

URIFAST 2

Antibiogramme rapide des entérobactéries urinaires

20 tests (REF 22297)

CPB 0138_FR-2023-10

Pour diagnostic *in vitro* uniquement, pour usage professionnel seulement
Test à usage unique



1 - BUT

Les coffrets URIFAST 2 permettent l'antibiogramme rapide en 4h30 à 6h30 des entérobactéries urinaires en testant les principaux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections urinaires d'origine bactérienne. Un coffret permet de réaliser 20 tests.

2 - INTRODUCTION

Les infections urinaires représentent, après les infections respiratoires, le second motif de consultation en pratique médicale de ville. A l'hôpital, les infections urinaires représentent la majorité des infections nosocomiales et posent un important problème quant à leur traitement et à leur prévention. Les infections urinaires sont le plus souvent bénignes. Dans certaines conditions qui sont fonction du site de l'infection, de son caractère récidivistique, ou de sa survenue sur des terrains fragilisés, l'infection urinaire peut entraîner des complications sévères telles que cystite ou prostatite chroniques, ainsi que pyélonéphrite. Un diagnostic bactériologique précis ainsi qu'une antibiothérapie adaptée et précoce sont indispensables à la fois afin de freiner l'évolution des infections urinaires vers des formes compliquées, mais également pour augmenter les chances de guérison des infections sévères.

Le diagnostic de l'infection urinaire repose sur l'examen clinique doublé de l'examen cyto bactériologique des urines (ECBU). Ce dernier consiste notamment à isoler, à identifier la ou les bactéries responsables, puis à tester leur sensibilité aux antibiotiques. Les méthodes de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par diffusion en milieu gélosé ainsi que par microdilution en milieu liquide sont longues et s'avèrent inadaptées à un diagnostic de routine ou à des situations d'urgence.

3 - PRINCIPE

La méthode URIFAST 2 consiste à étudier en milieu liquide la sensibilité des entérobactéries à divers antibiotiques. Le test est réalisé à partir d'une colonie bactérienne isolée sur gélose, et mise en suspension de façon standardisée à l'aide de l'inoculateur PRESTO ABG (1) dans le milieu Mueller-Hinton modifié contenant un indicateur coloré (bleu de bromothymol). La suspension bactérienne obtenue est uniformément répartie dans les puits d'une galerie URIFAST 2 contenant les antibiotiques à tester.

Après 4h30 et 6h30 d'incubation à 34 - 37°C, l'absence de virage coloré dans les puits indique une inhibition de la croissance, et donc la sensibilité du germe vis-à-vis de l'antibiotique (ATB) testé (2).

Les molécules incluses dans la galerie URIFAST 2 sont testées à une concentration critique définie par l'EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) et le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (3).

4- REACTIFS

Conditionnement

Réactifs	Quantité	Description
URIFAST 2	10	Galerie de 2x10 puits contenant les antibiotiques à une concentration et emballée individuellement en sachet aluminium avec un déshydratant. Chaque galerie sécable permet de réaliser 2 tests. Chaque demi galerie est à usage unique.
M4H+	20	Flacon de 5 mL de milieu Mueller-Hinton modifié contenant du bleu de bromothymol. Réactif à usage unique
R4H+	1	Flacon contenant 5 mL de solution tensio-active à utiliser avec les souches de <i>Proteus mirabilis</i> . Réactif réutilisable si conservé à 2-25°C jusqu'à sa date de péremption
PRESTO ABG	25	Inoculateur en acier inoxydable permettant de standardiser l'inoculum
Closing System	20	Couvercle en plastique translucide protecteur de la galerie ou demi galerie ensemencées

Composition de la galerie URIFAST 2 :

-puits 1 (C+) : Contrôle de croissance
-puits 2 (AMX) : Amoxicilline 8 µg/mL
-puits 3 (AMC) : Amoxicilline + Acide clavulanique 8/2 µg/mL
-puits 4 (CXM) : Céfuroxime 8 µg/mL
-puits 5 (CPD) : Cefpodoxime 1 µg/mL
-puits 6 (ETP) : Ertapénème 0.5 µg/mL

-puits 7 (CIP) : Ciprofloxacine 0,25 µg/mL
-puits 8 (FOS) : Fosfomycine 8 µg/mL
-puits 9 (NIT) : Nitrofurantoïne 64 µg/mL
-puits 10 (SXT) : Triméthoprime / Sulfaméthoxazole 2/38 µg/mL

Composition en g/L du milieu M4H+

Bouillon Mueller-Hinton cations dosés (Infusion de boeuf, hydrolysate de caséine, amidon).....22
Extrait de levure1,5
Glucose.....10
Bleu de bromothymol0,1
pH : 7,7 +/- 0,1

5 - PRECAUTIONS D'EMPLOI

Les réactifs de ce coffret sont à usage *in vitro* uniquement et doivent être manipulés par des personnes habilitées. Les prélèvements urinaires et les réactifs ensemencés sont potentiellement infectieux. Ils doivent être manipulés avec les précautions d'usage.

Les réactifs contenant des matières premières d'origine animale doivent être manipulés avec les précautions d'usage.

Ne pas utiliser les réactifs endommagés ou mal conservés.

Ne pas utiliser les réactifs de ce coffret au-delà de la date de péremption. Changer de cône de pipettes pour chaque échantillon.

6 - RECUEIL ET TRAITEMENT DES PRELEVEMENTS

L'étude de la sensibilité doit être réalisée à partir d'une colonie isolée sur milieu gélosé (TSA, gélose chromogénique, gélose au sang de mouton, CLED, Mac Conkey) après 18 à 24 heures d'incubation maximum.

7 - PREPARATION ET CONSERVATION DES REACTIFS

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi.

Le milieu M4H+ et les galeries conservées à 2-8 °C ainsi que le R4H+ à 2-25°C dans leur conditionnement d'origine sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

En cas d'utilisation d'une moitié de la galerie URIFAST 2, la moitié non utilisée doit être conservée dans son emballage d'origine hermétiquement fermé. La demi-galerie ainsi conservée est stable 6 jours à 2-8 °C.

Ne pas congeler les réactifs du coffret.

8 - MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

Densitomètre et milieu NaCl 0,9%

Huile de paraffine

Etuve à 34-37 °C

Contenant pour déchets contaminés

Pipette à volume réglable de 10 à 100µl et cônes stériles

9 - MODE OPERATOIRE

9.1 a) Préparation de l'inoculum à l'aide de l'inoculateur PRESTO ABG

L'inoculateur PRESTO ABG permet d'obtenir en une seule manipulation un inoculum standardisé et adapté à la réalisation du test.

Choisir une colonie bien identifiée et de taille moyenne (diamètre minimum 1 mm).

A l'aide de l'inoculateur PRESTO ABG, piquer verticalement au centre de la colonie jusqu'au fond de la boîte de pétri, et en veillant à toujours maintenir l'inoculateur perpendiculaire au plan de la gélose.

Retirer l'inoculateur en une fois et sans mouvement brusque.

Décharger immédiatement l'inoculum dans un flacon de milieu M4H+ en agitant énergiquement l'inoculateur pendant 5 à 10 secondes jusqu'à obtenir une mise en suspension complète.

Boucher le flacon M4H+ et l'agiter vigoureusement par retournement successifs. Jeter l'inoculateur dans un contenant réservé aux déchets contaminés.

Remarques

Les inoculateurs ne doivent pas être passés à la flamme avant utilisation. Ils ne doivent pas être mouillés.

Les inoculateurs PRESTO ABG sont à usage unique. En aucune façon, une deuxième prise d'inoculum ne doit être effectuée avec un inoculateur ayant déjà servi.

9.1 b) Préparation de l'inoculum à l'aide d'un densitomètre

A partir de 2 ou 3 colonies isolées, réaliser un inoculum équivalent à 2 +/- 0,1 Mac Farland dans un flacon de NaCl à 0,9% Ensemencer un flacon de milieu M4H+ avec 35 µL du milieu de suspension ajusté à 2 +/- 0,1 Mac Farland.

9.2 Inoculation de la galerie

Ouvrir soigneusement le sachet de la galerie, sortir la galerie, séparer les 2 tests si besoin et remettre le test non utilisé dans le sachet en veillant à le refermer le plus hermétiquement possible.

Procéder ensuite aux étapes suivantes :

- Identifier la demi galerie
- Ensemencer chacun des 10 puits de la galerie avec 100 µL de milieu M4H+ inoculé

- Ajouter deux gouttes d'huile de paraffine dans le puits NIT
- Pour *Proteus mirabilis*, ajouter 25 µL de réactif R4H+ dans les puits AMX, AMC, CXM, CPD, ETP.
- Clipser un couvercle sur la galerie ensemencée afin d'éviter de renverser le contenu des puits par la suite
- Incuber à 34-37 °C pendant 4h30 à 6h30.

Remarque : Une fois ensemencé, l'inoculum dans le M4H+ peut être conservé jusqu'à une heure à température ambiante sur la paillasse.

10 - LECTURE ET INTERPRETATION

A l'issue du test URIFAST 2, trois couleurs principales, ainsi que leurs intermédiaires, peuvent être obtenues dans les puits: - le bleu indique une absence de croissance bactérienne
- le vert foncé, le vert ou le jaune indiquent une croissance bactérienne

10.1 - Validation (puits contrôle)

Se référer à l'abaque de couleur (CPD 0138) fourni dans le kit

Vérifier que le milieu correspondant au contrôle de croissance a viré au jaune, vert ou vert foncé. Ce virage coloré atteste du bon fonctionnement des réactifs utilisés ainsi que d'une exécution correcte. Si le milieu est resté bleu ou bleu foncé, poursuivre l'incubation pendant 2h supplémentaires sans dépasser 6h30 d'incubation. En l'absence de virage coloré au jaune, vert ou vert foncé, recommencer le test.

10.2 - Lecture et Interprétation (puits avec antibiotiques)

10.2. a) - Lecture

Se référer à l'abaque de couleur du kit (CPD 0138)

Toute croissance bactérienne se traduit par un virage coloré du milieu (bleu) vers le vert foncé, vert ou jaune. Le milieu reste bleu à bleu foncé en cas d'inhibition de croissance.

Les souches sont qualifiées de sensibles ou résistantes vis-à-vis des antibiotiques selon les critères suivants:

- la souche est dite *Sensible* quand sa croissance est inhibée à la concentration critique de l'antibiotique,
- la souche est dite *Résistante* quand sa croissance n'est pas inhibée à la concentration critique de l'antibiotique.

Cas particuliers :

Pour les infections urinaires simples, la sensibilité à la FOS ne s'interprète que pour l'espèce *Escherichia coli*.

Pour deux antibiotiques, CIP et SXT, la souche est dite *Sensible* (S) quand sa croissance est inhibée à la concentration critique de l'antibiotique. La souche est dite *Intermédiaire* (I) ou *Résistante* (R) quand sa croissance n'est pas inhibée à la concentration critique de l'antibiotique.

10.2. b) - Interprétation

Les entérobactéries présentant des **résistances naturelles (R)** aux antibiotiques sont mentionnées dans le tableau ci-dessous. Quel que soit le résultat obtenu avec la galerie URIFAST 2, il faut tenir compte de ces résistances pour le rendu des résultats.

Exemple : Pour *Proteus mirabilis*, interpréter Résistant à la nitrofurantoïne quel que soit le résultat obtenu avec la galerie.

Espèce	AMX	AMC	CXM	NIT
<i>Klebsiella spp.</i>	R			
<i>C. diversus</i>	R			
<i>E. aerogenes</i>		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 - CONTROLE DE QUALITE

Afin de vérifier la standardisation de la méthode, il est recommandé de réaliser un contrôle de qualité de façon périodique en utilisant la souche de référence, *Escherichia coli* ATCC 25922 :

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

12 - CAUSES D'ERREURS

Une mauvaise utilisation de l'inoculateur PRESTO ABG peut générer de faux résultats, la piqûre ne doit pas être réalisée sur une colonie inférieure à 1mm de diamètre et elle ne doit pas être réalisée sur des colonies non isolées.

Les causes d'erreurs suivantes peuvent être observées :

- lecture des résultats lorsque le virage du puits contrôle est incomplet
- température (34-37 °C) non maintenue pendant toute la durée de l'incubation
- risque de dessèchement des puits et de renversement de leur contenu si le Closing System n'est pas utilisé et correctement clipsé

- la réalisation du test à partir de souches isolées après plus de 24 heures d'incubation peut générer de faux résultats
- non-respect du temps d'incubation. La lecture à 3h30 n'est pas suffisante et les lectures supérieures à 7H sont trop importantes

13 - LIMITES DE LA METHODE

Comme pour toute méthode d'antibiogramme, la qualité de l'isolement conditionne le résultat.

La méthode n'a été testée qu'à partir de colonies isolées sur gélose spécifique pour prélèvements urinaires (§6).

Les puits ne doivent pas être recouverts par l'étiquette pendant l'incubation.

Pour certains formats de milieux d'isolement, type Urinax CL / MC, en cas de colonies isolées trop petites pour être piquées avec le Presto ABG, il est recommandé de calibrer l'inoculum à l'aide d'un densitomètre (§9.1.b).

L'espèce *S.marcescens* peut présenter un défaut d'inhibition sur l'antibiotique ETP, il est nécessaire de confirmer un résultat rendu résistant avec le test URIFAST 2 avec une tierce méthode.

Certaines souches avec des CMI proches de la concentration annoncée du puits peuvent générer des couleurs intermédiaires proches de la limite entre une catégorisation *Sensible / Résistant*.

14 - PERFORMANCES

Etude sur souches cliniques

L'évaluation des performances de l'URIFAST 2 a été réalisée au sein de deux laboratoires :

- Le laboratoire du CNR associé de la Résistance aux Antibiotiques et sur un panel de 102 souches,
- Le laboratoire R&D d'ELITech MICROBIO sur un panel de 92 souches, et, 10 souches *E. coli* uniquement sur l'antibiotique FOS

Les études cliniques ont été menées face à la méthode de référence de détermination des CMI par micro dilution liquide, excepté pour la FOS dont les résultats ont été comparés face à la technique des CMI par diffusion sur gélose, comme recommandé par l'EUCAST et le CA-SFM.

Suite aux nouvelles recommandations de l'EUCAST (janvier 2021), l'antibiotique FOS n'est analysé et comparé que pour l'espèce *E. coli*.

Les pourcentages de concordance à la **CMI exacte** des souches ou à la **CMI à +/- 1 dilution d'écart** sont présentés ci-dessous :

Tableau de synthèse des performances du test URIFAST 2 par antibiotique et à la CMI exacte*

	ATB	AMX	AMC	CXM	CPD	ETP	CIP	FOS	NIT	SXT	Global
	Nbre de souches testées	200	200	200	200	200	200	90	200	200	NA
	Nbre de souches résistantes	144	78	59	64	8	41	2	48	65	NA
	Nbre de souches sensibles	56	122	141	136	192	157	88	152	135	NA
	Nombre de souches intermédiaires	NA	NA	NA	NA	NA	2	NA	NA	NA	NA
Lecture à 4h30	% Concordants	98	90	90,0	86,5	92	98	100	78	95	91,4
	% DM	1	7,5	9,5	13	7,5	1	0	19	4	7,3
	% dm	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA	NA	0	0,1
	% DTM	1	2,5	0,5	0,5	0,5	0	0	4	1	1,1
Lecture à 6h30	% Concordants	96	88,5	92,5	92,5	93	97	98,9	70	92	90,7
	% DM	3	7,5	6	7,5	7	2	1,1	30	7	8,3
	% dm	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA	NA	0	0,1
	% DTM	1	4	1,5	0	0	0	0	0	1	0,9

*Les cadres noirs représentent les temps de lecture préconisés à 4h30 ou 6h30 pour lesquels les performances sont les meilleures
Légende: DM Divergence Majeure, dm divergence mineure, DTM Divergence Très Majeure

Tableau de synthèse des performances du test URIFAST 2 par antibiotique et à la CMI à +/- 1 dilution d'écart*

	ATB	AMX	AMC	CXM	CPD	ETP	CIP	FOS	NIT	SXT	Global
	Nbre de souches testées	200	200	200	200	200	200	90	200	200	NA
	Nbre de souches résistantes	144	78	59	64	8	41	2	48	65	NA
	Nbre de souches sensibles	56	122	141	136	192	157	88	152	135	NA
	Nombre de souches intermédiaires	NA	NA	NA	NA	NA	2	NA	NA	NA	NA
Lecture à 4h30	% Concordants	99	92	92,5	88,5	93,5	100	100	94	95	94,6
	% DM	0,5	6,5	7,5	11	6	0	0	5	4	4,8
	% dm	NA	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	0	0
	% DTM	0,5	1,5	0	0,5	0,5	0	0	1	1	0,6
Lecture à 6h30	% Concordants	97,0	92,5	96,5	94	94,5	99,0	98,9	88	92	94,4
	% DM	2,5	5,5	3,5	6	6	1	1,1	12	7	5,1
	% dm	NA	NA	NA	NA	NA	0	NA	NA	0	0
	% DTM	0,5	2	0	0	0	0	0	0	1	0,4

*Les cadres noirs représentent les temps de lecture préconisés à 4h30 ou 6h30 pour lesquels les performances sont les meilleures

Les tableaux ci-dessous décrivent la répartition des discordances observées, par antibiotique à 4h30 ou à 6h30 d'incubation:

Répartition des divergences observées à 4h30 de lecture, par antibiotique et par valeur de CMI*

CMI	AMX		AMC		CXM		CPD		ETP		CIP			FOS		NIT		SXT		
	DM	DTM	DM	DTM	DM	DTM	DM	DTM	DM	DTM	DM	dm	DTM	DM	DTM	DM	DTM	DM	dm	DTM
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			3		2		4											1		
2			1		2															
4	1		7		10			1		1										
8	1		2		4															
16	1			2		1											1			
32				1													9			2
64				2													27			
128	1																5			

*Les cellules grisées correspondent à la concentration annoncée dans les puits pour chaque antibiotique

Répartition des divergences observées à 6h30 de lecture, par antibiotique et par valeur de CMI*

CMI	AMX		AMC		CXM		CPD		ETP		CIP			FOS		NIT		SXT		
	DM	DTM	DM	DTM	DM	DTM	DM	DTM	DM	DTM	DM	dm	DTM	DM	DTM	DM	DTM	DM	dm	DTM
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			2
64				2													36			
128		1																		

*Les cellules grisées correspondent à la concentration annoncée dans les puits pour chaque antibiotique

15 - ELIMINATION DES DECHETS

Les déchets doivent être éliminés en respectant les règles d'hygiène et la réglementation en vigueur pour ce type de réactifs dans le pays d'utilisation.

16 - BIBLIOGRAPHIE

- GARRABE E., CAVALLO J-D., FABRE R., HERNANDEZ E., Antibiogramme par diffusion en gélose : essai de standardisation de l'inoculum par la méthode "Presto ABC®", Revue française des laboratoires, novembre 1998, n°307
- TIPPETT L.O., L.D. ZELNICK and C.A. ROBB. 1970. Modification of the microtiter technique for antimicrobial drug susceptibility testing by incorporation of indicators. Appl. Microbiol. 20 : 342-345
- 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)

Les modifications par rapport à la version précédente sont surlignées en gris.



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>