

FLEXICULT® VET
URINTEST

STATENS
SERUM
INSTITUT



Udarbejdet af

Mette Bendixen, produktspecialist og Mette Kernn, Cand.Pharm., PhD

Layout

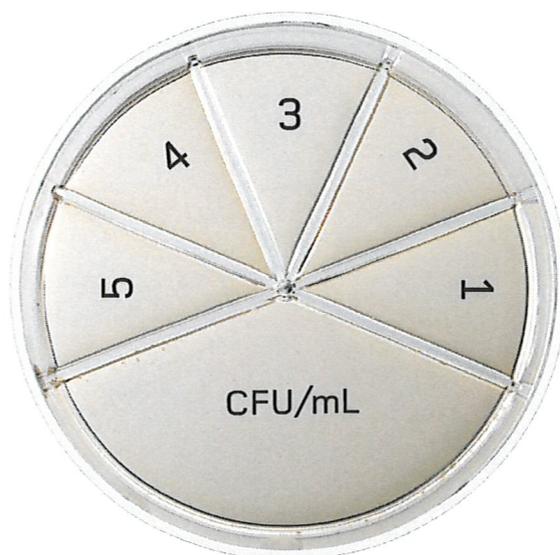
Anja Bjarnum/Kristian Teilmann Frederiksen

Flexicult® Vet er et 24-timers dyrkningskit til diagnosticering af urinvejsinfektioner (UVI) hos hunde og katte, som gør det muligt at:

- identificere og kvantificere bakterier
- bestemme følsomheden over for 5 udvalgte antibiotika
- følge de nye danske guidelines for diagnostik og antibiotikabehandling fra SvHKS^[1] under Den Danske Dyrlægeforening

Dyrkning af urin er den eneste sikre metode til at stille diagnosen urinvejsinfektion, og derudover anbefales det, at en behandling af alle urinvejsinfektioner baseres på resistensbestemmelse.^[1]

Flexicult® Vet består af en dyrkningsplade med ét stort tællefelt til kvantitativ bestemmelse (CFU/mL) og 5 mindre felter der indeholder hvert deres antibiotikum.



Flexicult® Vet indeholder følgende antibiotika:

- 1 = Ampicillin (indikator for præparater der kun indeholder amoxicillin)
- 2 = Amoxicillin/klavulansyre
- 3 = Oxacillin (indikator for methicillin resistent Staph. pseudintermedius (MRSP))
- 4 = Enrofloxacin
- 5 = Trimethoprim/sulfamethizol (indikator for præparater med trimethoprim kombineret med sulfonamid)

Flexicult® Vet er enkel at anvende og er udviklet til brug hos dyrlæger og i laboratorier. Kun til *in vitro* veterinær diagnostisk brug.

Baggrund

Kriterier for urinvejsinfektion

Incidensen af urinvejsinfektioner er større hos hunde end hos katte, men rapporteres meget forskelligt i litteraturen. Diagnosen UVI stilles ved påvisning af urinvejspatogener, dvs. mikroorganismer i urinen.

Har en hund eller en kat et eller flere af nedenstående symptomer, og findes der urinvejspatogener i en koncentration på $>10^3$ CFU/mL i en urinprøve taget ved cystocentese, så er der indikation for en urinvejsinfektion.

Ukompliceret bakteriel UVI er, når der ikke kan identificeres nogen underliggende strukturel, neurologisk eller funktionel abnormalitet.

Symptomer på urinvejsinfektion hos hund/kat:

- Hyppig vandladning
- Smerter ved vandladning
- Ildelugtende urin
- Grumset urin
- Blod i urinen

Princip

Flexicult® Vet er udformet som en agarplade med forhøjede sider, opdelt i felter med skillevægge og et tilhørende låg. Der er ét stort tællefelt til kvantitativ bestemmelse og 5 mindre felter med hvert deres antibiotikum. De små felter er markeret med tallene 1-5 i bunden af pladen. Agarpladen indeholder en fast mængde af de forskellige antibiotika og skal derfor aflæses som vækst/ikke vækst.

Urinprøve fra en hund eller kat hældes kortvarigt over pladen. Dermed kommer urinprøven i kontakt med agaren, og eventuelle bakterier vil sætte sig fast på agaroverfladen. Urinen hældes fra og Flexicult® Vet pladen inkuberes med bunden opad. Efter inkubation natten over vil eventuelle bakterier fra urinprøven vokse frem i tællefeltet. Bakterierne vil fremstå i de felter, der indeholder det antibiotikum, som bakterierne er resistente over for.

Prøvetagning

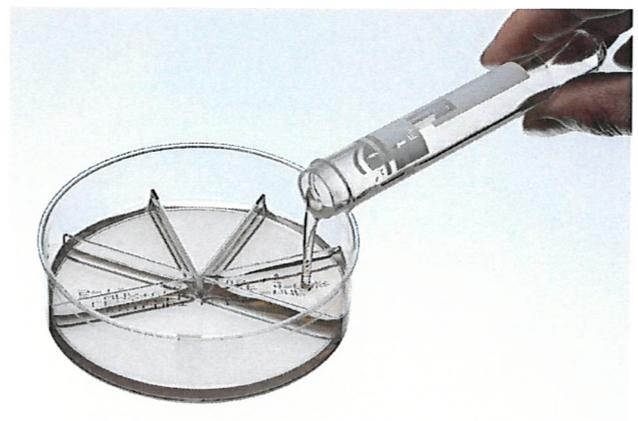
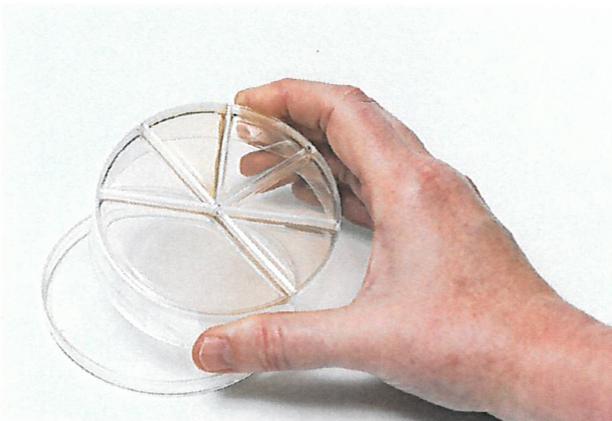
Urinen bør opsamles så sterilt som muligt. Dette gøres ved cystocentese. Dermed undgås forurening fra dyrets mikroflora i urinvejene. Hvis cystocentese ikke er mulig, er indføring af et kateter eller opsamling af prøve fra midtstråleurin alternativer.

Den friske urinprøve hældes på Flexicult® Vet inden for 30 minutter efter prøven er taget. Prøven kan også holdes på køl ved 2-8°C i op til 48 timer.

Urinprøver tilsat borsyre kan ikke anvendes i Flexicult® Vet, idet syreindholdet vil påvirke væksten af visse bakterier, og dermed aflæsningen af antibiotika følsomheden.

Fremgangsmåde for prøver med stort volumen (> 1 mL)

1. Urinprøven hældes hurtigt (3-5 sekunder) over agarpladen. Dækker urinprøven ikke alle agarfelter vippes skålen, således at urin fra tællefeltet fordeles over de små felter med antibiotika.
2. Overskydende urin hældes fra pladen, så urin, der har været i kontakt med antibiotikafelterne, ikke kommer i kontakt med tællefeltet. Overskydende urin fjernes ved hjælp af lette slag mod affaldsbeholder.
3. Låget påsættes og Flexicult® Vet inkuberes med bunden opad ved 35°C i 18-24 timer.
4. Resultatet aflæses næste dag.



Fremgangsmåde for prøver med lille volumen (< 1 mL)

1. Der skal anvendes mindst 0,8 mL urin.
2. Afsæt 0,1 mL (2-3 dråber)* urin i hvert af de 5 felter med antibiotika.
3. Afsæt 0,3 mL (6-8 dråber)* urin i det store tællefelt.
4. Vip pladen i cirkulære bevægelser i 3-5 sekunder for at sikre, at hele agaroverfladen i hvert felt er blevet dækket med urin.
5. Eventuel overskydende urin hældes fra pladen, så at urin, der har været i berøring med antibiotikafelterne, ikke kommer i kontakt med tællefeltet. Overskydende urin fjernes ved hjælp af lette slag mod affaldsbeholder.
6. Låget påsættes og Flexicult® Vet inkuberes med bunden opad ved 35°C i 18-24 timer.
7. Resultatet aflæses næste dag.

* Den metriske dråbe er defineret til 0,05 mL. Derfor er der angivet dråber efter volumens størrelse. Brug evt. en steril Pasteur-pipette til at afsætte dråberne med.

Diagnostik

Agarpladen

Agarpladen indeholder et kromogent substrat, der får bakteriekolonier eller agar til at fremstå med forskellige farver afhængig af, hvilke bakterier der er på (se tabel 2). Over 98% af alle *E. coli* bakterier fremstår rødlige, mens *Klebsiella* sp. er mørkeblå. Langt de fleste urinvejspatogener vokser med kolonier i forskellige farver, hvilket gør det muligt at bestemme bakteriearten (fx *E. coli*, *Ps. aeruginosa*) og bakteriefamilien (fx *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Enterococcus* sp.).



Billeder af forskellige bakteriearter og deres resistens over for forskellige antibiotika. *E. coli* til venstre og *E. faecalis* til højre.

Bakterier

E. coli er den hyppigste årsag til UVI hos både hunde og katte, og udgør omkring halvdelen af tilfældene. Gram-positive kokker (stafylokokker, enterokokker og streptokokker) og Gram-negative stave (*Proteus* sp., *Klebsiella* sp. *Pseudomonas* sp. etc.) forekommer med varierende hyppighed i de resterende tilfælde. Blandingsflora af flere patogener ses i ca. 20% af urinprøverne.

Naturlig flora

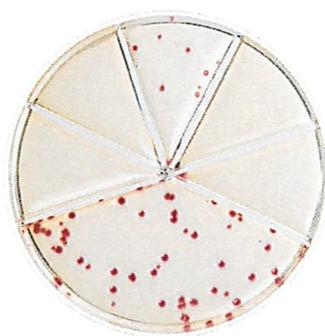
Selvom urinen normalt er steril i blæren, så kan urinen blive forurennet af organismer fra dyrets naturlige flora, når det passerer gennem de nedre urinveje. Det kan derfor være vanskeligt at tolke bakterier i urinen, hvis den kommer via kateter eller ved opsamling af midtstråleurin. Hvis man er i tvivl, om der er tale om vækst af urinvejspatogener, eller det blot er den naturlige flora, skal man tage en ny urinprøve og analysere den. Alternativt kan ny prøve sendes til mikrobiologisk dyrkning eller den dyrkede Flexicult® Vet plade sendes ind til laboratoriet.

Aflæsning af Flexicult® Vet

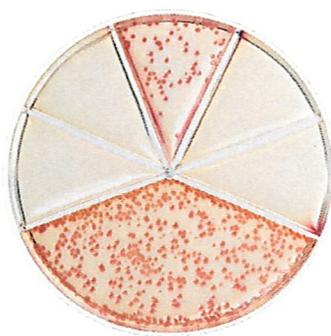
Efter inkubation natten over (18-24 timer) aflæses agarpladen for vækst af bakterier.

Tællefelt

Jo flere bakterier der er i urinen, jo flere bakterier vil der være i tællefeltet. Ved at sammenligne bakterietætheden med nedenstående eksempel med *E. coli*, vil det være muligt at få en indikation af, hvor mange bakterier der er i urinen (CFU/mL).



E. coli 10³ CFU/mL



E. coli 10⁴ CFU/mL



E. coli 10⁵ CFU/mL

Den viste *E. coli* er sensitiv over for ampicillin, amoxicillin/klavulansyre, enrofloxacin og trimethoprim/sulfamethizol da der ikke er nogen vækst i felterne for disse antibiotika. Den er resistent over for det sidste antibiotikum, oxacillin.

Tabel 1. Grænseværdier for signifikant bakteriuri (modificeret fra Bartges et al., 2004) [2]

Udtagningsmetode	Hund	Kat
Cystocentese ^a	≥ 10 ³ CFU/mL	≥ 10 ³ CFU/mL
Kateterurin	≥ 10 ⁴ CFU/mL	≥ 10 ³ CFU/mL
Spontan afsat urin og kateterurin ^b	≥ 10 ⁵ CFU/mL	≥ 10 ³ CFU/mL

^aLavere antal bakterier i urin udtaget ved cystocentese kan være signifikant og repræsentere infektion.

^bSelv ved disse høje grænseværdier er der risiko for falsk positive resultater, hvorfor dyrkning på spontant afsat urin generelt ikke kan anbefales.

Ud fra billederne på side 11-20 og grænseværdierne i Tabel 1 vurderes, om der vokser en urinvejspatogen bakterie i en mængde svarende til signifikant bakteriuri. Ved bakterievækst i felterne med antibiotika sammenlignes tætheden (CFU/mL) med tællefeltet.

Patienter med gentagne urinvejsinfektioner bør altid have urin udtaget ved cystocentese.

Vokser der flere bakteriearter samtidigt, vurderes mængden af hver bakterie.

- Hvis der er én patogen bakterie i blanding med formodet normal urethralflora, ses der bort fra sidstnævnte.
- Ved én dominerende patogen tolkes tællefelt og resistenssvar kun ud fra antal kolonier af den dominerende type. Hvis dette ikke er tilfældet, og hvis der er flere end to urinvejspatogene bakterier, kan prøven ikke vurderes, og der bør tages en ny prøve.

Størrelse og farver

E. coli og *Proteus* sp. vil vokse godt med store kolonier, dvs. 2-4 mm i diameter. *Klebsiella* sp. og *Enterobacter* sp. vil vokse med endnu større, mucoid kolonier. Enterokokker og streptokokker vokser med små kolonier (0,5-1 mm), og stafylokokker lidt større (1-2 mm).

Farven på kolonierne og farven på agaren hjælper til at identificere hvilken(n) bakterie(r) der er tale om, se nedenstående tabel 2

Tabel 2. Oversigt over kolonifarve og agarfarve

Bakterier	Kolonistørrelse	Kolonifarve	Agarfarve
<i>E. coli</i>	Stor	Rød/rødlig	-
<i>Klebsiella</i> sp.	Stor, fed	Mørkeblå/violet	-
<i>Enterobacter</i> sp.	Stor	Mørkeblå/violet	-
<i>Proteus</i> sp.	Stor	Lysebrun	Brun
<i>Proteus vulgaris</i>	Stor (sværm)	Grønbrun	Brun
<i>Ps. aeruginosa</i>	Stor	Gråhvid/grønlig	Grønlig
<i>E. faecalis</i>	Små	Grøn/grønblå	-
<i>E. faecium</i>	Små	Grøn/grå	-
<i>Staph. pseudintermedius</i>	Små	Hvide/rosa	-
<i>Strep. canis</i>	Små	Cremerfarvet	-

Resistens

Hvis bakterievæksten i et af de små antibiotikafelter er væsentlig mindre end væksten i det store tællefelt - eller hvis der ikke er nogen vækst - anses bakterien for at være følsom over for det pågældende antibiotikum.

Tabel 3 viser bakteriernes naturlige resistens og procentvise resistens i Danmark for de antibiotika, der indgår i Flexicult® Vet.

For eksempel er *Klebsiella* sp. altid resistent over for ampicillin. Enterokokker er resistente over for enrofloxacin. *Enterococci* sp. skal altid anses som resistente over for trimethoprim/sulfamethizol, selvom de ved aflæsning af Flexicult® Vet kan fremstå som følsomme.

I løbet af de sidste ca. 5 år er en multiresistent klon af *Staph. pseudintermedius* (MRSP) dukket op i bl.a. Danmark. Klonen er resistent overfor samtlige betalaktam antibiotika samt en lang række andre antibiotika. Til detektion af MRSP anvendes oxacillin, som i Flexicult® Vet er i det lille felt med nr. 3.

Hvis der ses vækst i oxacillinfeltet, og man ud fra kolonistørrelse (lille) samt farve (hvid/rosa) har mistanke om, at det kunne være en multiresistent *Staph. pseudintermedius* (MRSP), anbefales det at sende Flexicult® Vet pladen til yderligere undersøgelse på et laboratorium. En MRSP vil på Flexicult® Vet typisk også være resistent overfor de fire andre antibiotika.

Tabel 3. Oversigt over forventet resistensmønster

R angiver naturlig resistens. **R** angiver, at bakterien ofte er resistent. **S** angiver, at bakterien oftest er følsom. ^[1,3]

Bakterie	Ampicillin	Amoxicillin/ klavulansyre	Oxacillin	Enrofloxacin	Trimethoprim/ sulfamethizol
<i>E. coli</i>	S	S		S	S
<i>Klebsiella</i> sp./ <i>Enterobacter</i> sp.	R/R	R/R		S/S	R/R
<i>Proteus</i> sp.	S	S		S	S
<i>Proteus vulgaris</i>	R	S		S	S
<i>Ps. aeruginosa</i>	R	R		S	R
<i>E. faecalis</i>	S	S		S	R
<i>E. faecium</i>	R	S		R	R
<i>Staph. pseudintermedius</i>	S	S	S (Screening MRSP)	S	S
<i>Strep. canis</i>	S	S		S	S

E. coli

E. coli er store Gram-negative oftest bevægelige stave.



10^3 CFU/mL

Bakterierne vokser med store rødlige kolonier.



Nærbillede af *E. coli*



10^5 CFU/mL

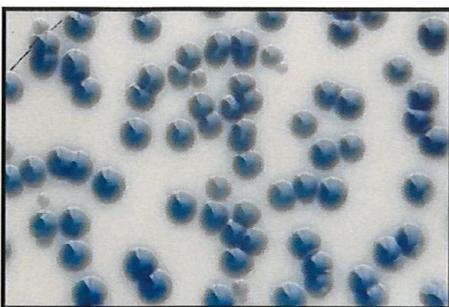
Billederne viser et eksempel på *E. coli* i forskellige koncentrationer, der er resistent over for oxacillin.

Klebsiella sp. og Enterobacter sp.

Klebsiella sp. og *Enterobacter* sp. er store ubevægelige Gram-negative stave. De to bakteriearter ligner hinanden meget i størrelse og farve.



10^3 CFU/mL



Nærbillede af *Klebsiella* sp.

Klebsiella sp. vokser med store fede mørkeblå/violet kolonier.



10^5 CFU/mL

Billederne viser et eksempel på *Klebsiella* sp. i forskellige koncentrationer, der er resistent over for ampicillin, oxacillin og trimethoprim/sulfamethizol.

HUSK: *Klebsiella* sp. og *Enterobacter* sp. skal altid tolkes som resistent over for ampicillin, selv hvis der ikke er vækst i feltet med ampicillin.

Proteus sp.

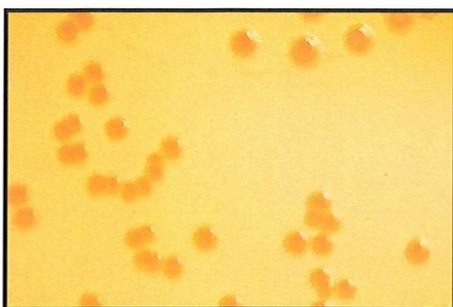
Proteus sp. er store bevægelige Gram-negative stave.



10^3 CFU/mL

Bakterien vokser med store lysebrune/brune kolonier. Der vil være en brunfarvning af agaren rundt om bakterien.

Proteus sp. er medvirkende til stendannelse, idet bakterien spalter urinstof under dannelse af ammoniak. Det bevirker, at urinen bliver alkalisk, og der udfældes en del salte, fx kalciumfosfat.



Nærbillede af *P. mirabilis*



10^5 CFU/mL

Billederne viser et eksempel på *P. mirabilis* i forskellige koncentrationer, der er resistent over for oxacillin. I modsætning til *P. vulgaris* er *P. mirabilis* ofte følsom over for ampicillin.

Proteus vulgaris

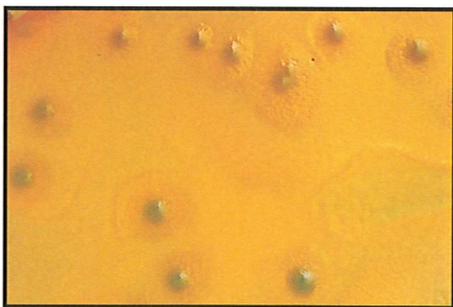
Proteus vulgaris er store bevægelige Gram-negative stave.



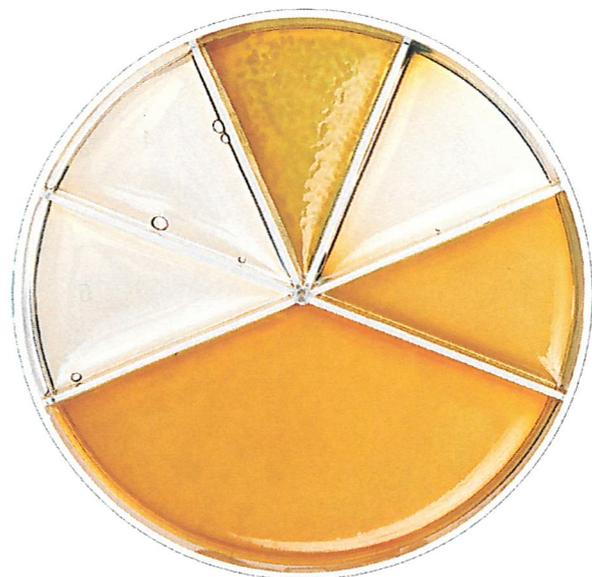
10^3 CFU/mL

Bakterien vokser med store grønbrune kolonier. Der vil være en brunfarvning af agaren rundt om bakterien.

Proteus sp. er medvirkende til stendannelse, idet bakterien spalter urinstof under dannelse af ammoniak. Det bevirker, at urinen bliver alkalisk, og derfor udfældes en del salte, fx kalciumfosfat.



Nærbillede af *P. vulgaris*



10^5 CFU/mL

Billederne viser et eksempel på *P. vulgaris* i forskellige koncentrationer, der er resistent over for oxacillin og ampicillin.

Pseudomonas aeruginosa

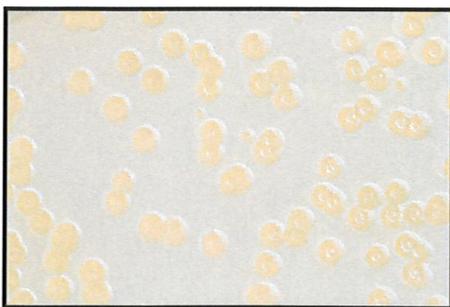
Ps. aeruginosa er tynde bevægelige Gram-negative stave.



10^3 CFU/mL

Bakterien vokser med gråhvide/ grønne kolonier. Ofte vil agaren få en grønlig farve, og pladen vil have en sødlig lugt.

Desuden får kolonierne ofte et metalagtigt skær.



Nærbillede af *Ps. aeruginosa*

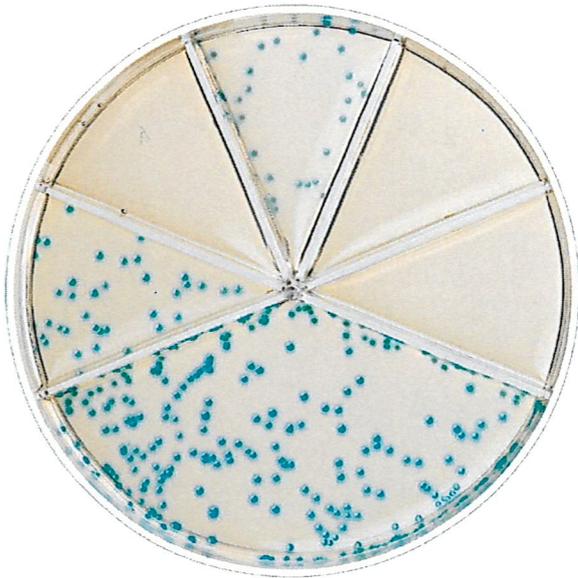


10^5 CFU/mL

Billederne viser et eksempel på *Ps. aeruginosa* i forskellige koncentrationer, der er naturligt resistent over for alle antibiotika i pladen undtagen enrofloxacin.

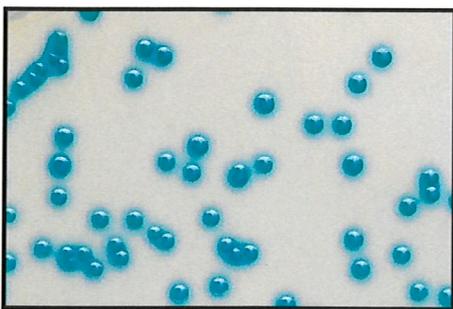
Enterococcus faecalis

Enterokokker er Gram-positive kokker i korte og lange kæder.



10^3 CFU/mL

Bakterierne vokser med små grønne/grønblå kolonier.



Nærbillede af *E. faecalis*



10^5 CFU/mL

Billederne viser, et eksempel på *E.*

faecalis i forskellige koncentrationer, der er resistent over for oxacillin og trimethoprim/sulfamethizol.

HUSK: *E. faecalis* skal altid tolkes som resistent over for trimethoprim/sulfamethizol, selv hvis der ikke er vækst i feltet med trimethoprim/sulfamethizol.

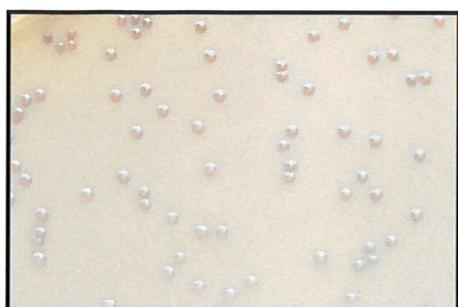
Enterococcus faecium

Enterokokker er Gram-positive kokker i korte og lange kæder.



10³ CFU/mL

Bakterierne vokser med små grøn/grå kolonier.



Nærbillede af *E. faecium*



10⁵ CFU/mL

Billederne viser, et eksempel på *E. faecium* i forskellige koncentrationer, der er resistent over for oxacillin, enrofloxacin og trimethoprim/sulfamethizol.

HUSK: *E. faecium* skal altid tolkes som resistent over for trimethoprim/sulfamethizol, selv hvis der ikke er vækst i feltet med trimethoprim/sulfamethizol.

Staphylococcus pseudintermedius

Stafylokokker er Gram-positive kokker lejetret i hobe.



10^3 CFU/mL

Bakterierne vokser med små kolonier, der er hvide/rosa.



10^5 CFU/mL



Nærbillede af *S. pseudintermedius*

Billederne viser, et eksempel på *S. pseudintermedius* i forskellige koncentrationer, der er følsom over for alle antibiotika. Hvis der ses vækst i oxacillinfeltet, og man ud fra koloni størrelse (lille), samt farve (hvid/rosa) har mistanke om at det kunne være en multiresistent *Staph. pseudintermedius* (MRSP), anbefales det at sende Flexicult® Vet pladen til yderligere undersøgelse på et laboratorie.

Læs mere om MRSP på side 10.

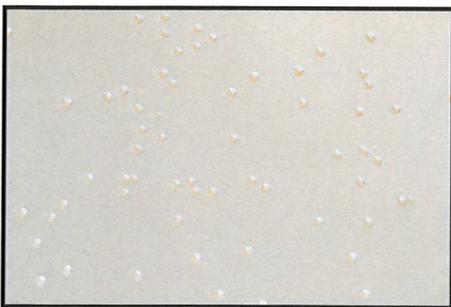
Streptococcus canis

Streptococcus canis er en gruppe G beta-hæmolytisk streptokok.



10^3 CFU/mL

Bakterierne vokser med små kolonier, der er cremefarvede.



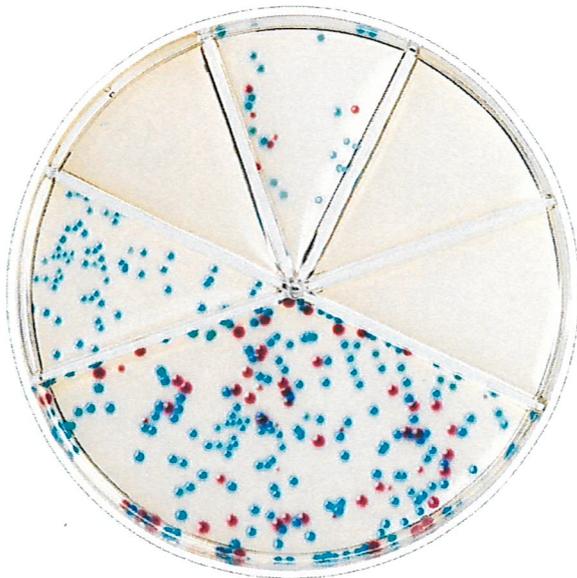
Nærbillede af *S. canis*



10^5 CFU/mL

Billederne viser et eksempel på *S. canis* i forskellige koncentrationer, der er følsom over for alle antibiotika.

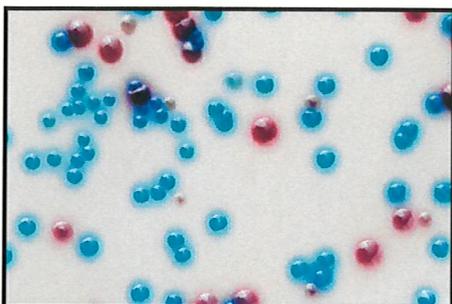
Blandingsflora (eksempel)



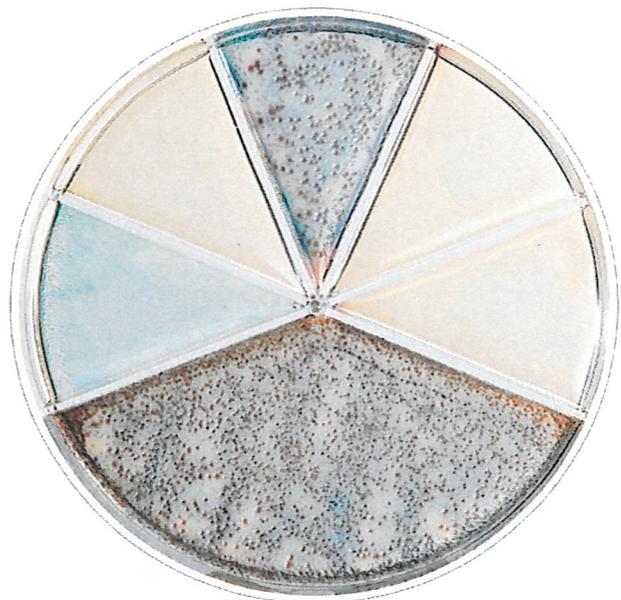
Blandingsflora af 10^3 CFU/mL *E. coli* og 10^3 CFU/mL *E. faecalis*

10^3 CFU/mL

Blandingsflora af 10^5 CFU/mL *E. coli* og 10^5 CFU/mL *E. faecalis*



Nærbillede af blandingsflora af *E. faecalis* og *E. coli*



10^5 CFU/mL

E. coli er resistent overfor oxacillin.

E. faecalis er resistent overfor trimethoprim/sulfamethizol og oxacillin.

Generel information

Referencer

1. SvHKS. Antibiotikavejledning til familiedyr. *Urinveje*, 29-33, 70-76.
2. Bartges, J. W. 2004. Diagnosis of urinary tract infections. *Vet Clin Small Anim.* 34: 923-933
3. Pedersen et al. *JAC* (2007) 60, 775-781.

Opbevaring og holdbarhed

Flexicult® Vet urinkit skal opbevares i køleskab (ca. 2-8°C). For at beskytte agarpladerne mod lys tages disse først ud af æsken umiddelbart inden brug.

Sidste anvendelsesdato er angivet på æskens etiket og printet på bunden af pladen.

Bortskaffelse

Brugte Flexicult® Vet urinkit er infektiøst materiale og skal håndteres som smittefarligt affald.

Bestilling

Varenr. 89991 Flexicult® Vet 6 stk.

T 4829 9125

F 4829 9126

@ ssidiagnostica@ssi.dk

Information:

Yderligere information eller aftale om besøg kan fås ved henvendelse til Aase Meyer:

Tel. 4829 9135

@ aam@ssi.dk

SSI Diagnostica

Herredsvejen 2

3400 Hillerød

www.ssi.dk/ssidiagnostica-dk

SSI Diagnostica | T 4829 9125
Herredsvejen 2 | F 4829 9126
3400 Hillerød | @ ssidiagnostica@ssi.dk
Danmark | w ssi.dk/ssidiagnostica-dk

Statens Serum Institut, 2. udgave, Maj 2015

