



1. INTÉRÊT CLINIQUE

UriSelect 4 est un milieu permettant :

- L'isolement et la numération de tous les germes urinaires par une méthode d'ensemencement à l'ose calibrée
- L'identification directe, par mise en évidence d'activités enzymatiques, des bactéries les plus fréquemment responsables d'infections urinaires : *Escherichia coli*, *Proteus*, entérocoques
- L'orientation diagnostique pour les autres germes urinaires, en particulier les entérobactéries du groupe K.E.S. (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*).

2. PRINCIPE

- L'identification d'*E.coli* est réalisée par la mise en évidence de l'activité de 2 enzymes : la β galactosidase et la tryptophanase ; le clivage par la β galactosidase du 1er substrat chromogène contenu dans ce milieu, entraîne la coloration rose des colonies
- Les *Proteus* sont caractérisés par une activité TDA positive; *Proteus mirabilis* est identifié par son profil indole négatif
- Les entérocoques sont révélés par la présence d'une β glucosidase (esculinase); le clivage, par cet enzyme, du second substrat chromogène contenu dans le milieu, provoque une coloration bleu turquoise des colonies.

MODE DE REVELATION DES DIFFERENTES ACTIVITES ENZYMATIQUES

• Spontanée

Pour la β galactosidase et la β glucosidase : coloration des colonies, obtenue après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C :

Réaction positive		Réaction négative
β galactosidase	rose	blanche ou incolore
β glucosidase	bleu turquoise	

• Spontanée ou après addition de réactif

Réaction positive		Réaction négative
TDA	coloration brun-orangé de la colonie et de la gélose Si coloration de faible intensité, ajouter 1 goutte de perchlorure de fer sur 1 colonie isolée : coloration brun-verdâtre en quelques secondes	absence de coloration

• Après addition de réactif

Pour la tryptophanase (production d'indole) : Addition d'une goutte de réactif de Kovacs (ou de réactif de James) sur 1 colonie isolée, directement sur la gélose (voir : rubrique VI. Utilisation).

	Réaction positive	Réaction négative
Indol (Kovacs)	virage au rose du réactif en 15 secondes, maximum	le réactif reste incolore, après 15 secondes
Indol (James)	virage au rouge de la colonie en 15 secondes, maximum	absence de virage de la colonie en 15 secondes

3. PRESENTATION

- Milieu prêt à l'emploi
 - coffret de 20 boîtes de Petri (90 mm) (URI4) code 63726
 - coffret de 100 boîtes de Petri (90 mm) (URI4) code 63727
- Milieu déshydraté : flacon de 500 g code 64694

4. COMPOSANTS ESSENTIELS

UriSelect 4 est un milieu gélosé non sélectif, composé :

D'une base nutritive riche, contenant 4 peptones, assurant la culture de tous les germes urinaires

De 2 substrats chromogènes pour la détection des enzymes bactériennes : β galactosidase et β glucosidase

De tryptophane pour la mise en évidence de l'activité de la tryptophanase (production d'indole) et de la tryptophane désaminase (TDA).

Préparation du milieu

Agiter le flacon avant usage. Mélanger **56,8 g** de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée, en agitant continuellement, jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (environ 10 mn). Chauffer la préparation initiale jusqu'à ébullition en agitant fréquemment, pour garantir une dissolution optimale de l'agar. Si nécessaire, ajuster le pH à 7,3. Stériliser à 120°C pendant 15 minutes, puis répartir en boîtes de Petri ou en flacons sous agitation régulière.

5. CONSERVATION

- Milieu prêt à l'emploi : **Conservation à +2 - 8°C, à l'abri de la lumière.**
- Milieu déshydraté : flacon soigneusement fermé dans un endroit sec et frais.

La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur les conditionnements.



6. UTILISATION

Matériel

- Matériel fourni : milieu **UriSelect 4**
- Matériel spécifique non fourni :
 - Réactif de Kovacs : flacon de 15 ml (x2)
code 55313

En outre, le laboratoire devra disposer de pipettes stériles, d'une étuve à 37°C et d'un récipient pour déchets contaminés.

Prélèvement des urines

Le recueil des urines est une étape importante de l'examen cytotbactériologique des urines ; il est recommandé d'effectuer l'examen sur les urines du matin.

Afin d'éviter toute contamination par la flore commensale, il est indispensable de procéder de la manière suivante :

- **Chez l'homme** : faire une toilette soignée du méat urinaire et du gland à l'aide de liqueur de Dakin
- **Chez la femme** : il n'est pas nécessaire de sonder ; une toilette minutieuse des organes génitaux externes avec la liqueur de Dakin, est suffisante. Il est souhaitable de placer un tampon vaginal, surtout pendant la période menstruelle.

Dans les deux cas, éliminer le début de la miction et recueillir les urines de "milieu de jet" dans un récipient stérile.

- **Chez le nourrisson** : utiliser un collecteur d'urine stérile.

Ensemencer les urines dans l'heure suivant le prélèvement ; en cas d'impossibilité, conserver les urines à + 4°C de manière à éviter toute prolifération microbienne.

Ensemencement

- Utiliser une øse calibrée de 10 µl
- Tenir l'øse verticalement et l'immerger dans l'urine
- Décharger l'øse en réalisant une strie sur un rayon de la boîte: figure (1)
- A partir du haut du dépôt et sans recharger l'øse, pratiquer des stries serrées (1) (2) sur toute la surface de la gélose, perpendiculairement au rayon tracé au début de l'ensemencement: figure (2)



Incubation

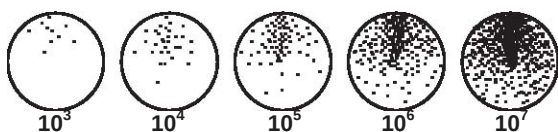
Incuber la boîte ainsi ensemencée 18 à 24 heures à l'étuve à 37°C

7. INTERPRETATION DES RÉSULTATS

• Numération

Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, la densité des colonies présentes sur la moitié supérieure de la boîte sera comparée à celle du schéma suivant :

Nombre de germes/ml d'urines



Une numération $\leq 10^4$ germes/ml correspond le plus souvent à une contamination. Toutefois, un tel résultat doit être interprété en fonction de la leucocyturie et du contexte clinique.

Une numération $\geq 10^5$ germes/ml correspond probablement à une infection, à condition que le prélèvement ait été correctement réalisé.

Identification

Etablir le diagnostic en fonction de la couleur des colonies :

ROSE

Activité β galactosidase positive ; il y a présomption d'*E.coli* à confirmer par une recherche de la production d'indole :

- Si le germe est indole $\oplus$: il s'agit d'un *E.coli*
- Si le germe est indole $\ominus$: l'identification se fera par une méthode classique.

Recherche de la production d'indole en cas de culture monomicrobienne

- Déposer directement sur la gélose, 1 goutte de réactif de **Kovacs** sur 1 colonie suspecte bien isolée :
 - Si le réactif vire au rose en 15 secondes maximum, la bactérie est indole $\oplus$
 - Si le réactif reste incolore après 15 secondes, la bactérie est indole $\ominus$
- Déposer directement sur la gélose, 1 goutte de réactif de **James** sur 1 colonie suspecte bien isolée :
 - Si la colonie vire au rouge en 15 secondes maximum, la bactérie est indole $\oplus$
 - Si la colonie reste incolore après 15 secondes, la bactérie est indole $\ominus$
- En cas de culture polymicrobienne, pratiquer la recherche de l'indole selon la technique décrite au paragraphe 7 du chapitre "REMARQUES".

BLEU TURQUOISE

Activité β glucosidase positive ; réaliser un examen microscopique :

- COCCI, avec colonies de petite taille ($\varnothing = 0,5 - 1,5$ mm) INTENSEMENT colorées en BLEU TURQUOISE : il s'agit d'un entérocoque. Si une de ces conditions n'est pas remplie, identifier le germe par une méthode classique.

BLEU VIOLET

Double activité enzymatique β galactosidase et β glucosidase ; réaliser un examen microscopique :

- BACILLES, avec colonies de grande taille ($\varnothing = 2,0 - 3,0$ mm) et couleur bleu-violet : forte présomption de bactérie appartenant au groupe K.E.S. (*Klebsiella* – *Enterobacter* – *Serratia*) ; identifier par une méthode classique.

BRUN -ORANGE (avec coloration brune de la gélose)

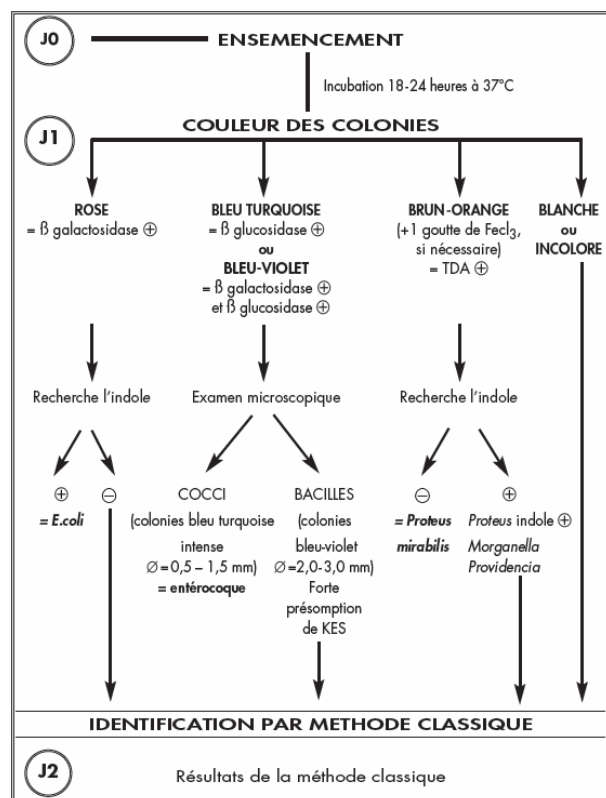
Activité TDA $\oplus$: il s'agit d'une bactérie appartenant au groupe *Proteus-Providencia-Morganella*.

(Si l'intensité de la coloration est faible, l'addition d'une goutte de perchlorure de fer sur une colonie renforcera la révélation de l'activité enzymatique : virage du réactif au brun-verdâtre en quelques secondes).

- Pratiquer la recherche de l'indole : en cas de culture monomicrobienne :
 - déposer 1 goutte de réactif de **Kovacs** directement sur 1 colonie de couleur brune :
 - absence de virage du réactif en 15 secondes : indole $\ominus$; il s'agit d'un *Proteus mirabilis*
 - virage au rose du réactif dans les 15 secondes : indole $\oplus$; il s'agit d'un *Proteus* indologène ou d'une *Providencia* ou d'une *Morganella* : identifier précisément par une méthode classique.
 - déposer 1 goutte de réactif de **James** directement sur 1 colonie de couleur brune :
 - absence de virage de la colonie en 15 secondes : indole $\ominus$; il s'agit d'un *Proteus mirabilis*
 - virage au rouge de la colonie dans les 15 secondes : indole $\oplus$; il s'agit d'un *Proteus* indologène ou d'une *Providencia* ou d'une *Morganella* : identifier précisément par une méthode classique.
- En cas de culture polymicrobienne, pratiquer la recherche de l'indole selon la technique décrite au paragraphe 7 du chapitre "REMARQUES".

BLANCHE ou INCOLORE

Identification par une méthode classique



Profil des bactéries les plus fréquemment isolées

BACTERIES	COLONIES	CARACTÈRES			
		β-GALAC TOSIDASE	β-GLUCO SIDASE	INDOLE	TDA
<i>E.coli</i>	ROSE	+	-	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	BRUN-ORANGE	-	-	-	+
Indol ⊕ <i>Proteus</i> <i>Providencia</i> <i>Morganella</i>	BRUN-ORANGE	-	-	+	+
<i>Enterococcus</i>	BLEU TURQUOISE	-	+	-	-
KES- enterobakt.	BLEUE - VIOLET	+(-)*	+	+/-	-

* Très rarement, certaines souches appartenant au groupe K.E.S. présentent une activité β galactosidase faible : la couleur des colonies est alors intermédiaire entre le bleu-violet et le bleu turquoise.

8. REMARQUES

1. β Galactosidase

- Plus de 99 % des souches d' *E. coli* possèdent une activité β galactosidase
- Un faible pourcentage de souches autres qu' *E.coli* possèdent une activité β galactosidase et peuvent apparaître de couleur rose sur ce milieu : il s'agit de souches rarement isolées au cours des infections urinaires (*Salmonella*, *Shigella*, *streptocoques* A) ou de souches pouvant être rencontrées dans ce type d'infections mais étant indole $\ominus$ (*Citrobacter*, *Hafnia*, *staphylocoques*, *streptocoque* B).

2. Un très faible pourcentage des souches d'*E.coli* présente un profil indole $\ominus$.

3. β Glucosidase

- Parmi les streptocoques, seuls les entérocoques expriment leur caractère β glucosidase en donnant des colonies intensément colorées en bleu-turquoise
 - Toute colonie de cocci présentant une coloration bleue très pâle ne devra pas être considérée comme un entérocoque : elle devra être identifiée par une méthode classique (il peut s'agir de streptocoques des groupes A ou B)
 - Certaines souches de *Proteus vulgaris* et *Providencia rettgeri* possèdent une activité β glucosidase et forment des colonies bleues sur gélose colorée en brun - orangé.

4. β Galactosidase + β Glucosidase

- En règle générale, les bactéries appartenant au groupe K.E.S. possèdent la double activité enzymatique β galactosidase et β glucosidase, entraînant une coloration bleu-violet des colonies
 - Cependant, certaines souches de ce groupe peuvent présenter une activité β galactosidase faible : la couleur des colonies est alors intermédiaire entre le bleu-violet et le bleu turquoise
- Citrobacter diversus* forme des colonies de couleur bleu-violet ayant un caractère indole $\oplus$.

5. La recherche de la catalase, de l'oxydase et les agglutinations par tests latex peuvent être réalisées directement à partir des colonies isolées sur **UriSelect 4**.

6. L'identification par une méthode classique et l'antibiogramme peuvent être réalisés directement sur des colonies prélevées sur **UriSelect 4**.

7. Méthode pour la recherche de la production d'indole en cas de culture polymicrobienne :

- test Kovacs : déposer 1 à 3 colonies morphologiquement homogènes sur un disque de papier buvard. Ajouter une goutte de réactif de Kovacs. Les bactéries présentant un profil indole ⊕ donneront immédiatement une coloration rose intense. Si la réaction est négative (bactéries indole ⊖), aucune coloration ne sera observée.
- test DMACA : déposer 1 à 3 colonies morphologiquement homogènes sur un disque de papier buvard. Ajouter une goutte de réactif DMACA. Les bactéries présentant un profil indole ⊕ donneront une coloration bleu turquoise. Si la réaction est négative (bactéries indole ⊖), aucune coloration ne sera observée.

8. *Proteus penneri*, espèce rarement isolée, présente un profil TDA ⊕, indole ⊖.

9. Lors de la reconstitution du milieu déshydraté, certains grains résiduels peuvent parfois demeurer insolubles. La présence de tels grains n'altère pas les performances culturelles du milieu.

10. L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques et éventuellement des résultats d'autres tests.

9. PERFORMANCES DU TEST :

Une étude clinique prospective utilisant les milieux **UriSelect 4**, **UriSelect 3** et des méthodes traditionnelles de référence a montré que:

- La détection de l'activité β Galactosidase par le milieu **UriSelect 4** permet d'optimiser sa sensibilité pour l'identification directe d'*E.coli* par rapport aux milieux dont le fonctionnement est basé sur l'activité β Glucuronidase. Lors de l'évaluation clinique, sur 10⁷ souches d'*E.coli*, le milieu à β Galactosidase (**UriSelect 4**) a permis l'identification directe de 10⁵ souches alors que le milieu à β Glucuronidase (**UriSelect 3**) a permis l'identification directe de 10² souches seulement.
- Le milieu **UriSelect 4** présente un apport en terme de contraste et de lisibilité des cultures du fait de sa couleur, de son opacité et de la coloration très intense des colonies (en particulier avec *Enterococcus faecalis*, *E.coli* et les bactéries du groupe K.E.S.). De ce fait, la discrimination des différentes espèces est optimisée au sein des cultures polymicrobiennes.

10. CONTRÔLE DE QUALITE DU TEST

Les performances culturelles du milieu **UriSelect 4** peuvent être contrôlées à l'aide des souches suivantes (résultats obtenus après une incubation de 18 à 24 heures à 37°C):

SOUCHES	COLONIES	CARACTÈRES			
		β-GALAC TOSIDASE	β-GLUKO SIDASE	INDOLE	TDA
<i>E.coli</i> ATCC 25922	ROSE	+	-	+	-
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	BLEU TURQUOISE	-	+	-	-
<i>P.mirabilis</i> ATCC 25933	BRUN-ORANGE	-	-	-	+
<i>P.vulgaris</i> ATCC 13315	BRUN-ORANGE	-	-	+	+
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 13883	BLEU-VIOLET	+	+	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	BLANC DORE	-	-	-	-

11. CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptations. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

12. LIMITES D'UTILISATION

1. Quelques souches de staphylocoques peuvent parfois être inhibées sur le milieu **UriSelect 4**.
2. De très rares souches de levure peuvent ne pas se développer sur le milieu **UriSelect 4**.
3. Afin d'obtenir des colonies bien isolées lorsque l'on suspecte une concentration en germes supérieure ou égale à 10⁷/ml, il est recommandé soit de faire un ensemencement sur deux boîtes consécutives sans recharger l'öse, soit de diluer l'urine avant l'isolement.
4. Milieu déshydraté : lorsque la durée d'incubation est supérieure à 24 heures, un reflet bleuté peut apparaître sur certaines souches de *Staphylococcus aureus*.

13. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Clarridge J.E., Pezzlo M.T., Vosti K.L., Cumitech 2A.
2. Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Coordinating ed. Weissfeld A.S., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. James A.L., Yeoman P., 1987. Zbl. Bakt. hyg. A267. p. 188-193.
4. Manafi M., Kneifel W., 1991. Acta Microbiologica Hungarica. 38 (3-4). p. 293 - 304.