

# CAT

## Critically Appraised Topic

### **Titel: Identificatie van urinaire pathogenen aan de hand van chromogene media**

Auteur: Isabel Verstreken

Supervisor: Prof. J. Verhaegen

Date: 06-05-2008

Expiry date: 06-05-2010

#### **CLINICAL BOTTOM LINE**

---

Dagelijks worden er een groot aantal urineculturen verwerkt in het laboratorium. Efficiënte en betrouwbare analyse is dan ook zeer belangrijk. De guidelines promoten nog steeds het gebruik van bloedagar en McConkey al dan niet aangevuld met een NAC plaat. Verschillende chromogene media die *Escherichia coli* (ESCO) en *Proteus mirabilis* (PRMI) rechtstreeks aantonen op kleur, zijn in de literatuur al vergeleken met de conventionele media en blijken een goede sensitiviteit en specificiteit te vertonen. Uriselect 4 (Bio-Rad) werd vergeleken met de de biplate bloedagar/McConkey op bijna 1000 urinestalen en bleek een goed medium te zijn voor de identificatie van ESCO. Deze chromogene bodems werden nog niet gevalideerd voor een gevoeligheidsbepaling op VITEK 2 (Biomérieux). Van bijna 80 *E. coli*-stammen werd het antibiogram vergeleken tussen de conventionele media en de chromogene agar. Hieruit blijkt eveneens een goede correlatie, zodat de platen zonder problemen in de routine voor ESCO kunnen geïmplementeerd worden. Bijkomende validatie voor de gevoeligheidsbepaling van de andere gramnegatieven is aangewezen gezien de kleine hoeveelheid stalen. Vergelijkende studie tussen de Uriselect 4 (Bio-Rad) en de ChromID CPS3 (Biomérieux) was in het voordeel van de Uriselect 4 platen.

#### **CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO**

---

Urineculturen vormen een belangrijk onderdeel van de dagelijkse routine-stalen op bacteriologie. Urineweginfecties (UTI) zijn namelijk de meest voorkomende acute bacteriële infecties. Bovendien kunnen urinestalen gemakkelijk worden afgenomen zodat ze door de clinici zeer frequent

worden aangewend in de diagnostiek. Maandelijks worden er gemiddeld een 5250-tal urineculturen uitgewerkt in het UZ Leuven. Hierdoor is een efficiënte methode voor de verwerking van de hoeveelheid stalen noodzakelijk.

Urine is normaal steriel maar kan bij staalafname gemakkelijk worden gecontamineerd door de commensale microflora die ter hoogte van het terminale deel van de urethra en de genitaalstreek aanwezig is. Epidemiologisch en vergelijkend onderzoek van Kass tussen geloosde urine en gepuncteerde urine bij zwangere vrouwen toonde aan dat kwantitatief bacteriologisch onderzoek door het tellen van kolonies, een onderscheid kan maken tussen bijbesmetting en een echte urineweginfectie (>100000 bact/ml: urineweginfectie; <10000 bact/ml: bijbesmetting) (R3). De kwantitatieve enting wordt uitgevoerd met een gekalibreerde entlus. Men strijkt 1 µl monster via een steriele entlus op een rijke niet-selectieve agarbodem. Het aantal gegroeide kolonies x 1000 geeft dan de hoeveelheid kiemen per ml weer.

Urineweginfecties worden meestal veroorzaakt door bacteriën uit de eigen intestinale flora van de patiënt die de urinewegen retrograad binnentreden vanuit de urethra (R4). Bij kinderen en volwassenen zonder voorbeschikkende factoren (ongecompliceerde UTI), is *Escherichia coli* veruit de meest voorkomende pathogeen om een urineweginfectie te veroorzaken. *E. coli* veroorzaakt ongeveer 80% van de acute community acquired ongecompliceerde urineweginfecties. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus species* en enterokokken veroorzaken zelden een ongecompliceerde cystitis en pyelonefritis. Fungale pathogenen zoals *Candida albicans* of andere candida species komen bij ongeveer 10% van de meestal gecompliceerde urineweginfecties in een tertiair centrum in de VS voor. Voorbeschikkende factoren zoals catheterisatie, nefrostomiesondes, urolithiasis, chirurgische reconstructies van de urinaire tractus en onvolledige blaaslediging helpen enerzijds de microorganismen om de urinaire tractus te bereiken en er te persisteren en veranderen anderzijds het spectrum van uropathogenen (R6). De etiologie van een UTI wordt dus ook beïnvloed door onderliggende factoren van de gastheer zoals leeftijd, geslacht, diabetes, catheterisatie of spinal cord injury. (R5) (zie tabel 1).

**TABEL 1. Etiologie van de ongecompliceerde versus de gecompliceerde urineweginfecties (UTI)**

<i>Ongecompliceerde UTI pathogenen</i>	<i>Gecompliceerde UTI pathogenen</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Klebsiella species</i>
<i>Klebsiella species</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	Groep B streptokokken

Het hoge percentage *E. coli*'s houdt verband met de predominantie van deze bacterie in de facultatieve intestinale flora.(R7) Uropathogenen zoals de *E. coli*, andere Enterobacteriaceae, enterokokken en *Staphylococcus saprophyticus* (STSA) kunnen virulentiefactoren bezitten die eerst kolonisatie en invasie van het urineweg-epitheel en nadien vermenigvuldiging in urine toelaten. Andere organismen, zoals de lactobacillen en ( $\alpha$ -) hemolytische streptokokken of anaëroben groeien niet goed in urine en kunnen, in afwezigheid van enterische of vaginale fistels, wanneer ze uit de urine geïsoleerd worden als contaminatie worden beschouwd.(R8)

**Guidelines voor urineculturen** zoals beschreven in de **Isenberg** beschrijven het enten van een urinestaal op een schapenbloedagar (BPA), McConkey (MAC, onderscheid lactose negatief of positief) en eventueel een NAC-plaat als de gouden standaard. Deze laatste is een bodem met colistine-nalidixine zuur die de groei van gramnegatieven remt. De media moeten worden gekozen aan de hand van de patiëntenpopulatie en de klinische diagnose. CHOC (chocoladeagar) kan aanvullend worden geënt bij chirurgisch verworven urine of bij stalen verworven na prostaatmassage. Andere commerciële media zijn optioneel (R1) en werken beter bij stalen van extramuros patiënten met meest waarschijnlijk één oorzakelijke pathogeen.

Ook in de **Cumitech** wordt het aanbevolen (R2) om routineculturen te enten op een 5% schapenbloedagar en een McConkey agar. De bodems dienen overnacht te worden geïncubeerd aan 35-37°C. De bloedagar mag ook bij een verhoogde CO<sub>2</sub> (3-8%) worden geïncubeerd. Langere incubatie is soms nodig voor het identificeren van gisten en corynebacteriën. Bij vermoeden van mengflora raadt men volgens de Cumitech aan om nog aanvullend een NAC plaat te enten om de groei van gramnegatieven te remmen en zo eenvoudiger enterokokken en andere grampositieve bacteriën te identificeren.

#### Huidige praktijk in het UZ Gasthuisberg

Momenteel worden de urinestalen, vooraf aan teststrook-screening op de Aution Max analyzer en automatisch rechtstreeks microscopisch onderzoek door de UF-100, door een MLT geënt op een biplate met BPA en MAC. Eerst wordt 1  $\mu$ l entoog geënt op de bloedplaat en nadien ook op de MAC. Deze platen worden dan overnacht geïncubeerd en de dag nadien door de MLT van bacteriologie afgelezen. Voor de interpretatie van de geënte voedingsbodem: zie attachment 1 A.

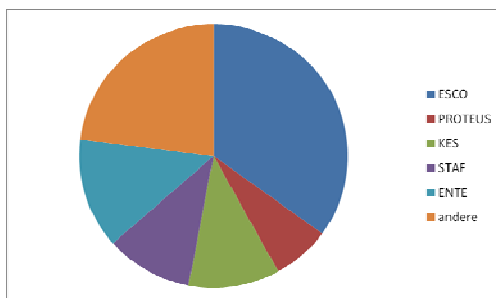
MAC agar is selectief voor gramnegatieve staven en heeft als voordeel dat de *Proteus* species geen overgroei door uitzwerming geven waardoor een bloedplaat onleesbaar kan worden. Verdere identificatie en antibiogram-bepaling worden uitgevoerd afhankelijk van de aanwezigheid van pyurie en het type staal (verblijfsonde, suprapubische punctie of midstream) (Zie attachment 1 B). De pyurie wordt bepaald aan de hand van de Sysmex UF-100 flow cytometer en de teststrookscreening (opsporen van leucocyten esterasen) met de Aution Max analyzer. (7) Het LIS implementeert deze regels automatisch en formuleert een advies na het invullen van het aantal gegroeide kolonies.

Indien verdere identificatie en antibiogram-bepaling noodzakelijk is, wordt het micro-organisme in een suspensie van 0.5 tot maximum 0.63 McFarland met een identificatiekaart (GN) en een antibiogramkaart (AST-N045) op VITEK 2 gezet.

De **etiologie** van de urineweginfecties in ons laboratorium van een tertiair centrum is verschillend met de huisartsenpraktijk. Ondergaande tabel en diagram tonen de percentages van de oorzakelijke bacteriën in het UZ Gasthuisberg aan. Er worden maandelijks ongeveer 1346 urinestalen verder uitgewerkt ter identificatie van de oorzakelijke kiem.

**TABEL 2: Etiologie UTI UZ Gasthuisberg**

Percentage isolaten	%
Escherichia coli (ESCO)	35
Proteus mirabilis (PRMI)	7
KES (Klebsiella, Enterobacter, Serratia)	11
Stafylokokken	10.5
Enterokokken	13.5
Andere	23



Ter vergelijking met de etiologie in een tertiair centrum, werden enkele resultaten van het MCH (Medisch Centrum voor Huisartsen) te Leuven opgevraagd (TABEL3). De percentages zijn hier ten opzichte van het totaal aantal urineculturen (inclusief steriel, mengflora,...). Het percentage E. Coli's ligt opmerkelijk hoger in een ambulante praktijk.

**TABEL 3: Percentage ESCO en PRMI tov totaal aantal urineculturen**

	UZ GHB	MCH
Totaal aantal urinestalen/jaar	63978	17521
ESCO	8.1%	18%
PRMI	2.1%	1.6%
KLPN (Klebsiella pneumoniae)	1.3%	1.3%

Deze CAT heeft als doel het gebruik van chromogene media op de werkpost urine te evalueren en te vergelijken met de conventionele methode (MAC en BPA). Voornamelijk de identificatie van gramnegatieve bacteriën werd geëvalueerd. Er werd eveneens nagegaan of we rechtstreeks vanop het chromogeen medium een antibiogram en indien nodig een identificatie op VITEK 2 kunnen inzetten. Kunnen chromogene platen enerzijds kostenbesparend zijn door een directe visuele identificatie van bepaalde kiemen en anderzijds een betrouwbaar en sneller antwoord aan de kliniek geven?

Als chromogeen medium werd de Uriselect 4 van Biorad geëvalueerd. De Uriselect 4 platen werden eveneens vergeleken met de ChromID CPS 3 platen van Biomérieux.

## QUESTION(S)

---

- 1) Kunnen chromogene bodems (Uriselect 4, Bio-Rad) aangewend worden in de diagnostiek van urineweginfecties? Is rechtstreekse diagnose van *Escherichia coli* en *Proteus mirabilis* op kleur betrouwbaar en sneller dan de conventionele methode aan de hand van een biplate BPA/MAC? Kan een identificatie of antibiogram rechtstreeks vanop Uriselect 4 op VITEK 2 gezet worden? Is het mogelijk de halve MAC bodem te vervangen door een halve Uriselect 4 bodem?
- 2) Is er een verschil tussen de Uriselect 4 (Bio-Rad) en de ChromID CPS ID 3-bodems (Biomérieux)?
- 3) Wat zijn de financiële gevolgen bij eventuele overschakeling op chromogene bodems?

## SEARCH TERMS

---

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: "chromogenic agar, E. coli, urinary tract infection "*
- 2) *PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)*
- 3) *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org/>)*
- 4) *UpToDate Online version 12.2 (2004)*
- 5) *Google.be*

## RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

---

- 1) *Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)*
  1. Clinical Microbiology Procedures. Handbook. (second edition 2004 Volume 1, ASM Press). Henry D. Isenberg (R1).
  2. Cumitech (cumulative techniques and procedures in clinical microbiology) 2B November 1998. Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections (R2).
- 2) *Reviews and Original Articles*
  1. Kass, E.H. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans.Assoc.Am.Phys.* 1956;69:54-56 (R3).
  2. Grüneberg R. N. Relationship of infecting urinary organism to the faecal flora in patients with symptomatic urinary infection. *Lancet* 1969;I:766-768 (R4).
  3. Allan R. The Etiology of Urinary Tract Infections: Traditional and Emerging pathogens. *Am. Journ Med* 2002;113:14S-18S (R5).

4. Johnson J. R. and Stamm W. E. Urinary tract infections in women: diagnosis and treatment. *Ann. Intern. Med* 1989;111:906-917 (R6).
5. Johnson J. R. Virulence factors in Escherichia Coli urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev* 1995;4:80-128 (R7).
6. Barnett B.J. Urinary tract infection: An overview. *Am. Journ. Med. Science* 1997;314:245-249 (R8).
7. Roggeman S, Zaman Z. Safely Reducing Manual Urine Microscopy Analyses by Combining Urine Flow Cytometer and Strip Results. *Am J Clin Pathol* 2001;116:872-878 (R9).
8. Baldassare, J.S., Kaye D. Special problems of urinary tract infections in the elderly. *Med. Clin. North. Am.* 1991;2:375-390 (R10).
9. Hindman R, Tronic B. Effect of Delay on Culture of Urine. *Journ Clin Micr* 1976; Vol 4 (1):102-103 (R11).
10. Bartlett RC, Treiber N. Clinical significance of mixed bacterial cultures of urine. *Am J Clin Pathol* 1984;Sep;82(3):319-22 (R12).
11. Hooton TM, O'Shaughnessy EJ. Localisation of urinary tract infection in patients with spinal cord injury. *J Infect Dis.* 1984;Jul;150(1):85-91 (R13).
12. Burns M W, Burns J L. Pediatric urinary tract infection: diagnosis, classification and significance. *Pediatr Clin North Am* 1987;34:1111-1120 (R14).
13. Bergquist D, Brönnestam R. The relevance of urinary sampling methods in patients with indwelling Foley catheters. *Br J Urol* 1980;52:92-95 (R15).
14. Perry, J.D. and Freydière, A.M. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *Journal of Applied Microbiology.* 2007;103:2046-2055 (R16).
15. Manafi M. New development in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int J Food Microbiol.* 2000 Sep 25;60(2-3):205-18. Review (R17).
16. Perry JD, Morris KA. Evaluation of novel chromogenic substrates for the detection of bacterial beta-glucosidase. *Journal of Applied Microbiology* 2007;102:410-415 (R18).
17. Perry JD, Butterworth La. Evaluation of a new chromogenic medium, Uriselect 4, for the isolation and identification of urinary tract pathogens. *J Clin Pathol* 2003;56:528-531 (R19).
18. Edberg S, Kontnick C. Comparison of beta-glucuronidase-Based Substrate Systems for Identification of Escherichia Coli. *Journ. Clin Microbiol* 1986; vol24(3):368-371 (R20).
19. Edberg S, Trepeta R. Rapid and Economical Identification and Antimicrobial Susceptibility Test Methodology for Urinary Tract Pathogens. *Journ Clin Microbiol* 1983;Vol18(6):1287-1291 (R21).
20. Retelj M, Harlander T. Chromogenic Media For Urine Cultures can be Cost-effective. *Zdrav Vestn* 2007;76:145-9 (R22).
21. Fallon D, Andrews N. A Comparison of the performance of cystine lactose electrolyte deficient (CLED)agar with Oxoid chromogenic urinary tract infection (CUTI) medium for the isolation and presumptive identification of organisms from urine. *J Clin Pathol* 2002; 55:524-529 (R23).
22. Ciragil P, Gul M. Evaluation of a new chromogenic medium for isolation and identification of common urinary tract pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:108-111 (R24).

23. Matthews B. The structure of E. coli beta-galactosidase. C.R. Biologies 328 2005;549-556 (R25).
24. James A, Chilvers K. Evaluation of p-Naphtholbenzein-beta-D-Galactoside as a Substrate for Bacterial beta-Galactosidase. Appl And Environm Microbiology 2000;66(12):5521-5523 (R26).
25. Rice E, Allen M. Efficacy of  $\beta$ -glucuronidase Assay for Identification of Escherichia Coli bij Defined Substrate Technology. Applied and Environ Microbiol 1990;56(5):1203-1205 (R27).

3) Reference Works, Handbooks, Manuals and Databases

1. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. 2003 Principles and practice of infectious diseases, sixth edition, Elsevier Churchill Livingstone (R28).
2. ChromID CPS 3 Agar manual REF 43 541/43 549 (Biomérieux) 10-2006 (R29).
3. Uriselect 4 (Bio-Rad) Manual 63726/64694 (R30).

4) Posters and abstracts

1. Thomas E, Anderson S. The use of Uriselect 4 Chromogenic Media for Detection of Urinary Tract Pathogens. CACMID 2004 meeting in Regina (R31).
2. Freydiere A. Urichrom III, a new chromogenic medium for urinary tract pathogens: a comparative study with Uriselect 4. ESCMID 14<sup>th</sup> European Congress, Prague, mei 1-4,2004 (R32).

# APPRAISAL

---

## 1. Analytische performantie karakteristieken (analytisch validatierapport)

### 1.1 *Preanalytische beschouwingen (patiënten variabelen, staalselectie)*

#### 1.1.1 Patiënten variabelen

- Vrouwen hebben meer risico voor het doormaken van een UTI gedurende hun leven dan mannen. Dit enerzijds door een korte afstand van de urethrale uitgang tot de peri-anale regio en anderzijds door een bijkomend reservoir voor uropathogene bacteriën in de vagina (R2).
- Voorbeschikkende factoren voor UTI's zijn blaassondes, nefrostomiesondes, nefrolithiasis en een onvolledige blaaslediging. Deze factoren veranderen eveneens het spectrum van de UTI pathogenen (cfr. supra) (R6).
- Hoge leeftijd is eveneens gerelateerd met een verhoogd risico op een UTI. Dit is te wijten aan enerzijds postmenopauzale veranderingen in de vaginale flora, neurologische oorzaken die interfereren met een normale blaaslediging, diabetes mellitus, verminderde flow door verminderde vochtinname, faecale incontinentie, obstructie van de urinaire tractus door benigne of maligne processen, enz...(R10).

Voor het enten van urinestalen werd geen rekening gehouden met de patiëntenvariabelen aangezien ad random consecutieve reeksen urinestalen in duplo werden geënt.

#### 1.1.2 Staalselectie

De kwaliteit van de laboratorium-analyse van klinische stalen is afhankelijk van de kwaliteit van de stalen. Voor urinestalen zijn er verschillende methoden van afname die eveneens de kwaliteit van het staal beïnvloeden.

- Suprapubische punctie is de gouden standaard. Hierbij wordt urine via een steriele naald en spuit transcutaan direct uit de blaas geaspireerd. Eénmalige sondage is een andere techniek om rechtstreeks een urinestaal te bekomen. Deze stalen geven zelden verwarring bij de interpretatie maar de procedure om deze stalen af te nemen is wel invasief.
- Midstream urine wordt bekomen door vooraf de huidplooiën (labia of voorhuid) uit de urinestroom te houden en de urogenitale regio vooraf te wassen met zeep. Tevens wordt de eerste hoeveelheid urine niet opgevangen zodat de urethra doorgespoeld is (R2).
- Collection bags voor kinderen die nog geen staal op bevel kunnen afleveren zijn vaak gecontamineerd met perianale flora en zijn enkel van betekenis bij een negatief resultaat van de cultuur. Indien de cultuur positief is moet een controle door éénmalige sondage worden uitgevoerd (R14).



- Urinestalen van verblijfs catheters kunnen steriel worden afgenomen door urine te aspireren met een naald via de catheter zelf of via een speciaal membraan. Urine in het reservoir kan besmet zijn bij het ledigen zonder dat er een infectie bij de patient aanwezig is (R15). Catheters die lang ter plaatste zitten mogen niet gebruikt worden voor staalafname omwille van een frequente aanwezigheid van andere microbiële flora.
- Ileovesicale afleiding zijn vaak moeilijk te interpreteren door de aanwezigheid van een polymicrobiële bacteriele flora.
- Andere methoden voor het bekomen van een urinestalen zijn invasief en worden enkel door urologen uitgevoerd zoals de percutane nefrostomie.

De meeste uropathogenen groeien goed in urine op kamertemperatuur. De hoeveelheid bacteriën per milliliter zou gedurende 24 uren op 4°Celsius stabiel moeten blijven. Stalen die meer dan twee uren na collectie worden ontvangen zonder evidentie van koeling, moeten worden verworpen met vraag naar een controlestaal (R11). Een correcte afname en snel transport is van groot belang voor een correcte interpretatie van de cultuur. Stalen moeten bij aankomst in het laboratorium meteen verwerkt worden. Indien dit niet mogelijk is, moeten ze in de koelkast worden bewaard. Minder dan 5% van de correct gecollecteerde stalen die onmiddellijk in het laboratorium werden verwerkt, bevatten een mengflora (R12). Uitzonderingen op deze regel vormen de urineculturen van patiënten met een neurogene blaas of verblijfs catheter waar meer frequent een polymicrobiële flora worden aangetroffen (30-80%) (R13).

In ons laboratorium is gemiddeld 32% van de ontvangen stalen te beschouwen als een mengflora waarvoor volgens de criteria in attachment 1.B geen verdere uitwerking vereist is.

### 1.1.3 Media en reagentia

#### A. Chromogene media: inleiding

De laatste jaren komen er steeds meer chromogene cultuurmedia op de markt die zeer handige diagnostische middelen blijken te zijn in de klinische microbiologie (R16). De mogelijkheid om aan de hand van chromogene enzymsubstraten specifieke en exclusieve enzymen aan te tonen, maakt dat deze chromogene media een brede waaier van verschillende micro-organismen rechtstreeks kunnen identificeren (R17). De enzymsubstraten geven bij hydrolyse een kleur af en aan de hand van kleurverschillen worden de pathogenen onderscheiden van de commensale flora. Dit is in tegenstelling tot de traditionele media zoals bloedagar. Op bloedagar groeit een grote variëteit aan bacteriën. Op basis van morfologische kenmerken van de kolonies (vorm, kleur, hemolyse, aspect,...) kan men op bloedagar zelden tot een definitieve identificatie komen en zijn er steeds bijkomende biochemische en/of serologische testen nodig. Voorbeelden van target pathogenen voor chromogene media zijn: *Staphylococcus aureus* (STAU), *Streptococcus agalactiae* (SRAG), *Salmonella* species en *Candida* species (R16). Ook het onderscheid tussen een reïncultuur en mengflora is eenvoudiger door

de kleurverschillen. Dit laatste is van belang bij het interpreteren van urineculturen om tot de diagnose van een urineweginfectie te kunnen komen.

De belangrijkste **voordelen** van deze media zijn dat ze tijd-en reagentia-besparend zijn door het rechtstreeks aantonen of excluderen van pathogenen. Bovendien hebben ze een verhoogde **sensitiviteit** doordat de gekleurde kolonies gemakkelijk tussen de overige flora kunnen worden onderscheiden. Ook kunnen we zeggen dat er een verhoogde **selectiviteit** is omdat de commensale flora minder goed kan groeien dan op de conventionele media.

#### *Gebruik van chromogene media in UZ Gasthuisberg.*

In ons laboratorium worden chromogene media aangewend bij de de surveillantieculturen voor een methicilline resistente Staphylococcus aureus, voor de detectie van Staphylococcus aureus in surveillantieculturen en neuswissers en ook voor de differentiatie van gisten worden C-platen gebruikt.

#### Chromogene substraten.

Een ideaal chromogeen substraat moet bij hydrolyse een gekleurd product afgeven dat uitsluitend gelokaliseerd blijft ter hoogte van de microbiële kolonies. Het substraat en de gevormde producten mogen de bacteriële groei niet remmen.

**Indoxyl substraten.** Vrijzetting van indoxyl na hydrolyse door een specifiek bacteriële enzym kan leiden tot de vorming van een helder indigo-kleur. Dit is te wijten aan de spontane dimerisatie van de indoxylmoleculen bij contact met zuurstof. Voorbeelden van deze substraten zijn: glucoside, galactoside en glucuronide derivaten (R18).

**Metaalchelatoren.** Hydrolyse van bijvoorbeeld esculine leidt tot de vorming van 6,7-dihydroxycoumarin hetgeen ijzer bindt en een donker bruin/zwart complex vormt. Het nadeel van dit complex is de diffusie over de bodem zodat interpretatie van een mengflora onmogelijk wordt. Gemodificeerd esculine (3,4-cyclohexenoesculetin) is een glycoside en een goed substraat voor de detectie van  $\beta$ -glucosidase. 8-Hydroxyquinoline is een andere metaalchelator. Het nadeel van deze laatste is de toxiciteit voor grampositieve bacteriën zodat de gebruik ervan eerder beperkt is (R16).

**Fenolen.** De fenolen worden gebruikt voor de detectie van glycosidasen en esterasen en kunnen aangewend worden voor het opsporen van Candida spp en Salmonella spp. (R16)

### **B. Detectie van urinaire pathogenen**

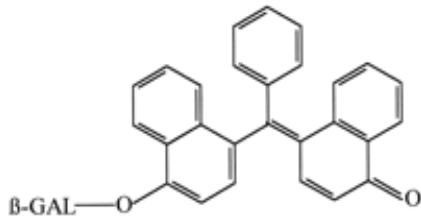
De chromogene substraten die meestal aangewend worden voor de detectie van urinaire pathogenen zijn  **$\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -galactosidase en  $\beta$ -glucosidase.**

De  **$\beta$ -glucuronidase** activiteit wordt toegeschreven aan Escherichia, Shigella en Salmonella species binnen de familie van de Enterobacteriaceae. (R20). E. coli is dus over het algemeen de enige pathogeen die in de urine voorkomt en die kan worden gedetecteerd op basis van productie van  $\beta$ -glucuronidase. Tevens is er indolproductie en ontbreekt oxidase-productie. Een studie uitgevoerd door

*Edberg et al* toonde aan dat 7% van de 381 bestudeerde *E. coli*'s  $\beta$ -glucuronidase negatief waren en dus op een conventionele manier dienden geïdentificeerd te worden (R21). *Rice* toonde aan in een studie dat 95.5% van de *E. coli* isolaten  $\beta$ -glucuronidase positief zijn na 24 uur incubatie en 99.5% na 28 u incubatie. Dit maakt het  $\beta$ -glucuronidase een goed substraat voor de detectie van *E. coli* (R27).

**$\beta$ -galactosidase** hydrolyseert lactose en andere  $\beta$ -galactosiden tot monosacchariden (bv. galactose en glucose). *E. coli*  $\beta$ -galactosidase is een 464 kDa tetrameer (R25). Indoxyl galactosiden hebben als voordeel dat de vrijgekomen substraten in een vast medium een onoplosbaar gekleurd product kunnen vormen die gelokaliseerd blijven ter hoogte van de bacteriële kolonie. De p-naftolbenzein  $\beta$ -galactopyranoside (PNB-Gal) is bijvoorbeeld een goed chromogeen substraat voor de detectie van  $\beta$ -galactosidase activiteit en detecteert 94.3% van de  $\beta$ -galactosidase producerende stammen. Bij hydrolyse wordt dit vrijgegeven en vormt dan lokaal ter hoogte van de bacteriële kolonies een roze kleur (R26).

**FIGUUR 1: structuur van PNB-Gal**



Het gebruik van  $\beta$ -galactosidase in chromogene media vermindert de specificiteit van de identificatie van de *E. coli* wanneer er geen indoltest wordt uitgevoerd. *Fallon et al* toonde aan dat 11 van 15 *Citrobacter* species geïdentificeerd werden op basis van roze kolonies vergelijkbaar met de *E. coli* (Oxoid urinary tract medium, CUTI). De indoltest kan in de meeste gevallen deze foutieve identificatie ongedaan maken tenzij bij de *Citrobacter koseri*. Een andere potentiële marker om *Citrobacter* species van *E. coli* te onderscheiden is de cephalaxine resistentie. Resistente stammen die PYR (pyrrolidonylaminopeptidase, Rosco) positief zijn, kunnen als *Citrobacter* species worden beschouwd (R23).

**$\beta$ -glucosidase** wordt bijna een eeuw in bacteriologische cultuurmedia gebruikt. Het meest gebruikte substraat is esculine. Na hydrolyse vormen de gevormde producten (esculetine) een bruin-zwart complex in aanwezigheid van ijzer. Het nadeel van esculine is dat het gevormde complex zwemt over de bodem en zo het onderscheid tussen al of niet  $\beta$ -glucosidase producerende kolonies moeilijk maakt in een mengflora. Nu zijn er ook synthetische glucosiden beschikbaar voor de detectie van  $\beta$ -glucosidase. Deze zijn gebaseerd op indoxyl en zijn gehalogeneerde derivaten. Voor Enterobacteriaceae is 8-hydroxyquinoline- $\beta$ -D-glucoside een goede keuze omwille van de beperkte interactie met grampositieve bacteriën (R18).  $\beta$ -glucosidase wordt gebruikt voor de detectie van *Klebsiella*, *Enterobacter* en *Serratia* (R16).

**Tryptofaan** wordt ook nog aan de chromogene media voor urinaire pathogenen toegevoegd voor het aantonen van tryptofaan deaminase activiteit in de Proteus-Providencia-Morganella groep. Proteus mirabilis is, met uitzondering van de Proteus penneri de enige van deze groep die indol negatief is hetgeen een rechtstreekse identificatie met enkel aanvullend een spot-indoltest mogelijk maakt (R16).

Voorbeelden van commercieel beschikbare media:

**BBL CHROMagar Orientation medium** (Diagnostic Systems)

Exacte samenstelling is niet gekend maar de enzymatische activiteiten die worden gebruikt voor verdere detectie zijn:  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase en tryptofaan deaminase.

**Oxoid urinary tract medium**

Deze bodem bevat X-Glu dat zich gaat richten tegen het  $\beta$ -galactosidase dat de blauw-turquoise kleur doet ontstaan eigen aan de enterokokken. Een tweede chromogeen in de bodem is Red-Gal. Deze stof wordt gesplitst door het enzym  $\beta$ -D-galactosidase dat wordt geproduceerd door de E. coli. Dit geeft een roze kolonie als resultaat. Tryptofaan is verantwoordelijk voor de bruine kolonies bij de PMP-groep.

**Uriselect 4** (Bio-Rad)

Cfr. infra C

**ChromID CPS3** (Biomérieux)

Cfr. Infra D

Sommige centra voeren aanvullend bij de aanwezigheid van de roze kolonies op de agar nog een  **$\beta$ -glucuronidase test** uit om de ESCO's met zekerheid te bevestigen. Het testsubstraat bij deze test is para-nitro-fenyl- $\beta$ -glucuronide (Rosco-tablet) dat aan een dense suspensie van bacteriën in 0.25mL fysiologisch serum wordt toegevoegd. Dit geheel wordt 4 uren of overnacht geïncubeerd. Het afgesplitste p-nitrofenol geeft een gele kleur en duidt op een positieve test. De firma's van de verschillende chromogene platen voor UTI's beschouwen deze bijkomende test als overbodig.

**C. Uriselect 4 (Bio-Rad)**

Uriselect 4 is een chromogeen medium voor urineculturen van de firma Bio-Rad. Het is geschikt voor de isolatie en telling van alle urinaire pathogenen. In tegenstelling tot andere chromogene media (bv. CPS) voor urineculturen maakt deze bodem geen gebruik van  $\beta$ -glucuronidase voor de detectie van E. coli, maar van  $\beta$ -galactosidase. Uriselect 4 incorporeert twee chromogene substraten namelijk de  $\beta$ -galactosidase (E. coli) en de  $\beta$ -glucosidase voor de enterokokken en de KES (Klebsiella, Enterobacter en Serratia) groep. De niet-E. coli stammen die  $\beta$ -galactosidase positief zijn, zijn ook  $\beta$ -glucosidase positief zodat ze een ander kleuraspect (blauwpaars) krijgen dan de E. coli stammen. Tryptofaan is ook aanwezig in de bodem om tryptofaan deaminase activiteit te detecteren aan de hand van een bruine kleur die de bodem volledig doordringt, typisch voor de leden van de Proteus groep. De opaque achtergrond van de platen maakt dat de kleurverschillen meer opvallen.

*Interpretatie (cf. schema infra)*

Escherichia coli: identificatie gebaseerd op de activiteit van twee enzymen:  $\beta$ -galactosidase en  $\beta$ -glucosidase splitst het eerste chromogene substraat in het medium. Dit veroorzaakt een roos-verkleuring van de kolonies. De E. coli is  $\beta$ -glucosidase negatief en indol positief.

Enterokokken: produceren een  $\beta$ -glucosidase (esculinase) hetgeen een tweede chromogeen substraat splitst en de kolonies turquoos blauw verkleurt.

KESC: stammen die  $\beta$ -glucosidase produceren verkleuren spontaan blauw paars.

Proteae: stammen die tryptofaan deaminase activiteit bezitten, verkleuren licht-tot donkerbruin. Proteus mirabilis heeft geen  $\beta$ -glucosidase activiteit en is indol-negatief.

**TABEL 4: Karakteristieken van de meest voorkomende urinaire pathogenen**

Bacterie	Ø in mm kolonies	Kleur kolonies	B-galactosidase	B-glucosidase	Indol	TDA
ESCO	1.5-3.0	roos	+	-	+	-
PRMI	2.0	geelbruin	-	-	-	+
Indol+ Proteus	2.0	geelbruin	-	-	+	+
Enterokokken	0.5-1.5	turquoos-blauw	-	+	-	-
KES	2.0-3.0	blauw-paars	+(-)	+	+/-	-

Voor optimale kleuromslag dienen de bodems te worden geïncubeerd op 37°C gedurende 18-24 uren (R30). De Uriselect 4 platen zijn niet gevalideerd voor rechtstreekse gevoeligheidsbepaling op VITEK 2 (Biomérieux).

#### *Correlatie met de huidige methode*

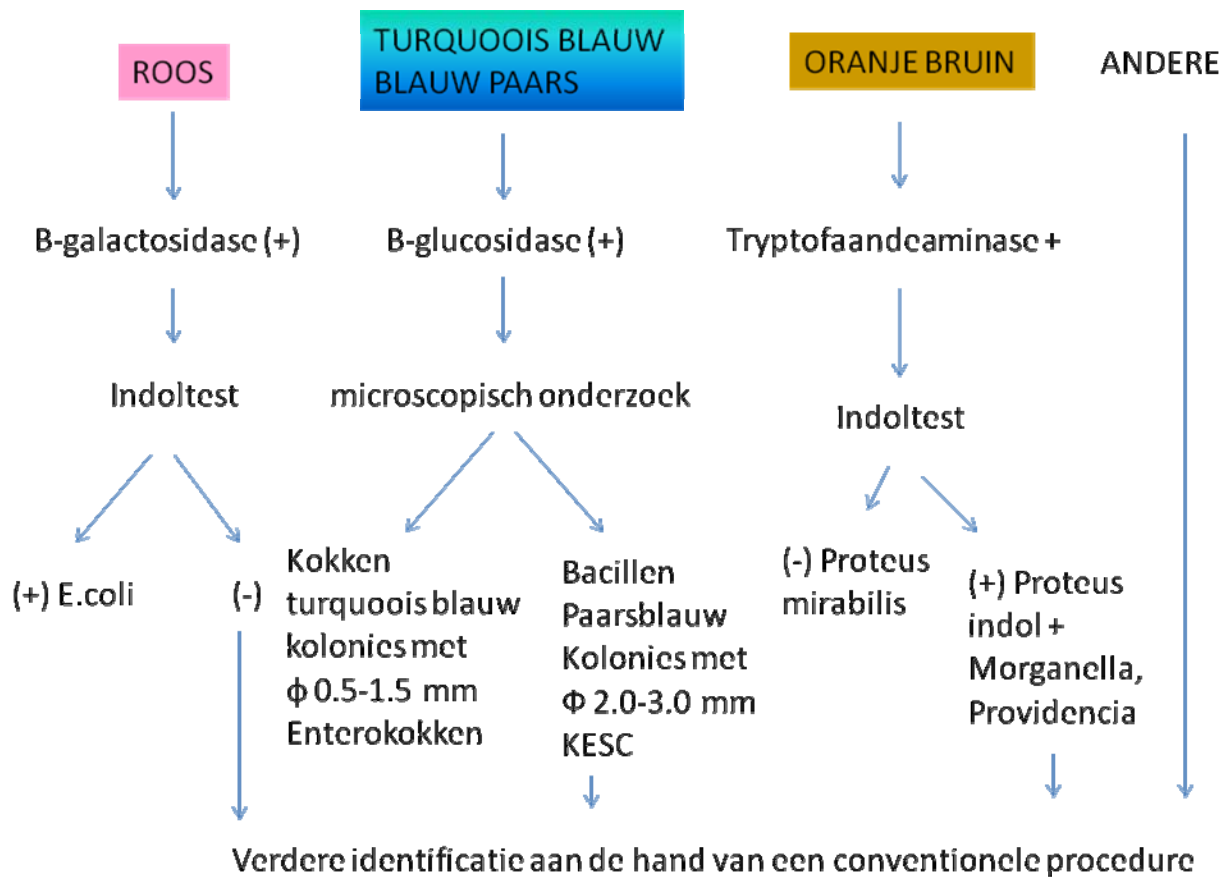
*Perry et al* hebben 777 urinestalen vergeleken op een CLED agar (cystine lactose elektrolyte deficient), Uriselect 4 en CPS ID2 agar. De CLED agar is een conventioneel medium terwijl de andere twee chromogene media zijn. Proteus spp zwermen niet over de plaat en er kan ook een onderscheid gemaakt worden tussen lactose fermenters en lactose non fermenters. De CLED agar toonde de slechtste sensitiviteit door 9.1% van de stammen te missen. Uriselect 4 en CPS ID2 misten elk maar 1.7% en 2.7%. De specificiteit voor de detectie van E. coli was voor beide media erg hoog (98% voor de Uriselect 4 en 99.7% voor de CPS ID2). De indol spottest verhoogde de specificiteit van beide media zelfs tot 100%. Ook voor de identificatie van Proteus species, enterococcus species kon een specificiteit van 100% bekomen worden (R19).

Thomas *et al* hebben in 2004 op 587 urinestalen aangetoond dat Uriselect 4 een medium is dat als 'single plate' kan gebruikt worden bij de evaluatie van urineculturen. Tevens kon identificatie en gevoeligheidsbepaling rechtstreeks vanop de plaat worden ingezet (80% correlatie voor de primaire gevoeligheidsbepaling en 95% correlatie voor identificatie van micro-organismen tussen Uriselect 4 en de conventionele media) (R31).

Retelj M *et al* toonde aan dat het gebruik van Uriselect 4 een gelijkwaardige tot betere sensitiviteit (93.5% tegenover 94.2% voor CLED-agar) heeft, een betere detectie van mengflora toelaat en de tijdsduur tot identificatie verkort zonder verhoogde kosten in vergelijking met conventionele media (CLED agar (cysteine lactose electrolyten deficiënt) (R22).

In een vergelijkende studie op 207 urinestalen met Urichrom III agar (International Microbio, Signes, France) uitgevoerd door Freydiere haalde de Uriselect 4 bodem een sensitiviteit van 94.8% voor de E. coli identificatie tegenover 90.4% voor de Urichrom III agar die  $\beta$ -glucuronidase als substraat gebruikt. (R32).

#### Interpretatie Uriselect 4



### **D. chromID CPS 3 (Biomérieux)**

ChromID CPS3 agar is ook een medium voor de isolatie en identificatie van urinaire pathogenen van de firma Biomérieux. Het is geschikt voor een kwantitatieve bepaling van de geïsoleerde bacteriën en laat toe volgende bacteriële groepen te identificeren: Escherichia coli, Enterokokken, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter (KESC), Proteus, Providencia en Morganella.

De CPS agar bevat een rijke voedingsbodem gecombineerd met verschillende peptonen en 2 specifieke chromogene enzymen ( $\beta$ -glucuronidase en  $\beta$ -glucosidase). Het nadeel van het gebruik van  $\beta$ -glucuronidase is dat 5-8% van de E. coli stammen hiermee gemist worden (R21). De rechtstreekse detectie van indol kan bekomen worden door het toevoegen van tryptofaan aan de bodem. De hoge concentratie agar voorkomt het uitzwermen van een Proteus. Het rechtstreeks identificeren van bacteriën berust op enzymatische reacties. De transparante achtergrond vereenvoudigt het tellen van de kolonies.

#### *Correlatie met de huidige methode*

*Ciragil et al* evalueerden en vergeleken de resultaten voor het uitvoeren van een antibiogram vanop het chromogeen medium. Er was geen significant verschil in antibiotische gevoeligheid in vergelijking met de conventionele media (MAC en BPA). Zij voerden eveneens een kostenanalyse uit die aantoonde dat er 75% kon bespaard worden ten opzichte van de conventionele methode met API-identificaties (R24).

#### *Interpretatie (cf. schema infra)*

Escherichia Coli: stammen die  $\beta$ -glucuronidase produceren verkleuren spontaan roos.

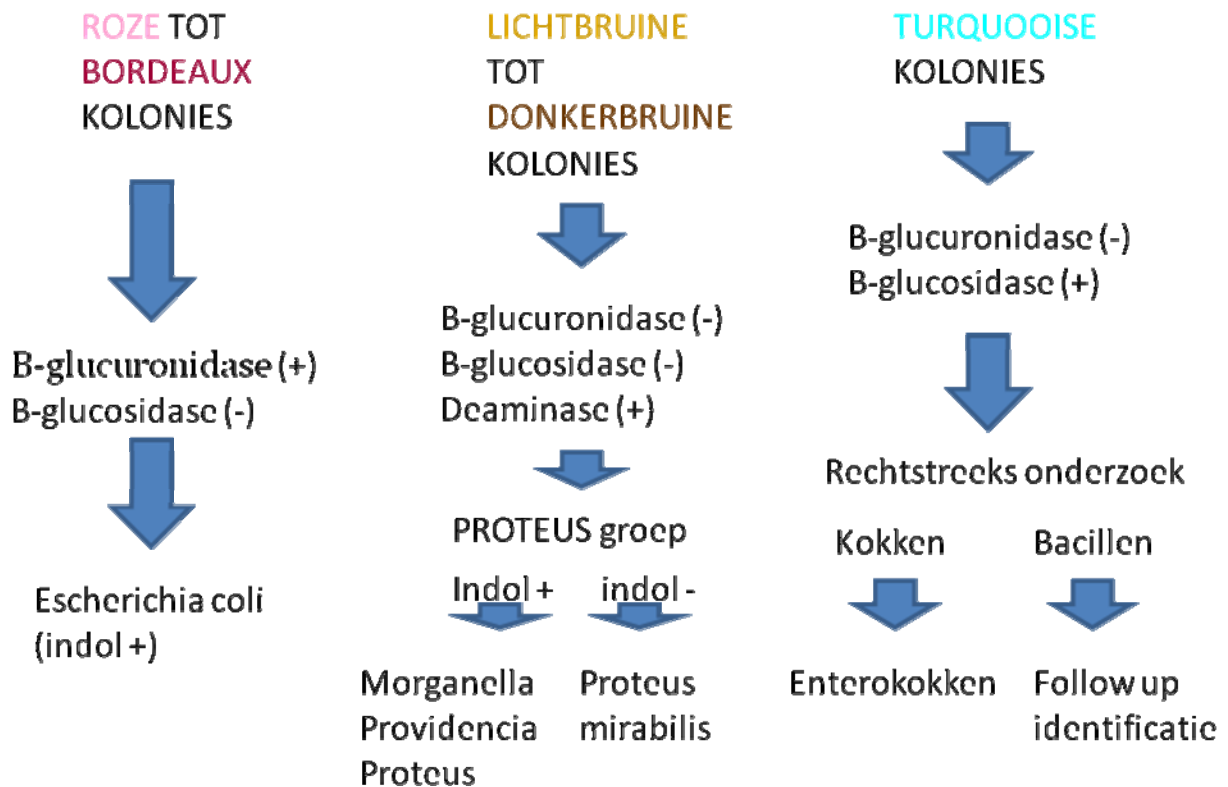
Enterokokken: stammen die  $\beta$ -glucosidase produceren verkleuren spontaan turquois.

KESC: stammen die  $\beta$ -glucosidase produceren verkleuren spontaan bruin-groen.

Proteaeae: stammen die tryptofaan deaminase produceren verkleuren licht-tot donkerbruin.

De platen moeten afgeschermd van licht bewaard worden op 2-8°C. Voor gebruik de platen op kamertemperatuur zetten.

De ChromID CPS 3 platen zijn gevalideerd door de firma Biomérieux voor rechtstreekse gevoeligheidsbepaling op VITEK 2 (Biomérieux)



## 1.2 Analytische beschouwingen

### 1.2.1. Evaluatie van Uriselect 4 tov conventionele methode.

#### VRAAG 1:

Kunnen chromogene bodems (Uriselect 4, Bio-Rad) aangewend worden in de diagnostiek van urineweginfecties? Is rechtstreekse diagnose van Escherichia coli en Proteus mirabilis op kleur betrouwbaar en sneller dan de conventionele methode aan de hand van een biplate BPA/MAC? Kan een identificatie of antibiogram rechtstreeks vanop Uriselect 4 op VITEK 2 gezet worden? Is het mogelijk de halve MAC bodem te vervangen door een halve Uriselect 4 bodem?

#### 1.2.1.1. Methodologie

Als chromogeen medium hebben we voor deze vergelijking Uriselect 4 agar (poeder) gebruikt van Bio-Rad (Marnes-La-coquette, France). De Uriselect 4 werd in gedehydrateerde vorm geleverd en vervaardigd in het laboratorium volgens de bereidingsinstructies. Als conventioneel medium werd een biplate met MAC en BPA gebruikt. Deze conventionele media werden steeds in duplo geënt met het chromogeen medium op willekeurige consecutieve reeksen urinestalen. De vervaardigde bodems



werden allemaal gebruikt binnen de 14 dagen na bereiding. Kovac's reagens werd gebruikt om de indol productie te testen via een spottest rechtstreeks op de Uriselect 4 bodems. Galesculine werd gebruikt voor de identificatie van enterokokken. De identificatie en antibiogrambepaling werden met een suspensie van 0.5 McFarland op de VITEK 2 uitgevoerd. De E. coli en Proteus mirabilis identificatie werden geconfirmeerd aan de hand van een korte reeks (Kligler, Citraat en MIU (mobility, indol and urease)).

### 1.2.1.2. Stalen

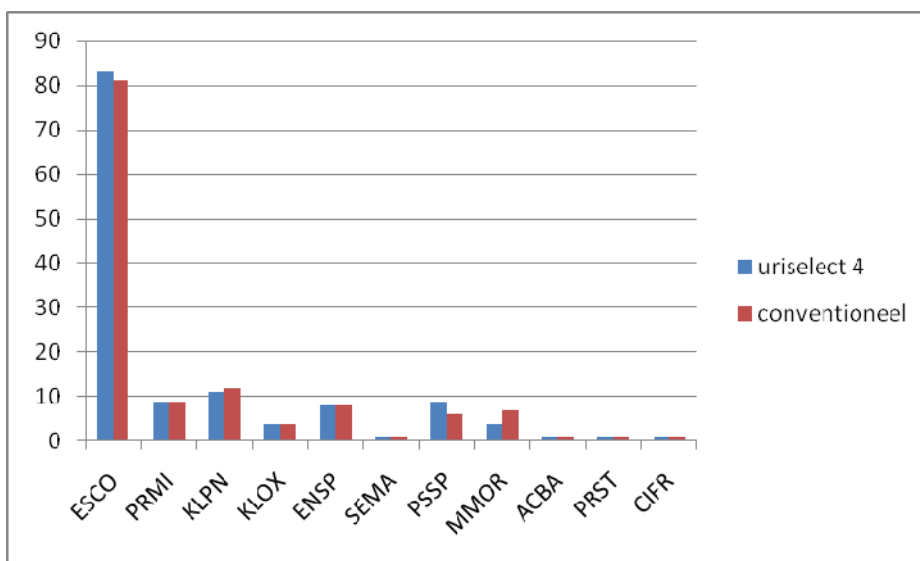
In totaal werden er 986 urinestalen in duplo geënt op een halve plaat Uriselect 4 chromogene agar en op een biplate BPA/MAC. Deze werden na enting overnacht geïncubeerd (12-18u). De stalen geënt na 23 uur werden in de namiddag afgelezen. 628 stalen waren steriel en 102 stalen werden niet uitgewerkt volgens het algoritme omwille van een mengflora (74% van de stalen worden niet verder uitgewerkt). In totaal werden 162 stalen verder uitgewerkt voor identificatie. De resterende 94 stalen (stafylokokken, streptokokken en gisten) werden enkel met een gramkleuring bekeken en niet volledig uitgewerkt omdat dit buiten de doelstellingen van de CAT valt.

Van de 162 uitgewerkte stalen werden er 35 niet verder in rekening gebracht gezien deze louter grampositieve pathogenen en gisten (*Streptococcus agalactiae*, CNS, enterokokken, ...) bevatten die in ons laboratorium via de bloedagar worden uitgewerkt.

### 1.2.1.3. Evaluatie

#### A. Welke pathogenen werden geïsoleerd?

**FIGUUR 2: Vergelijking van de detectie van verschillende gramnegatieve bacteriën op Uriselect 4 versus conventionele media.**



In totaal werden er op de Uriselect 4 bodems 132 gramnegatieve pathogenen geïdentificeerd tegenover 131 op de conventionele media. Er werden twee *E. coli*'s meer gedetecteerd met de Uriselect 4 platen. 8.8% van de stalen toonde een discrepant resultaat tussen de detectie van gramnegatieven. Dit is meestal toe te schrijven aan het **verschil in mengflora's die op de chromogene bodems vaak beter kunnen worden onderscheiden**. De verschillen voor de andere gekweekte gramnegatieve bacteriën waren verwaarloosbaar.

### ***Escherichia coli***

Uriselect 4 kon 83 *E. coli* stammen in het licht stellen (roze kleur op agar) tegenover 81 via de conventionele methode. Het volstaat om na het aflezen van de plaat een indol-spottest uit te voeren voor de definitieve identificatie. Voor mijn studie werden alle *E. coli*'s bevestigd aan de hand van een korte reeks (Kligler, Citraat, MIU).

1 stam was  $\beta$ -galactosidase negatief en kleurde geel. Hierdoor kon deze niet rechtstreeks geïdentificeerd worden doch wel na identificatie op VITEK 2.

Sensitiviteit is berekend op basis van de hoeveelheid ESCO stammen die in totaal konden geïsoleerd worden. De sensitiviteit van de Uriselect 4 bodems voor de detectie van ESCO betrof in mijn studie 98.8%. De specificiteit is 100% in combinatie met de indol-spottest. De Uriselect 4 bodems detecteerden 98.8% van alle geïsoleerde *E. coli* stammen daar waar de conventionele media 96.4% detecteerden.

### ***Proteus mirabilis***

Er konden met beide technieken 8 *Proteus mirabilis*-stammen en 1 *Proteus vulgaris* worden geïdentificeerd. Het onderscheid tussen beide werd gemaakt aan de hand van een negatieve indoltest voor de *Proteus mirabilis*. Eén stam werd foutief als een *Proteus mirabilis* aanzien bij rechtstreekse identificatie. Het betrof een *Morganella morgani* waarvan de indolspottest niet werd uitgevoerd.

De sensitiviteit voor de detectie van PRMI betrof 100%, de specificiteit 88% in combinatie met de indol-spottest. Zowel de Uriselect 4 bodems als de conventionele media detecteerden 100% van de proteus-stammen. Deze resultaten zijn echter met de nodige omzichtigheid te interpreteren gezien de beperkte hoeveelheid stalen.

### ***Andere gramnegatieven***

Andere gramnegatieven die meer dan driemaal geïdentificeerd werden uit de urinekweken werden verder vergeleken tussen de Uriselect 4 en conventionele methode. Het opvallendste was dat er in totaal meer *Pseudomonas* spp (PSSP) werden geïsoleerd vanop de Uriselect 4 platen en duidelijk meer *Morganella morgani*'s (MMOR) vanop de biplate BPA/MAC. (zie tabel 6). Het betreft hier éénmaal een *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE) die werd gemist op BPA/MAC in vergelijking met de Uriselect 4 terwijl er wel een MMOR werd geïdentificeerd via de conventionele methode. Vermoedelijk was de PSAE hier niet uit te zuiveren onder de MMOR. Op een ander staal werd er tweemaal een MMOR geïsoleerd via de conventionele methode terwijl het op de Uriselect 4 een PSSP en een MMOR betrof. Een laatste discrepant staal toonde dan een ENSP en PSSP op Uriselect 4 tegenover

een Enterobacter cloacae en een Enterobacter aerogenes met de BPA/MAC. De verschillen tussen de PSSP, ENSP en MMOR zijn dus terug te brengen tot verschillen in uitzuivering van de stalen **zonder dat er echt een minder goede groei was op één van de media**. Wel weerhouden we een relatief beperkt aantal stalen zodat het moeilijk is om hieruit duidelijke conclusies te trekken. Er werd aanvullend nog een verdunningsreeks voor een PSAE op de 3 media geënt (startconcentratie 1 McFahrland en steeds 10x verdunnen) om een verschil in groei op te sporen. De groei van de PSAE bij verschillende concentraties was volledig vergelijkbaar tussen de BPA, MAC en Uriselect 4.

**TABEL 5: Performantie van Uriselect 4 in combinatie met de indolspottest voor de detectie van ESCO en PRMI**

	sensitiviteit	specificiteit
ESCO	98.8%	100%
PRMI	100%	88%

**TABEL 6: Aantal gramnegatieven gedetecteerd op Uriselect 4 versus conventionele methode**

	Aantal gedetecteerde stammen	Aantal stammen gedetecteerd op Uriselect 4	Aantal stammen gedetecteerd via conventionele methode
Klebsiella pneumoniae	11	10	11
Pseudomonas spp	9 (waarvan 6 PSAE)	9 (6 PSAE, 2 PSSP en 1 PSPU (Pseudomonas putida))	6 (5 PSAE en 1 PSPU)
Enterobacter spp	9	7	8
Morganella morganii	5	3	5
Klebsiella oxytoca	4	3	3

#### **B. Validatie gevoeligheidsbepaling rechtstreeks van Uriselect 4**

De geïsoleerde E. coli's werden enerzijds geconfirmeerd aan de hand van een korte reeks( cfr.supra) en anderzijds werd rechtstreeks vanop de Uriselect bodem een suspensie gemaakt van 0.5 McFahrland om een gevoeligheidsbepaling op VITEK 2 in te zetten. Hiervoor werden de VITEK-kaarten AST-N045 voor urinaire gramnegatieve pathogenen gebruikt. In totaal werden van 76 E. coli's het antibiogram vergeleken met een conventionele plaat. Tevens werden er nog 37 andere gramnegatieven (inclusief 8 Proteus mirabilis) ook op gevoeligheidsbepaling gezet.

De conventionele methode (BPA/MAC) werd als de gouden standaard beschouwd.

De vergelijkingen werden gemaakt aan de hand van een **categorical agreement**. Dit wil zeggen het percentage van de pathogenen die na meting een zelfde categorie heeft, ongeacht de MIC in vergelijking met de suspensie ingezet van een conventioneel medium. Met categorie wordt hier S (sensitive), R (resistant) en I (intermediate) bedoeld.

Naast de categorical agreement is ook het **type van fout** belangrijk. We spreken van very major error, major en minor error.

Een **'very major error'** (VME) kan men omschrijven als een S waar het eigenlijk volgens de conventionele methode een R zou moeten zijn. Dit is een VME omdat hierdoor potentieel een foutieve therapie kan worden ingesteld.

Een **'major error'** (ME) wil zeggen een R waar het volgens de conventionele methode een S zou moeten zijn.

**'Minor errors'** (MI) geven alle verschillen tussen I en S en I en R aan die zelden aanleiding geven tot een andere therapiekeuze.

### *Escherichia coli*

**TABEL 7: Verschillen in gevoeligheidsbepaling BPA/MCA en Uriselect voor de ESCO**

ANTIBIOTICUM	bodem	% MIC's per categorie			% CA	% Errors		
		S	I	R		VME	ME	MI
AMPICILLINE	BPA/MAC	55	3	42				
	URISELECT	57	3	40	96,9	2,6	1,4	0,0
AMOXI-CLAV	BPA/MAC	87	5	8				
	URISELECT	84	5	11	94,8	0,0	0,0	5,2
CEFUROXIME	BPA/MAC	91	4	5				
	URISELECT	92	4	5	97,4	1,3	1,3	0,0
CEFOTAXIME	BPA/MAC	96	0	4				
	URISELECT	97	0	4	100	0,0	0,0	0,0
CEFEPIME	BPA/MAC	100	0	0				
	URISELECT	99	1	0	98,7	0,0	0,0	1,2
NITROFUR	BPA/MAC	95	5	0				
	URISELECT	99	1	0	96,9	0,0	0,0	3,1
PIP-TAZO	BPA/MAC	99	1	0				
	URISELECT	99	1	0	100	0,0	0,0	0,0
MEROPENEM	BPA/MAC	100	0	0				
	URISELECT	100	0	0	100	0,0	0,0	0,0

GENTAMYCINE	BPA/MAC	95	0	5				
	URISELECT	96	0	5	100	0,0	0,0	0,0
LEVOFLOXACINE	BPA/MAC	87	0	13				
	URISELECT	88	0	13	100	0,0	0,0	0,0
TEMOCILLINE	BPA/MAC	100	0	0				
	URISELECT	100	0	0	100	0,0	0,0	0,0
COTRIMOXAZOLE	BPA/MAC	80	0	20				
	URISELECT	79	0	21	98,7	0,0	1,3	0,0

De verschillende antibiotica geven bij de vergelijkende gevoeligheidsbepalingen hoge percentages categorical agreement met zelfs 100% bij de helft van de antibiotica (zie TABEL 7). Alleen voor amoxicilline-clavulaanzuur is er een percentage lager dan 95%. Wel kunnen we hier weerhouden dat het enkel minor errors betreft, dus een verschil tussen S en I of R en I. Very major errors zien we bijna enkel bij ampicilline dat gezien zijn belangrijke resistentie voor ESCO geen eerste keuze-antibioticum is. In TABEL 8 worden van de drie antibiotica die een CA onder de 97% hadden, nog de verschillen in gemeten MIC waarden en de uiteindelijk doorgegeven resultaten naar de kliniek uiteengezet. Hieruit blijkt dat in de helft van de gevallen een hogere MIC waarde vanop de Uriselect 4 werd gemeten en in vijf andere stammen een lagere MIC wat zou kunnen leiden tot een foutieve keuze in antibioticum. Deze laatste verschillen werden alleen teruggevonden bij ampicilline en nitrofurantoïne.

**TABEL 8: Gemeten MIC waarden en doorgegeven categorie uriselect versus conventionele methode (S, I en R) (ESCO)**

						doorgegeven cat	doorgegeven cat
		MIC URI	MIC conv	categorie URI	categorie conv	URI	conv
ampicilline	1	2	32	S	R	S	R
	2	32	2	R	S	R	S
	3	2	32	S	R	S	R
amoxi-clav	1	32	16	R	I	R	I
	2	16	4	I	S	I	S
	3	32	16	R	I	R	I
	4	16	8	I	S	I	S
nitro	1	32	64	S	I	S	I
	2	32	64	S	I	S	I
	3	16	64	S	I	S	I

**Andere gramnegatieven**

**TABEL 9: Verschillen in gevoeligheidsbepaling BPA/MCA en Uriselect voor andere gramnegatieven inclusief Proteus mirabilis**

ANTIBIOTICUM	bodem	% MIC's per categorie			% CA	% Errors		
		S	I	R		VME	ME	MI
AMPICILLINE	BPA/MAC	20	14	66				
	URISELECT	20	14	66	94,6	0,0	0,0	5,4
AMOXI-CLAV	BPA/MAC	59	5	36				
	URISELECT	59	8	33	91,9	0,0	0,0	8,1
CEFUROXIME	BPA/MAC	62	11	27				
	URISELECT	62	8	30	97,3	0,0	0,0	2,7
CEFOTAXIME	BPA/MAC	78	11	11				
	URISELECT	78	14	8	97,3	0,0	0,0	2,7
CEFEPIME	BPA/MAC	97	0	3				
	URISELECT	97	0	3	100	0,0	0,0	0,0
NITROFUR	BPA/MAC	14	19	67				
	URISELECT	11	24	65	94,6	0,0	0,0	5,4
PIP-TAZO	BPA/MAC	95	5	0				
	URISELECT	97	0	3	91,9	0,0	0,0	8,1
MEROPENEM	BPA/MCA	97	0	3				
	URISELECT	97	0	3	100	0,0	0,0	0,0
GENTAMYCINE	BPA/MAC	92	3	5				
	URISELECT	92	0	8	97,3	0,0	0,0	2,7
LEVOFLOXACINE	BPA/MAC	73	3	24				
	URISELECT	73	3	24	100	0,0	0,0	0,0
TEMOCILLINE	BPA/MAC	76	0	24				
	URISELECT	76	0	24	100	0,0	0,0	0,0
COTRIMOXAZOLE	BPA/MAC	73	0	27				
	URISELECT	73	0	27	100	0,0	0,0	0,0

Voor de andere gramnegatieven ligt de categorical agreement voor enkele antibiotica lager dan bij de ESCO (zie TABEL 9). Een reden hiervoor is de kleinere hoeveelheid stalen die in deze analyse werden opgenomen in vergelijking met de ESCO zodat één enkel verschil een groter verschil in

percentages geeft. Wel weerhouden we hier geen very major en major errors. Alle verschillen zijn hier terug te brengen tot minor errors. Vooral voor de amoxicilline-clavulaanzuur en piperacilline-tazobactam ligt de CA wat lager, namelijk 91.9%. Van de antibiotica die een CA onder de 95% hadden, werden de verschillen opnieuw bekeken voor wat betreft de gemeten MIC waarden en welke categorie door VITEK 2 na interpretatie werd doorgegeven aan de klinici (TABEL 10). Hieruit blijkt dat bij de helft van de stalen uiteindelijk toch hetzelfde resultaat naar de kliniek werd gecommuniceerd. Bij de overige vijf stalen werd er tweemaal een hogere MIC gemeten vanop de Uriselect 4 bodem en driemaal een lagere MIC. Dit verschil kan mogelijk partieel worden toegeschreven aan concentratieverschillen van de suspensie. Slechts bij 2 stalen waar een S werd gemeten zou dit kunnen leiden tot een andere antibiotica-keuze.

**TABEL 10: Gemeten MIC waarden en doorgegeven categorie uriselect versus conventionele methode (S, I en R) (andere gramnegatieven)**

						doorgegeven	doorgegeven
		MIC URI	MIC conv	categorie URI	categorie conv	URI	conv
ampicilline	1	32	16	R	I	R	R
	2	16	16	I	R	R	R
amoxi- clav	1	16	16	I	R	R	R
	2	8	16	S	I	S	I
	3	16	8	I	S	I	S
nitro	1	64	128	I	R	I	R
	2	64	64	I	R	R	R
pip-tazo	1	64	64	S	I	I	I
	2	8	64	S	I	S	I
	3	64	8	I	S	I	S

### 1.2.2. Vergelijking van Uriselect 4 tov ChromID CPS 3

#### 1.2.2.1. Stalen

Het betreft hier een kleinschalige vergelijking vooral naar directe verschillen in gebruik van chromogene agar. De hoeveelheid stalen was te beperkt om vlot met de CPS 3 bodems te leren werken. Er werden 75 ad random consecutieve urinestalen geënt op zowel een biplate MAC/BPA, Uriselect 4 en als op een CPS 3 agar.

### 1.2.2.2. Evaluatie van resultaten

48 stalen waren steriel. 12 stalen betroffen een mengflora. Van de 12 uitgewerkte stalen waren er bij 3 stalen discordantie tussen de gebruikte detectiemethoden. Eénmaal betrof het een verschil tussen de conventionele methode waar er maar twee soorten kolonies konden gezien worden en de twee chromogene methoden die een duidelijke mengflora in het licht konden stellen. De twee andere verschillen zijn: 1) op CPS en MAC maar 1 soort GNS (CIFR) te zien terwijl op de Uriselect ook nog een ESCO aanwezig was; 2) 1 soort GNS op CPS, twee soorten GNS op conventionele methode (ENCL, ENAE) en doch verschillend op Uriselect 4 (KLOX, ENSP). Bij deze laatste twee platen waren er tweemaal mengflora's bij eerste inspectie die voor identificatie dienden te worden uitgezuiverd.

Voor wat betreft de rechtstreekse identificatiemogelijkheden werden er 3 reinkulturen met ESCO geïdentificeerd. Er was geen verschil in groei voor wat betreft deze stammen op de Uriselect 4 en CPS3. Er was geen PRMI in de reeks stalen.

#### VRAAG 2

Is er een verschil tussen de Uriselect 4 (Bio-Rad) en de CPS ID 3-bodems (Biomérieux)?

Gezien de **beperkte hoeveelheid stalen** kunnen er dan ook **geen conclusies** naar verschillen in sensitiviteit en specificiteit tussen beide media worden gemaakt. Wat de gebruiksvriendelijkheid en kostprijs van de bodems betreft, kunnen wel enkele indrukken worden weergegeven. Er zijn immers nog **geen vergelijkende studies** tussen deze twee soorten chromogene agar gepubliceerd.

- 1) De kleurschakeringen en intensiteit van de kleuren zijn duidelijker op de Uriselect 4 zodat mengflora sneller en eenvoudiger kan worden geïnterpreteerd.
- 2) De groene kleur als gevolg van de  $\beta$ -glucosidase activiteit op de chrom ID CPS3 plaat is gelijkaardig voor de enterokokken en KES-groep zodat een gramkleuring noodzakelijk is om een onderscheid te maken tussen grampositief of gramnegatief.
- 3) ChromID CPS 3 bodems zijn duurder in vergelijking met de Uriselect 4 (cfr.infra). Uriselect 4 bodems kunnen in onze eigen keuken op bacteriologie worden bereid zodanig dat we kunnen opteren voor een gebruik van halve platen.
- 4) De chromID CPS 3 platen zijn voor wat betreft de gevoeligheidsbepaling gevalideerd op VITEK 2 door Biomérieux.

## **2. Conclusies**

### *2.1 Conclusies appraisal*

#### 2.1.1. Voordelen en nadelen chromogene agar



#### Voordelen Uriselect 4

- Groot aantal urinestalen komen dagelijks in het laboratorium, slechts een klein aantal is significant. Voornaamste pathogeen (ESCO) kan rechtstreeks (en ook andere PRMI) geïdentificeerd worden. B-galactosidase als chromogeen substraat, zodat de  $\beta$ -glucuronidase negatieve E. coli's niet gemist worden. 99% van de ESCO's hebben  $\beta$ -galactosidase activiteit.
- Snelle identificatie van bepaalde pathogenen met reductie van TAT.
- Gemakkelijk onderscheid van mengflora's door kleurverschillen.
- Geen uitzwermen van Proteus-species.
- Gebruiksvriendelijk, gemakkelijk aan te leren.
- Indol, katalase en oxydase testen mogen rechtstreeks vanop de chromogene bodem worden uitgevoerd.
- Ondanks duurdere aankooprijds van chromogene agar toch kostenbesparend (cfr.infra).
- Antibioqram voor ESCO kan na uitvoeren van studie vanop de chromogene bodem worden ingezet.

#### Nadelen Uriselect 4:

- Indruk van minder goede groei van grampositieven en soms gisten. Bloedagar heeft een bijkomend voordeel dat het aspect van streptokokken ( $\alpha$ -,  $\beta$ - of niet-hemolytisch) kan worden beoordeeld.
- Duurder in aankooprijds dan conventionele media.
- Geen reductie in arbeidsduur.
- Beperkingen: (1) sommige bacteriën van KES groep hebben een zwakke  $\beta$ -galactosidase activiteit wat dan meer een turquois aspect van de kolonies geeft; (2) enkele ESCO's zijn indol negatief; (3) licht blauwe kolonies zijn niet met zekerheid enterokokken; (4) enkele stammen van Proteus vulgaris en Providencia rettgeri produceren  $\beta$ -glucosidase. (5) Staphylococcus saprophyticus kan ook een roze kleur geven. (6) Proteus penneri is indol negatief.

#### **2.1.2. Turn around time (TAT)**

Urineculturen worden dagelijks uitgevoerd. De urine wordt geënt en overnacht geïncubeerd. De stalen die na 23u worden geënt, lezen de MLT's in de namiddag af, de overige lezen de MLT's 's morgens om 8u30 af. De TAT is 12-24u voor het aflezen. De tijd tot diagnose is afhankelijk van verdere identificatie via VITEK 2, bijkomende testen (galesculine) en eventueel noodzaak tot uitzuiveren van bepaalde pathogenen vooraf aan identificatie en bedraagt gemiddeld 24-36u.

Door het gebruik van chromogene agar kan de TAT voor de identificatie van ESCO en PRMI die rechtstreeks worden afgelezen gereduceerd worden naar 12-18h ipv 24-36u. Dit wil zeggen een **reductie in TAT voor de identificatie van ESCO en PRMI (ongeveer 40% van de potentieel pathogenen) van 6-12 uren.**



#### **2.1.4. Financiële impact voor het laboratorium**

##### VRAAG 3:

Wat zijn de financiële gevolgen bij eventuele overschakeling op chromogene bodems?

##### Kostprijs van verschillende benodigdheden:

- Vitek cards ID GN (Biomérieux): € 64,75 per doos van 20 kaarten (€ 3.2/kaart)
- Vitek cards AST-N045 (Biomérieux): € 64.75 per doos van 20 kaarten (€ 3.2/kaart)
- ChromID CPS 3-platen (Biomérieux): € 116.24 (inclusief BTW) per 100 platen (**€ 1.16 per plaat**)
- Uriselect 4 (BioRad): € 212.19 (inclusief BTW) per pot van 500 g poeder  
56.8 g per liter  
111 platen per liter (9 cc voor een biplate, 18 cc voor een volledige plaat)  
maximaal 8.8 liter per pot (978 biplates): **€ 0.22 per plaat zonder plastic.**
- McConkey agar (Oxoid): € 23.18 (inclusief BTW) per pot van 500 g poeder  
51.5 g per liter  
111 platen per liter (9 cc voor biplate)  
Maximaal 9.7 liter per pot (1078 biplates): **€ 0.022 per plaat zonder plastic**

##### Kostenberekening

Er zijn gemiddeld een 469 ESCO's en 83 PRMI's per maand (552 stammen die rechtstreeks geïdentificeerd kunnen worden).

Wat de werkuren betreft is er geen verschil tussen het al dan niet incorporeren van de platen in onze routine aangezien voor AB-bepaling nog steeds een suspensie van 0.5 McFahrland moet worden gemaakt hetgeen het meeste tijd vraagt vooraleer de suspensies op VITEK kunnen worden ingezet.

De potentiële winst door het uitsparen van identificatiekaarten voor VITEK 2 door de rechtstreekse diagnose is **1500.8 euro per maand voor enkel de ESCO's en 1766.4 euro voor ESCO en PRMI.**

Hier staat wel tegenover dat de chromogene agar duurder is dan de MAC. Er worden gemiddeld 5254 urineculturen per maand geënt. Dit wil zeggen dat we voor halve MAC-bodems ongeveer **115.59 euro per maand** moeten betalen. Voor de Uriselect 4 halve bodems bedraagt (wanneer we de platen zelf vervaardigen) de kostprijs **per maand ongeveer 1155.88 euro.**

(Ter vergelijking zou de catalogusprijs per maand voor de CPS 3 bodems 6094 euro per maand bedragen)

Dit wil zeggen dat we in totaal voor de bodems met het in mindering brengen van de MAC **1040.29 euro** moeten betalen. Dit is wel de catalogusprijs van de chromogene agar. Bij aankoop zou over de prijs met de firma nog kunnen onderhandeld worden.

Totale winst per maand is dus het uitsparen van de VITEK 2 in mindering gebracht met de kostprijs van de chromogene agar.

**De totale winst per maand bedraagt 460.51 euro indien we enkel ESCO's rechtstreeks identificeren.**

**De totale winst per maand bij rechtstreekse identificatie van ESCO en PRMI bedraagt 726.11 euro.**

**TABEL 11: Mogelijke winst per maand in euro**

	kostprijs per maand	kostprijs identificatie VITEK	totaal
MAC	115,59	ESCO: 1500,80	1616
		ESCO + PRMI: 1766,4	1882
Uriselect	1155,88		1156
		WINST per maand in euro	<b>726</b>

## COMMENTS

---

De studie uitgevoerd op een 1000-tal urinestalen toont dat de chromogene agar zeer geschikt is voor de rechtstreekse detectie van *Escherichia coli* en *Proteus mirabilis*. Voor het chromogeen medium, Uriselect 4, dat in onze studie werd gebruikt, is er geen validatie voor gevoeligheidsbepaling. De vergelijkende studie met een grotere groep *E. coli*-stammen (76) is indicatief dat de bodem betrouwbaar is voor het uitvoeren van een antibiogram. Voor wat betreft de overige **gramnegatieven** is de bestudeerde hoeveelheid stammen te beperkt (37) en dient deze reeks eventueel te worden **uitgebreid** om een definitief oordeel te kunnen maken.

Verschillende vergelijkende studies verdedigen het gebruik van chromogene agar als **'single plate'** methode voor de detectie van urinaire pathogenen. Tijdens het aflezen van de platen, bleek er toch soms minder groei te zijn vooral dan van de grampositieven en gisten. Bloedagar moet zeker verder gebruikt worden omdat dit medium de isolatie en discriminatie van grampositieven vereenvoudigd. Om deze reden lijkt het ons aangewezen om een biplate bloedagar/Uriselect 4 te gebruiken in de routine work-up voor urineculturen.

De kostprijzen die in deze CAT worden gehanteerd zijn **catalogusprijzen**. Onderhandeling met de firma zouden nog een reductie in de aankoop prijs van Uriselect 4 kunnen geven.

## **To do/ACTIONS**

---

- 1) Gaan we de Uriselect 4 implementeren in onze routine op de werkpost urinecultuur?  
Opleiding geven aan de MLT's om met de chromogene agar te leren werken. We kunnen eventueel een proefperiode inlassen om de laboranten vertrouwd te maken met deze nieuwe bodems en de aanpassing van het algoritme bij de interpretatie van urinestalen. In tussentijd kan dan nog de MAC verder worden gebruikt om de reeks gramnegatieven (vergelijking gevoeligheid) uit te breiden (cfr. punt 2)
- 2) Uitbreiden van de groep gramnegatieven waarop we bijkomend een antibiogram uitvoeren vanop de Uriselect 4 om een degelijke validatie voor de gevoeligheidsbepaling te bekomen.

## **ATTACHMENTS**

---

### **Attachment 1**

1. **A: uitzicht van verschillende bacteriën op conventionele voedingsbodems (=SOP-036 Tabel 2)**

<b>Uitzicht op de geënte voedingsbodems van de meest voorkomende mogelijke pathogenen in urine</b>		
	<b>bloedagar</b>	<b>McConkey</b>
gramnegatieve staven	glanzende kolonies, soms slijmerig, + geur	groei als coliforme(roze-rode) of lactose negatieve (kleurloze) kolonies
Proteus spp.	overgroei door uitzwerming typische geur bloedagar wordt door de uitzwerming soms onleesbaar	lactose negatief
stafylokokken	glanzende kolonies wit tot goudgeel met of zonder $\beta$ -hemolyse; katalase positief	geen groei
enterokokken	kleinere grijze kolonies met of zonder $\beta$ -hemolyse; katalase negatief	geen groei

streptokokken van groep B	grijs-witte kolonies met een smalle zone van $\beta$ -hemolyse; katalase negatief	geen groei
gisten	witte kolonies met eventueel uitlopertjes; katalase positief maar zwakker dan bij stafylokokken	geen groei
corynebacteriën	kleine punctiforme tot grotere grijze kolonies; katalase positief	geen groei
lactobacillen	kleine kolonies niet-hemolytisch tot lichte $\beta$ -hemolyse; katalase negatief	geen groei

**1. B: Verdere identificatie aan de hand van het aantal kolonies en de staalkenmerken (afname, pyurie) (= SOP-036 Bijlage 1)**

	< 10 10 <sup>3</sup> /mL	10 – 100 10 <sup>3</sup> /mL	>100 10 <sup>3</sup> /mL
Geloosd, midstream			
zonder pyurie	-	Id + AB indien reïncultuur	Id + AB indien max 2 soorten MO
met pyurie	Id + AB indien reïncultuur	Id + AB indien max 2 soorten MO	Id + AB indien max 2 soorten MO
Uit verblijfsonde			
zonder pyurie	-	Id + AB indien reïncultuur	Id +AB indien max 2 soorten MO
met pyurie	-	Id + AB indien max 2 soorten MO	Id + AB indien max 2 soorten MO
Suprapubische punctie	Id +AB van elk MO	Id +AB van elk MO	Id +AB van elk MO

MO = microorganisme

zonder pyurie =  $\leq 20$  WBC/microL bij automatische telling en  $\leq 9$ /microL bij microscopische telling

mét pyurie =  $> 20$  WBC/microL bij automatische telling en  $> 9$ /microL bij microscopische telling

