbe, grüne oder dunkelgrüne Farbänderung auftritt, wiederholen Sie den Test.

10.2 - Ablesewerte und Interpretation (Wells mit Antibiotika)

10.2. a) - Ablesewerte

Beachten Sie die Farbkarte des Kits

Jedliches Bakterienwachstum zeigt sich durch einen Farbwechsel des Mediums (blau) zu Dunkelgrün, Grün oder Gelb. Bei einer Wachstumshemmung bleibt das Medium blau bis dunkelblau.

Stämme werden nach folgenden Kriterien als empfindlich oder resistent gegen Antibiotika eingestuft:

- der Stamm wird als *empfindlich* bezeichnet, wenn sein Wachstum bei der kritischen Konzentration des Antibiotikums gehemmt wird,
- der Stamm wird als *resistent* bezeichnet, wenn sein Wachstum bei der kritischen Konzentration des Antibiotikums nicht gehemmt wird.

Sonderfälle:

Bei einfachen Harnwegsinfektionen wird die Empfindlichkeit gegenüber FOS nur für die Spezies *Escherichia coli* interpretiert. Für zwei Antibiotika, CIP und SXT, wird der Stamm als *empfindlich* (S) bezeichnet, wenn sein Wachstum bei der kritischen Konzentration des Antibiotikums gehemmt wird. Der Stamm wird als *intermediär* (I) oder *resistent* (R) bezeichnet, wenn sein Wachstum bei der kritischen Konzentration des Antibiotikums nicht gehemmt wird.

10.2. b) - Interpretation

Enterobacteriaceae mit **natürlicher Resistenz (R)** gegen Antibiotika sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Unabhängig vom Ergebnis, das mit dem URIFAST 2-Assay erzielt wird, müssen diese Resistenzen bei der Darstellung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Beispiel: *Proteus mirabilis* ist unabhängig vom Assayergebnis als Nitrofurantoin-resistent zu interpretieren.

Spezies	AMX	AMC	CXM	NIT
<i>Klebsiella spp.</i>	R			
<i>C. diversus</i>	R			
<i>E. aerogenes</i>	R	R		
<i>S. marcescens</i>	R	R	R	R
<i>P. mirabilis</i>				R
<i>P. vulgaris</i>	R		R	R
<i>M. morgani</i>	R	R		R
<i>P. stuartii</i>	R	R	R	R
<i>Y. enterocolitica</i>	R	R		

11 - QUALITÄTSKONTROLLE

Um die Standardisierung der Methode zu überprüfen, wird empfohlen, regelmäßig eine Qualitätskontrolle mit dem Referenzstamm *Escherichia coli* ATCC 25922 durchzuführen:

C+	AMX	AMC	CXM	CPD	ETP	CIP	FOS	NIT	SXT
+	S	S	S/R	S/R	S	S	S	S	S

12 - FEHLERURSACHEN

Die falsche Verwendung des Inokulators von PRESTO ABG kann zu falschen Ergebnissen führen, der Einstich sollte nicht an einer Kolonie mit einem Durchmesser von weniger als 1 mm und nicht an nicht isolierten Kolonien durchgeführt werden.

Die folgenden Fehlerursachen können beobachtet werden:

- Ablesen der Ergebnisse bei unvollständigem Farbwechsel der Wells
- Beachten Sie die Inkubationszeit. Der Ablesewert bei 3,5 Stunden ist zu gering und die Ablesewerte über 7,0 Stunden sind

zu hoch

13 - EINSCHRÄNKUNGEN DER METHODE

Wie bei jeder Antibiogramm-Methode entscheidet die Qualität der Isolierung über das Ergebnis.

Die Methode wurde nur an Kolonien getestet, die auf spezifischem Agar für Urinproben isoliert wurden (§6). Die Wells sollten während der Inkubation nicht durch das Etikett abgedeckt werden.

Bei einigen Formaten von Isolationsmedien, wie z. B. Urinax CL / MC, kann es bei isolierten Kolonien, die zu klein sind, um mit Presto ABG angestochen zu werden, wird es empfohlen, das Inokulum mit einem Densitometer zu kalibrieren (§9.1.b).

Die Spezies *S. marcescens* kann gegenüber dem ETP-Antibiotikum einen Hemmungseffekt haben, daher ist es notwendig, ein resistentes Ergebnis mit dem URIFAST 2-Test mit einer Fremdmethode zu bestätigen.

Einige Stämme mit minimaler Hemmkonzentration (MHK) nahe der beworbenen Konzentration der Wells können Zwischenfarben erzeugen, die nahe an der Grenze zwischen einer Empfindlich-/Resistent-Kategorisierung liegen.

14 - LEISTUNG

Klinische Belastungsstudie

Die Leistungsbewertung von URIFAST 2 wurde in zwei Labors durchgeführt:

- Das Labor des CNR in Verbindung mit der Antibiotikaresistenz und an einem Panel von 102 Stämmen,
- das F&E-Labor von ELITech MICROBIO an einem Panel von 92 Stämmen und 10 Stämmen *E. coli* (nur bei dem Antibiotikum FOS)

Die klinischen Studien wurden gegen die Referenzmethode der MHK-Bestimmung durch Flüssigmikroverdünnung durchgeführt, mit Ausnahme von FOS, wo die Ergebnisse mit der Agardiffusions-MHK-Technik verglichen wurden, wie von EUCAST und CA-SFM empfohlen.

Nach den neuen EUCAST-Empfehlungen (Januar 2021) wird das Antibiotikum FOS nur noch auf *E. coli*-Arten getestet und verglichen.

Die Prozentsätze der Übereinstimmung bei der **exakten MHK** der Stämme oder bei der **MHK +/- 1**

Verdünnungsdifferenz sind unten dargestellt:

Zusammenfassende Tabelle der URIFAST 2-Testleistung nach Antibiotikum und exakter MHK*

	ATB	AMX	AMC	CXM	CPD	ETP	CIP	FOS	NIT	SXT	Global
	Anzahl der getesteten Stämme	200	200	200	200	200	200	90	200	200	k.A.
	Anzahl der resistenten Stämme	144	78	59	64	8	41	2	48	65	k.A.
	Anzahl der empfindlichen Stämme	56	122	141	136	192	157	88	152	135	k.A.
	Anzahl der Intermediärstämme	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	2	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Ableseung nach 4,5 Stunden	% Übereinstimmungen	98	90	90,0	86,5	92	98	100	78	95	91,4
	% GD	1	7,5	9,5	13	7,5	1	0	19	4	7,3
	% kd	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1	k.A.	k.A.	0	0,1
	% SGD	1	2,5	0,5	0,5	0,5	0	0	4	1	1,1
Ableseung nach 6,5 Stunden	% Übereinstimmungen	96	88,5	92,5	92,5	93	97	98,9	70	92	90,7
	% GD	3	7,5	6	7,5	7	2	1,1	30	7	8,3
	% kd	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1	k.A.	k.A.	0	0,1
	% SGD	1	4	1,5	0	0	0	0	0	1	0,9

*Die schwarzen Rahmen stellen die empfohlenen Abesezeiten um 4:30 oder 6:30 Uhr dar, bei denen die Leistung am besten ist.

Legende: GD Große Divergenz, kd Kleine Divergenz, SDG Sehr Große Divergenz

Zusammenfassende Tabelle der URIFAST 2-Testleistung nach Antibiotikum und MHK +/- 1 Verdünnungsdifferenz*

	ATB	AMX	AMC	CXM	CPD	ETP	CIP	FOS	NIT	SXT	Global
	Anzahl der getesteten Stämme	200	200	200	200	200	200	90	200	200	k.A.
	Anzahl der resistenten Stämme	144	78	59	64	8	41	2	48	65	k.A.
	Anzahl der empfindlichen Stämme	56	122	141	136	192	157	88	152	135	k.A.
	Anzahl der Intermediärstämme	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	2	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Ableseung nach 4,5 Stunden	% Übereinstimmungen	99	92	92,5	88,5	93,5	100	100	94	95	94,6
	% GD	0,5	6,5	7,5	11	6	0	0	5	4	4,8
	% kd	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0	k.A.	k.A.	0	0
	% SGD	0,5	1,5	0	0,5	0,5	0	0	1	1	0,6
Ableseung nach 6,5 Stunden	% Übereinstimmungen	97,0	92,5	96,5	94,0	94,5	99,0	98,9	88	92	94,4
	% GD	2,5	5,5	3,5	6	5,5	1	1,1	12	7	5,1
	% kd	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0	k.A.	k.A.	0	0
	% SGD	0,5	2	0	0	0	0	0	0	1	0,4

*Die schwarzen Rahmen stellen die empfohlenen Abesezeiten um 4:30 oder 6:30 Uhr dar, bei denen die Leistung am besten ist.

Die folgenden Tabellen beschreiben die Verteilung der beobachteten Abweichungen nach Antibiotika bei 4,5 Stunden bzw. 6,5 Stunden Inkubationszeit:

Verteilung der beobachteten Diskrepanzen nach 4,5 Stunden, nach Antibiotikum und nach MHK*-Wert

CMI	AMX		AMC		CKM		CPD		ETP		CIP		FOS		NIT		SXT				
	GD	SDG	GD	kd	SDG	GD	SDG	GD	SDG	GD	kd	SDG									
0,06								1		9										1	
0,125					1			5		1										2	
0,25								6		2		2								1	
0,5			2					10		3		2								3	
1					2			4												1	
2			1		2																
4	1		7		10			1		1											
8	1		2		4																
16	1			2		1														1	
32				1																9	
64				2																27	
128	1																			5	

* Die schattierten Zellen entsprechen der angegebenen Konzentration in den Wells für jedes Antibiotikum

Verteilung der beobachteten Abweichungen nach 6,5 Stunden, nach Antibiotikum und nach MHK*-Wert

CMI	AMX		AMC		CKM		CPD		ETP		CIP		FOS		NIT		SXT				
	GD	SDG	GD	kd	SDG	GD	SDG	GD	SDG	GD	kd	SDG									
0,06									7		2									2	
0,125					1			1		1										2	
0,25								5		3		2								4	
0,5	3		1					6		3		2								5	
0,75														1							
1			2		1			3												1	
2			1																		
4	2		7		5																
8	1		4		5														1		
16		1		4		3														7	
32				2																16	
64				2																36	
128		1																			

*Die schattierten Zellen entsprechen der angegebenen Konzentration in den Wells für jedes Antibiotikum

15 - ABFALLENTSORGUNG

Die Abfälle müssen gemäß den für diese Art von Reagenzien geltenden Hygienevorschriften des Landes, in dem sie verwendet werden, entsorgt werden.

16 - LITERATURHINWEISE

1. GARRABE E., CAVALLO J-D., FABRE R., HERNANDEZ E., Antibiogramme par diffusion en gélose : essai de standardisation de l'inoculum par la méthode "Presto ABG[®]", Revue française des laboratoires, novembre 1998, n°307

2. TIPPETT L.O., L.D. ZELENICK and C.A. ROBB. 1970. Modification of the microtiter technique for antimicrobial drug susceptibility testing by incorporation of indicators. Appl. Microbiol. 20 : 342-345

3. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM avril 2021 V1.0) et recommandations de "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) (V11.0 01/01/2021)

Die Änderungen seit der letzten Revision sind grau hinterlegt.



ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau
Allée d'Athènes
83870 SIGNES
France

☎ : 33 (0)4 94 88 55 00

Fax.: 33 (0)4 94 32 82 61

<http://www.elitechgroup.com>