

# Analisi di un percorso per la razionalizzazione della fase preanalitica e analitica delle urocolture

G. Bruschetta<sup>a</sup>, S. Grosso<sup>a</sup>, R. De Rosa<sup>b</sup>, A. Camporese<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unità Operativa di Microbiologia Clinica e Terapia Antibiotica, <sup>b</sup>Unità Operativa di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli, Pordenone

## Riassunto

**Premesse.** L'esame colturale delle urine rappresenta una delle richieste più frequenti in microbiologia (nella nostra realtà circa il 22% del carico di lavoro). Per questo motivo l'introduzione di sistemi analitici di screening sta assumendo notevole importanza per ridurre il carico di lavoro e contestualmente ottenere più rapidi risultati analitici.

**Metodi.** Nel nostro studio sono state analizzate 546 urine ottenute da pazienti ospedalieri e ambulatoriali, raccolte con un sistema vacutainer con acido borico come conservante (Uriset, Diesse, Milano). Per lo screening si è scelto di operare con uno strumento con citoflurimetria a flusso (Sysmex UF100, Dasit, Milano), comparando i risultati ottenuti con quelli della semina tradizionale in piastra con ansa calibrata.

**Risultati.** I risultati ottenuti utilizzando il risultato quantitativo di batteri e leucociti di UF100 sono estremamente interessanti, soprattutto per quanto riguarda la capacità di rilevare i campioni veri negativi. Utilizzando una soglia di valutazione per sospetta IVU ad un valore rispettivamente di 10.000 batteri e/o 50 leucociti/ $\mu\text{L}$ , si è ottenuto un valore predittivo negativo di 0.96.

**Conclusioni.** Il sistema, rispetto al metodo colturale, consente in pochi minuti dall'arrivo del campione in laboratorio, di refertare i campioni negativi, riducendone notevolmente il turn around time con notevoli vantaggi sotto il profilo clinico.

## Summary

**Analysis of a project designed to improve pre-analytical and analytical work-flow of urine cultures.**

**Background.** Quantitative urine culture is one of the most frequently requested tests in microbiology laboratories (about 22% in our experience). An automated system for screening purposes is strongly needed to save technical staff time and obtain rapid results.

**Methods.** In our study we have investigated 546 urine samples collected from inpatients and outpatients with a commercial tube prepared with boric acid (Uriset, Diesse, Milano, Italy) and have compared a second-generation flow cytometry (Sysmex UF100, Dasit, Milano, Italy) with standard urine culture tested on agar plated by means of 10 microliter loop. The specimens were screened and cultured upon receipt.

**Results.** In our experience, the results obtained with Sysmex UF100 are very interesting, especially if this analyzer is used as screening method for negative urine samples, and comparable to data obtained from culture examination. In fact, considering together bacteria and leucocytes count (10.000 bacteria and/or 50 leucocytes/ $\mu\text{L}$ ) we have obtained a negative predictive value of 0.96 in comparison to standard culture method.

**Conclusions.** The classical culture method needs of 24 hours for a results, instead the Sysmex UF100 analyzer gives results in few minutes, thus reducing the microbiology turn around time (TAT) with obvious benefits for patients and physicians.

## Introduzione

Le infezioni delle vie urinarie (IVU) rappresentano la patologia infettiva con maggiore incidenza nella popolazione ospedaliera e comunitaria<sup>1,2</sup>.

L'esame colturale dell'urina consente di rilevare l'agente eziologico di un'infezione delle vie urinarie e di misurarne la concentrazione. Esso permette altresì di fornire un test di sensibilità agli antimicrobici sul ceppo isolato e di seguire eventualmente l'evoluzione della malattia o l'esito del trattamento antibiotico prescritto.

Consente infine di rilevare l'eventuale presenza di sostanze antibatteriche nell'urina attraverso l'esecuzione del PAR test (Potere Antibatterico Residuo), esame ormai considerato da molti parte integrante della diagnostica infettivologica di routine delle vie urinarie e che consente talvolta di giustificare una piuria in assenza di crescita batterica.

Nella Tabella I sono riassunti i principali agenti eziologici isolati dalla nostra Unità Operativa di Microbiologia Clinica e Terapia Antibiotica del Dipartimento di Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedaliera S.Maria degli Angeli di Pordenone nell'ultimo biennio 2004-2005: dai dati è possibile evincere che *Escherichia coli* rappresenta il ceppo maggiormente isolato, a conferma della sua particolare uropatogenicità<sup>1</sup>, mentre seguono in percentuale le infezioni sostenute dagli enterococchi e da batteri Gram negativi di provenienza intestinale, quali *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*. Essi costituiscono un ampio gruppo responsabile, insieme agli enterococchi, di infezioni opportunistiche e croniche, nonché di infezioni recidivanti in pazienti cronici o nei pazienti ospedalizzati o domiciliati in case di riposo.

Contestualmente stanno assumendo una crescente evidenza le infezioni da stafilococchi, genere che a sua volta sottende diverse specie, più o meno equamente distribuite percentualmente tra gli isolati, quali *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus*, patogeni convenzionali, e *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus hominis*, patogeni condizionali, che insieme si attestano mediamente intorno al 5% degli isolati: un risultato per certi versi atteso e con tendenza all'incremento, vista l'importanza sempre maggiore delle patologie stafilococche soprattutto nella popolazione anziana con patologie croniche (anch'esse in netto aumento) e in pazienti defedati e/o cateterizzati. Da notare la discre-

ta percentuale di casi di isolamento di *Streptococcus agalactiae* o di gruppo B, patogeno condizionale delle vie urinarie, la cui origine nella donna è quasi sempre da ricercare a livello vaginale, e il cui ruolo controverso nella genesi di malattia infettiva delle vie urinarie necessita, per essere inquadrato correttamente, di precise notizie cliniche e anamnestiche<sup>2</sup>. Infine è evidente un aumento di isolamenti di *Candida spp.*, responsabile di infezione in specifiche situazioni cliniche, quali ad esempio protratte terapie antibiotiche, o in pazienti diabetici e/o immunodepressi.

Non c'è ancora una valutazione univoca in letteratura su quale possa essere ritenuto il test di screening più idoneo per valutare il sospetto di IVU, anche se a nostro avviso si può ritenere che la rilevazione della batteriuria, unitamente alla quantificazione dei leucociti mediante esame microscopico, possa considerarsi ancora oggi il metodo di valutazione preliminare più razionale e idoneo per indirizzare verso un sospetto di IVU<sup>1-3</sup>.

Molti fattori possono influire sulla sensibilità e specificità dei metodi utilizzati per la diagnostica microbiologica delle IVU, primo fra tutti la contaminazione pre-analitica, che può portare a una valutazione falsamente positiva dell'urocoltura in mancanza di notizie cliniche.

Infatti, escludendo in questa sede considerazioni sulla corretta gestione delle varie procedure adottate per l'esecuzione dell'urocoltura (inoculo, identificazione batterica, antibiogramma), che implicitamente presuppongono un costante ed accurato controllo di qualità, sono fondamentalmente due gli elementi che maggiormente possono influire sulla corretta interpretazione dell'analisi colturale dell'urina: la gestione preanalitica e la valutazione della carica microbica<sup>2</sup>. I due elementi spesso si correlano, in quanto ancora troppo spesso si tende a discriminare tra un campione più o meno significativo in base alla sola carica microbica rilevata. Ragionando in questi termini, una scorretta gestione della fase preanalitica (dall'esecuzione della raccolta con "mitto intermedio" alla conservazione e al trasporto del campione) può trasformarsi già in una prima insidia per la corretta esecuzione analitica il cui peso appare sempre più rilevante in relazione al fatto che oggi sempre più spesso l'organizzazione dei laboratori si muove verso una strutturazione in termini di *factory-like laboratory*, con una sempre più estesa concentrazio-

**Tabella I.** Incidenza dei ceppi isolati da urocolture nel biennio 2004/2005 in pazienti esterni e ospedalizzati.

Ceppi maggiormente isolati	% Esterni 2004	% Esterni 2005	% Ospedale 2004	% Ospedale 2005
<i>Escherichia coli</i>	58.8	54.9	58	52.6
Enterococchi	12.3	14.6	13.5	15.3
Streptococchi di gruppo B	9.2	6.7	8.1	6.0
<i>Proteus spp.</i>	6.3	8.1	5.0	7.0
Gruppo KES( <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> <i>Serratia spp.</i> )	4.7	6.5	6.4	7.2
<i>Staphylococcus spp.</i>	3.2	4.8	3.6	5.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.7	2.0	1.5	3.4
<i>Candida spp.</i>	2.5	2.8	2.4	2.9

ne di campioni da centri prelievo periferici verso un unico *core-laboratory*<sup>2</sup>.

Da un punto di vista strettamente analitico, inoltre, crediamo si possa oggi considerare in modo assolutamente critico il criterio di valutazione quantitativa di Kass<sup>4,5</sup> e l'importanza di attribuire un valore soglia o *cut-off* come unico elemento per considerare un campione di urina clinicamente significativo per la diagnosi di IVU<sup>1,2</sup>.

Tale criterio inoltre viene tanto più messo in discussione quanto più ci si affida a un'appropriata correlazione tra uropatogenicità del microorganismo isolato e carica rilevata, ma soprattutto quando si dia più spazio alla valutazione clinica del paziente, unitamente alla valutazione di altri parametri urinari, quali ad esempio, la presenza di leucociti<sup>2</sup>.

La stessa rilevazione di un PAR test positivo svincola il microbiologo dalla valutazione *sensu stricto* della carica, in quanto in questi casi anche la rilevazione di una ridotta concentrazione del microorganismo isolato deve indurre a procedere ugualmente verso la valutazione della sensibilità agli antimicrobici.

Proprio per valorizzare e rendere maggiormente sfruttabili dal microbiologo i vari parametri chimico-fisici e microscopici dell'urina, da qualche tempo si è cominciato a pensare di integrare e "consolidare" settori diversi della diagnostica urinaria, dall' esame chimico fisico all'esame colturale, in modo da migliorare l'inquadramento clinico del paziente con patologie infettive delle vie urinarie<sup>2</sup>.

Nel contesto dell'analisi microbiologica delle urine, l'automazione ha inoltre contribuito a migliorare in maniera consistente alcuni aspetti di gestione del campione e del referto, consentendo ad esempio di eseguire semine sia in terreni liquidi che solidi, e di ottenere anche un PAR test automatizzato, ma tutti gli strumenti automatizzati sono ancora affetti da elementi di criticità e richiedono un'attenta valutazione costo/beneficio in relazione a ciascuna realtà operativa e in base alla numerosità dei campioni esaminati. I metodi nefelometrici, ad esempio, se da un lato consentono di eseguire in automazione, oltre allo screening colturale, anche il PAR test, ottenendo una risposta dei campioni negativi in tempi relativamente brevi in base a *cut-off* predeterminati, di contro, dovendo attendere i risultati delle curve di crescita batterica, tendono a dilatare i tempi di semina dei campioni risultati positivi allo screening colturale, dovendo provvedere così nel frattempo a garantirne la corretta conservazione<sup>2</sup>.

Gli strumenti analitici dotati di semina automatizzata, invece, pur con i limiti della semina su *slide*, oltre a ridurre sensibilmente i tempi di allestimento del campione, consentono anche di migliorarne la qualità pre-analitica e di lavorare con un sistema totalmente chiuso, favorendo contestualmente il trasporto, la conservazione e la tracciabilità del campione<sup>2</sup>.

Tutti i metodi che sfruttano l'automazione presentano tra l'altro elevati costi gestionali, assolutamente su-

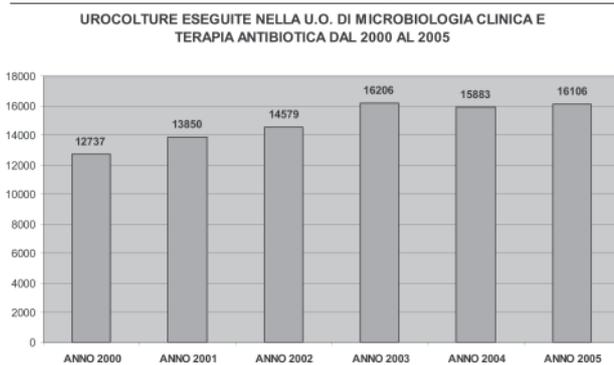
periori e non confrontabili con la semina tradizionale in piastra. Per questo motivo, la loro introduzione nel contesto microbiologico richiede l'elaborazione di un più ampio programma di riorganizzazione dei flussi di lavoro del laboratorio e delle fasi preanalitiche, non ultimo l'interfaccia strumentale con il LIS (*Laboratory Information System*) e il collegamento informatico con i reparti di degenza<sup>6</sup>.

Ciò che l'automazione e l'informatica sono in grado di offrire a un moderno laboratorio di microbiologia, se adeguatamente sfruttati e pensati in contesti più ampi di revisione del *workflow*, consiste infatti essenzialmente in una maggiore velocità di refertazione. I flussi analitici in molte microbiologie sono purtroppo ancora spesso troppo laboriosi e lenti e la tendenza alla velocizzazione analitica è vista ancora da molti microbiologi come un elemento di criticità a scapito della qualità, anziché un elemento determinante per passare da una visione "biologica" a una visione "clinica" della diagnostica microbiologica<sup>6-8</sup>. In realtà, l'incremento della velocità analitica, se intelligentemente gestita, non significa affatto una minore accuratezza, piuttosto invece essa rappresenta un nuovo e concreto apporto per incidere maggiormente sulla razionalizzazione della scelta terapeutica, mentre uno degli obiettivi primari della moderna microbiologia è divenuto giocoforza l'ottimale sfruttamento delle risorse offerte dalle più recenti tecnologie analitiche ed informatiche e nella loro concreta integrazione in un più ampio modello di riorganizzazione del laboratorio<sup>6-8</sup>.

## Materiali e metodi

Per l'esecuzione dell'esame colturale delle urine il nostro laboratorio di microbiologia attualmente adotta il metodo della semina con ansa calibrata da 1  $\mu\text{L}$  su due piastre di terreno solido: CLED agar e Columbia CNA + 5% sangue di montone (Kima, Padova). Contestualmente alla semina delle piastre per la coltura si procede alla ricerca di eventuali sostanze ad azione antibatterica presenti nelle urine (PAR test). Questa valutazione viene effettuata inoculando 50  $\mu\text{L}$  di urina in esame in pozzetti ricavati in piastre di agar germi con *Bacillus subtilis* (Kima, Padova). Dopo opportuna incubazione per 18-24 ore a 37°C, la presenza di aloni di inibizione intorno al singolo pozzetto è indicativa della presenza di sostanze antibatteriche nel campione analizzato.

Le due piastre dedicate all'esame colturale, dopo incubazione di 18-24 ore a 37 °C, sono invece valutate per la verifica di eventuale crescita batterica. In caso di crescita significativa ( $\geq 100.000$  UFC/ $\mu\text{L}$  con PAR negativo) si procede all'identificazione del microorganismo e all'allestimento dell'antibiogramma con sistema VITEK 2 (bioMérieux, Roma) o, in caso di microrganismi particolarmente esigenti, con Kirby Bauer (Becton Dickinson, Milano) o con Etest (AB-Biodisk, Solna, Svezia)<sup>2</sup>.

**Tabella II:** numero di urocolture eseguite dal 2000 al 2005.

La Tabella II esprime il “peso” delle urocolture nella nostra routine batteriologica, pari a oltre il 22% dei campionamenti su base annua.

Per procedere alla riorganizzazione dell'intero percorso di gestione preanalitico/analitico dell'esame colturale delle urine, comprendente la raccolta del campione, il trasporto al laboratorio, la fase di accettazione/*sorting* per lo smistamento al settore diagnostico, si è scelto di operare attraverso l'utilizzo di una serie di sistemi che potessero garantire un miglioramento contestuale di tutte le diverse fasi. Per il prelievo e il trasporto si è così pensato di procedere a testare un sistema di campionamento che migliorasse il più possibile la *compliance* del paziente all'atto del prelievo, utilizzando provette vacutainer provviste di collegamento con uno specifico *holder* per l'aspirazione (Fig. 1), mirando al tempo stesso a cercare il miglioramento della qualità della conservazione mediante l'uso di acido borico come ritardante della crescita batterica<sup>9,10</sup>.

Ci si è posti altresì l'obiettivo di uniformare la tipologia dei contenitori e di ridurre il numero dei campioni da raccogliere, trasportare e analizzare, valutando la possibilità di operare con un'unica provetta vacutainer anziché con vasetti a bocca larga e tappo a vite, migliorando e garantendo così anche la sicurezza del trasporto dai reparti e da tutte le sedi periferiche e la sicurezza della manipolazione dei campioni da parte degli operatori del laboratorio.

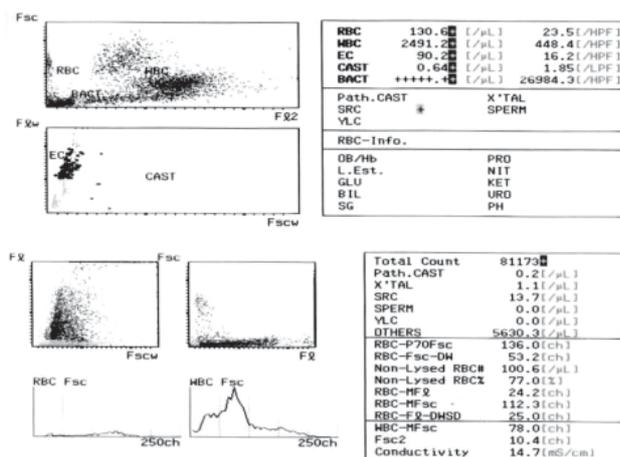
Da un punto di vista analitico, si è optato infine per valutare l'impatto di uno strumento che fosse in grado potenzialmente di garantire il massimo della rapidità di screening per la diagnostica della patologia infettiva delle vie urinarie contestualmente al mantenimento di un'elevata qualità diagnostica attualmente offerta dal metodo colturale.

In sintesi, gli obiettivi della sperimentazione sono stati individuati nei seguenti punti: razionalizzazione della fase di raccolta e di trasporto del campione; valutazione della possibilità di utilizzare una sola provetta per screening ed esame colturale; individuazione di un sistema per lo screening dei campioni di urina che garantisse una riduzione del TAT (*Turn Around Time*) contestualmente alla garanzia di eccellenza analitica con caratteristiche sovrapponibili all'esame colturale tradizionale.

**Figura 1.** Sistema Uriset (Diesse, Milano, Italia) costituito da provetta vacutainer con holder.

Per quanto riguarda il primo punto, data la necessità di processare campioni provenienti da presidi ospedalieri e distretti lontani dalla sede del Laboratorio mantenendo le condizioni native del campione, si è scelto di operare utilizzando il sistema Uriset (Diesse, Milano), un dispositivo di prelievo per la raccolta e il trasporto di urine sotto vuoto con conservante in polvere (acido borico e sodio formiato). L'Uriset consiste in una provetta vacutainer calibrata e studiata per la raccolta e il trasporto dei campioni per l'esame microbiologico dell'urina e di uno specifico device per l'aspirazione dell'urina dal contenitore di raccolta (Fig. 1).

L'utilizzo del device avviene inserendo la provetta nell'holder dopo avere immerso la cannula nell'urina raccolta con un contenitore sterile, spingendo la provetta fino a forare il tappo di gomma. La provetta sotto vuoto si riempie autonomamente con circa 4 ml di campione. Dopo il suo riempimento la provetta viene estratta dall'holder con un movimento rapido e deciso. Dopo aver riempito la provetta è possibile eliminare il vasetto ed il dispositivo di prelievo. Il campione può essere avviato così al Laboratorio in tutta sicurezza con risparmio di spazio e senza particolari precauzioni di conservazione. In alternativa, per motivi di maggiore praticità, si può optare anche per l'utilizzo di un sistema di aspirazione con analoghe provette vacutainer da collegare direttamente al contenitore di raccolta munito di holder. Durante la valutazione sperimentale del sistema di prelievo e di screening si è deciso di prelevare due provette per ciascun campione, in modo da poter procedere a testare eventuali fenomeni di contaminazione durante il processo analitico: per fare ciò, si è proceduto valutando la crescita batterica ottenuta seminando entrambe le provette: l'una dopo avere proceduto allo screening, l'altra direttamente senza procedere ad alcuna manipolazione. Si è così inteso valutare un importante elemento per garantire di usufruire in futuro di una sola provetta, escludendo cioè la possibilità di un'eventuale contaminazione do-



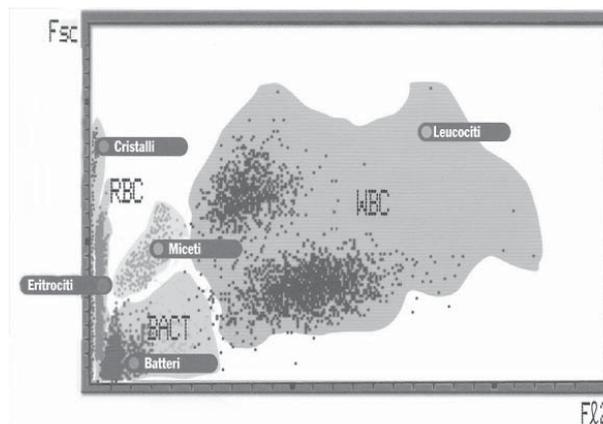
**Figura 2.** Risultati visibili sulla schermata principale del citofluorimetro Sysmex UF-100 dopo analisi di un campione di urina.

vuta a trascinamento tra un campione e l'altro da parte dei processi di aspirazione dello strumento utilizzato per lo screening (verifica della qualità del lavaggio/decontaminazione).

Da un punto di vista analitico, si è scelto di testare il sistema Sysmex UF-100 (Dasit, Milano), un analizzatore automatico in grado di identificare e contare la parte corpuscolata dell'urina.

L'UF-100 opera su campione nativo utilizzando i principi della citofluorimetria e dell'impedenziometria per identificare e contare gli elementi figurati presenti nell'urina<sup>11-13</sup>. Oltre a batteri, lieviti e leucociti, i parametri rilevati dal sistema UF-100 sono costituiti da emazie, cellule epiteliali, cilindri ialini e con inclusioni, cellule epiteliali di transizione, cristalli e spermatozoi. Gli elementi corpuscolati presenti nel campione, dopo la colorazione con un componente fluorescente, passano focalizzati idrodinamicamente, nella camera di lettura: il loro passaggio devia il fascio di luce laser e genera sia un segnale di diffusione frontale (scattering) della luce, sia un segnale di fluorescenza. I parametri misurati sono convertiti in segnali elettrici che, analizzati, permettono l'identificazione dei diversi elementi presenti nell'urina. Per caratterizzare il campione viene inoltre misurata la conduttività della soluzione che è proporzionale all'impedenza e quindi al volume cellulare. L'analizzatore UF-100 permette l'accesso analitico casuale, può essere dotato di lettore di codice a barre e consente, in totale automazione, una volta sistemate le provette con i campioni negli appositi rack, di miscelare, aspirare, diluire, colorare e analizzare i campioni alla velocità di 100 test/ora. La manualità da parte del personale tecnico è ridotta al minimo con ovvi vantaggi dal punto di vista della riduzione dei rischi e del risparmio di tempo e tutte le fasi sono standardizzate, con l'effetto di eliminare tutte le variabili preanalitiche, fonti di errori e imprecisioni. I risultati sono espressi in valori quantitativi per tutti i parametri misurati (Fig. 2).

L'analisi viene eseguita su campione nativo non cen-



**Figura 3.** Localizzazione dei vari elementi cellulari sullo scattergram di Sysmex UF-100.

trifugato e richiede un volume minimo di campione pari a circa 4 ml se si impiega la procedura automatica (che prevede l'agitazione del campione) e di 1 ml se si impiega la procedura manuale. I dati numerici e gli *scattergram* di ogni campione sono visualizzati su display. I referti possono essere stampati singolarmente a colori completi di grafici, oppure cumulativamente, accorpatisi in una stampa compattata per l'archivio, che ha una capacità di memoria pari a 1000 campioni completi, richiamabili a video e/o stampabili in qualsiasi momento, indipendentemente dall'operatività in corso, ed è predisposto per l'interfacciamento con host computer attraverso un PC gestionale.

In un flusso ideale di lavoro, i campioni sono caricati sullo strumento mano a mano che giungono in laboratorio, in quanto il campionatore dell'UF-100 può essere rifornito in continuo senza necessità di reimpostare la lista di lavoro. I dati sono trasmessi in tempo reale al PC gestionale: se non si ritiene necessaria una revisione microscopica del campione, il referto può essere direttamente stampato o trasmesso all'host computer.

I risultati così ottenuti sono disponibili praticamente in tempo reale, dopo solo qualche minuto dal ricevimento del campione, in genere già nelle prime ore della mattinata.

Per quanto riguarda i parametri di interesse microbiologico utilizzati nello screening delle urine inviate per sospetto di IVU, quali leucociti, batteri e lieviti, essi sono individuabili e monitorabili a video attraverso l'analisi dello scattergram (Fig. 3): i leucociti sono rappresentati nell'area indicata come WBC nel primo scattergram della prima pagina del display.

I nuclei dei leucociti si colorano intensamente, perciò nell'immagine essi sono localizzati nell'area di alti valori di *fluorescent light intensity* (Fl), in alto nello scattergram.

La morfologia dei leucociti urinari, così come quella degli eritrociti, è caratterizzata da una grande variazione, perciò le distribuzioni dei valori di *forward scattered light intensity* (Fsc) e Fl variano notevolmente da campione a campione. I batteri sono rappresentati nell'area indicata come BACT negli scattergram che appaiono

nella prima e seconda pagina del display.

I miceti e gli spermatozoi sono rappresentati nell'area indicata come YLC, SPERM sullo scattergram Fsc/Fl sulla prima pagina del display.

La Fl dei miceti è relativamente elevata con valori di intensità variabili tra quelli di un globulo rosso ed di un globulo bianco (Fig. 3).

Attraverso l'utilizzo di una serie ripetuta di campioni di urina di soggetti sani con e senza conservante sono stati determinati i valori soglia (cut-off strumentale) per la selezione dei negativi e dei positivi all'analisi citofluorimetrica. Durante questa fase sperimentale si è potuto così constatare la notevole interferenza dovuta al grado di cristallizzazione dell'acido borico sui valori di cut-off rispetto alle urine senza conservante. Al termine delle valutazioni su campioni normali, la soglia per la valutazione della sospetta positività di IVU è stata infine fissata ad un valore rispettivamente di 10.000 batteri e/o 50 leucociti/ $\mu\text{L}$ , ben più elevato rispetto ad altre analoghe sperimentazioni che non hanno però utilizzato l'acido borico come conservante<sup>11-16</sup>.

Lo studio è stato eseguito su 546 campioni raccolti da pazienti ricoverati e ambulatoriali. La raccolta è stata effettuata in due provette sterili con acido borico mediante prelievo con "mitto intermedio", utilizzando il sistema di collegamento Uriset. Una volta giunte in laboratorio, una delle due provette è stata inviata direttamente in semina con metodo tradizionale in piastra, in modo da *bypassare* l'eventuale processo di contaminazione dovuto al processo analitico con UF100. L'altra provetta è stata invece sottoposta prima allo screening citofluorimetrico utilizzando i predetti valori soglia di 10.000 batteri e/o 50 leucociti/mL e poi la stessa urina è stata seminata con metodo tradizionale in piastra, in modo da valutarne l'eventuale contaminazione riferibile al processo analitico con UF-100.

La doppia processazione è stata pensata per confrontare i due metodi, valutarne gli esiti e l'eventuale contaminazione dovuta al processo di screening, e per poter valutare l'opportunità o meno di usare una sola provetta per lo screening e la successiva semina dei campioni risultati positivi all'analisi citofluorimetrica.

## Risultati

I risultati ottenuti dallo screening con UF-100 sono riassunti nella Tabella III: dei 546 campioni esaminati con citofluorimetria, 218 (40%) hanno superato i valori soglia predefiniti e sono stati ritenuti POSITIVI, mentre 328 campioni (60%) hanno dimostrato valori al di sotto della soglia e sono stati ritenuti NEGATIVI.

Confrontando il numero di campioni risultati positivi con il citofluorimetro ed il numero di campioni che hanno presentato successivamente carica batterica significativa all'esame colturale, considerato come *gold standard*, si sono ottenuti i seguenti risultati:

- 139 (25%) campioni sono stati considerati VERI

**Tabella III:** risultati positivi e negativi in assoluto e percentuali ottenuti con UF100 su un totale di 546 urine esaminate (soglia 10.000 batteri e/o 50 leucociti/ $\mu\text{L}$ )

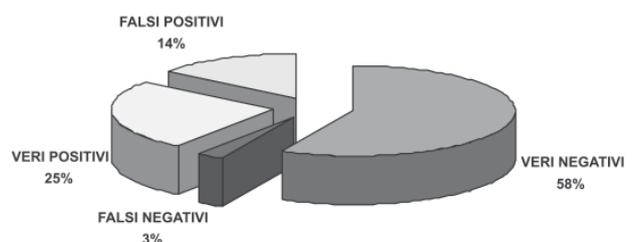
Totale campioni	Positivi	Negativi
546	218	328
100%	40%	60%

POSITIVI (VP), con una totale concordanza tra il risultato dell'UF-100 e quello colturale;

- 79 (14%) sono stati considerati FALSI POSITIVI (FP), in quanto alla positività evidenziata con UF-100 ha corrisposto un risultato negativo dell'esame colturale;
- 313 (58%) sono stati considerati VERI NEGATIVI (VN), in quanto alla negatività evidenziata con UF-100 ha corrisposto un risultato altrettanto negativo dell'esame colturale;
- 15 (3%) campioni sono stati considerati FALSI NEGATIVI (FN), in quanto alla negatività evidenziata con UF-100 ha corrisposto un risultato positivo dell'esame colturale.

I risultati sono riassunti graficamente nella Figura 4 e consentono di esprimere un valore predittivo negativo (VPN) di 0.96 e un valore predittivo positivo (VPP) di 0.64. Trattandosi di una valutazione volta a valutare l'efficacia strumentale nell'individuare i campioni veri negativi, in quanto i campioni positivi vengono comunque sottoposti ad esame colturale, il risultato ci è parso di assoluta eccellenza analitica. Inoltre, la valutazione del livello di concordanza/discordanza tra il risultato colturale del campione considerato potenzialmente contaminato, passato cioè attraverso lo screening con UF-100 e successivamente seminato, e il risultato colturale del campione seminato direttamente, ha inoltre permesso di ottenere una concordanza del 100%, consentendo di ritenere assolutamente sufficiente il lavaggio automatico operato dal campionatore con il liquido di diluizione per scongiurare fenomeni di trasciamento o inquinamento tra un campione e l'altro e a garantire dunque in modo assoluto il livello di concordanza dei positivi e negativi segnalati dallo strumento rispetto alla semina in piastra, consentendo altresì di considerare sufficiente l'utilizzo nella routine diagnostica di un'unica provetta.

Nel corso della sperimentazione è stato anche valu-



**Figura 4.** Grafico esemplificativo delle percentuali risultanti dall'elaborazione dei dati ottenuti sperimentalmente.

tato l'impatto del PAR Test sulla valutazione clinica delle urocolture. Sono emersi alcuni interessanti risultati, così riassumibili:

- l'11.5% dei campioni esaminati presentava PAR positivo;
- il 3.8% dei campioni falsi positivi allo screening era costituito, come peraltro atteso, da urine con PAR positivo, in quanto pazienti in trattamento antimicrobico presentano cellule batteriche non vitali che vengono comunque rilevate strumentalmente, oltre alla presenza spesso di un elevato numero di leucociti polimorfonucleati dovuti al processo infettivo non ancora risolto;
- tutti i campioni veri positivi con PAR positivo (7.7%) hanno rilevato all'esame colturale cariche >100.000 UFC/mL e/o isolamenti di *Candida spp.*

L'insieme di questi parametri ci fa dubitare circa la reale utilità dell'esecuzione del PAR test nella routine diagnostica come parametro capace di attribuire valore aggiunto all'esame colturale e alla valutazione clinica del risultato dell'urocoltura.

## Discussione

Il percorso pensato per valutare una possibile razionalizzazione dei processi preanalitici e analitici delle urocolture ha permesso di trarre alcuni importanti conclusioni utili per razionalizzare i flussi operativi e la gestione della diagnostica delle IVU.

Da un punto di vista organizzativo della fase preanalitica, la modifica al sistema di campionamento per l'esecuzione dell'urocoltura mediante l'utilizzo di una provetta con idoneo conservante consente di migliorare significativamente la qualità analitica globale e la sicurezza nelle fasi di manipolazione, conservazione e trasporto dei campioni dai vari distretti e punti di prelievo attivati in periferia e dai presidi ospedalieri dai quali sono stati recentemente assorbiti nuovi carichi di lavoro, diminuendo al tempo stesso la percentuale delle cariche batteriche miste, con una contestuale diminuzione delle ripetizioni degli esami colturali.

Si può peraltro valutare, in base alle singole realtà, se sia più conveniente prediligere una conservazione di tipo chimico, come in questo caso, o di tipo fisico, utilizzando contenitori termostatici, in quanto è apparso evidente che il grado di cristallizzazione dei borati influisce in modo significativo sui livelli soglia strumentali di UF-100, obbligando a un attento monitoraggio delle soglie e a una loro totale revisione ogni qualvolta ci si trovi a cambiare fornitore di provette e/o tipologia di conservante. Da un punto di vista organizzativo si può inoltre prevedere di agire migliorando ulteriormente il livello di maneggevolezza nel campionamento da parte del paziente introducendo contenitori per la raccolta già muniti di holder per l'aspirazione diretta in provetta vacutainer.

Certamente uno dei risultati più rilevanti dello studio è apparsa la possibilità di utilizzare una sola provetta per eseguire contestualmente lo screening e l'eventuale

esame colturale dei campioni risultati positivi. Come descritto, si è infatti evidenziata una concordanza assoluta nel risultato colturale tra il campione seminato dopo l'analisi citofluorimetrica ed il campione seminato direttamente.

Se l'analisi citofluorimetrica dovesse diventare pratica quotidiana per lo screening delle urocolture nei laboratori di microbiologia, non si ravviserebbe dunque la necessità di un doppio prelievo, ma una sola provetta sarebbe sufficiente per effettuare screening ed eventuale semina.

La possibilità di utilizzare una sola provetta consente tra l'altro una migliore maneggevolezza della fase di raccolta del campione, spazi più ridotti di trasporto, un minor numero di campioni in fase di smistamento e accettazione, oltre a un discreto risparmio economico sull'intero processo.

Da un punto di vista analitico, l'ottimo valore predittivo negativo rilevato (0.96), assolutamente importante sotto il profilo dell'efficacia del processo di screening, consente di affermare che il sistema garantisce l'eccellenza analitica che ci proponevamo di ottenere con la nostra valutazione sperimentale.

La percentuale di falsi positivi rilevata, pari al 14% degli esaminati, dal canto suo non va ad inficiare se non in relativa misura l'efficienza del processo di screening, in quanto influisce solo marginalmente sul numero di campioni da seminare.

Vale la pena sottolineare inoltre che la percentuale di falsi negativi, pari al 3% degli esaminati, è parsa altrettanto ininfluente, in quanto l'esame colturale ha consentito di evidenziare tra questi solo due campioni con carica significativa >100.000 UFC/mL, mentre gli altri 13 erano costituiti da cariche microbiche miste o isolamenti di *Streptococcus agalactiae* in donne fertili con cariche <100.000 UFC/mL, con significato di esplicita contaminazione.

Sotto il profilo gestionale, l'elemento che però forse ci sembra tra i più interessanti è altresì rappresentato dalla capacità del sistema di poter influire positivamente sul miglioramento globale del TAT. Considerato che il TAT dei campioni positivi già allo stato attuale si colloca nella nostra realtà a livelli di assoluta eccellenza se rapportato alle più recenti linee guida internazionali<sup>1,2,6,8</sup>, uno degli obiettivi dello studio consisteva, infatti, nel verificare quanto un sistema come UF-100 fosse in grado di determinare un sensibile miglioramento anche del TAT dei campioni negativi, particolarmente utile nel dirimere clinicamente un sospetto di IVU. L'utilizzo della citofluorimetria ha così dimostrato la possibilità di offrire una sensibile riduzione del TAT dei campioni negativi: il 60% dei campioni (nel nostro caso circa 9.800 urine/anno) è apparso infatti refertabile come negativo praticamente in tempo reale, ciò riflettendosi ovviamente in maniera assolutamente positiva sui tempi di risposta complessivi dell'urocoltura. La possibilità, inoltre, di eliminare in pochi minuti dall'arrivo in laboratorio una quota considerevole di campioni ne-

gativi allo screening si ripercuote in modo assolutamente positivo anche sulla gestione e smistamento dei campioni, sulla loro conservazione e sulla rapidità di refertazione.

Infine, la riduzione del numero di urine da sottoporre a semina e l'estrema semplicità e rapidità nella gestione strumentale del citofluorimetro comporta un beneficio non solo in termini strettamente economici, ma è in grado soprattutto di liberare risorse umane per attivare o migliorare altre più rilevanti attività diagnostiche. Rimane insoluto e degno di attenta analisi il problema dell'utilità o meno di eseguire il PAR test contestualmente all'esame colturale delle urine. Dai dati ottenuti nel presente studio sembra di poter sostenere che tra la disponibilità del PAR test e la leucocituria quantitativa, sia probabilmente preferibile sotto il profilo strettamente clinico investire sulla seconda. Da questo punto di vista un'analisi più approfondita ci consentirà di considerare più concretamente un aspetto spesso sottovalutato dell'analisi microbiologica delle urine.

L'utilizzo della citofluorimetria, se contestualmente inserito in una profonda revisione dei flussi analitici e preanalitici in microbiologia, appare dunque assolutamente incoraggiante.

Da un punto di vista delle possibili evoluzioni strumentali, il nostro studio ha messo in evidenza alcune possibili e auspicabili evoluzioni del sistema, che potrebbero migliorarne in modo consistente il livello di sicurezza, operatività ed efficienza, quali ad esempio l'utilizzo di un modulo di agitazione continua dei campioni e l'aspirazione con ago campionatore da provetta chiusa, sul modello di quanto ormai già ampiamente sperimentato in ematologia.

## Bibliografia

1. Kouri T, Fogazzi G, Gant G, Hallander H, et al. European Urinalysis Guidelines. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60: 1-97.
2. Camporese A. L'esame microbiologico dell'urina. *Riv Med Lab JLM* 2002; 3:38-43.
3. Huicho L, Campos-Sanchez M, Alamo C. Metaanalysis of urine screening tests for determining the risk of urinary tract infection in children. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 1-11.
4. Kass E. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans Assoc Am Phys* 1956; 69: 59-63.
5. Kass E. Pyelonephritis and bacteriuria. *Ann Intern Med* 1961; 56: 46-53.
6. Camporese A. The impact of automation on organizational changes in a community hospital microbiology laboratory: the passage from a "biological" management to a "clinical" management. *Inf Med* 2004; 12:118-25.
7. Camporese A, Tizianel G, Cappelletti P. L'impatto dell'automazione e dell'informatica nel processo di cambiamento dell'organizzazione del laboratorio di microbiologia. Abstract XVII° Congresso Nazionale SIMeL, Lamezia Terme (CZ)- 3-5 Ottobre 2003. *Riv Med Lab JLM* 2003; 3 (Suppl 1):113.
8. Camporese A, Boschian M, Grosso S, Favero L, Zigante P, Tizianel G. Indicatori di qualità e di *outcome* in microbiologia clinica: un esempio applicato alla diagnostica delle uroculture. Abstract XXXIII° Congresso Nazionale AMCLI, Padova 8-11 Giugno 2004. *Microbiologia Medica* 2004; 19:174.
9. Eriksson I, Lindman R, Thore M. Microbiological evaluation of a commercial transport system for urine samples. *Scand J Clin Lab Invest*. 2002; 62:325-35.
10. Hoppin JA, Ulmer R, Calafat AM, Barr DB, Baker SV, Meltzer HM et al. Impact of urine preservation methods and duration of storage on measured levels of environmental contaminants. *J Expo Anal Environ Epidemiol* (in stampa).
11. Kouri TT, Kähkönen UM, Malmiemi KH, Vuento R, Rowan RM. Evaluation of Sysmex UF-100 Urine Flow Cytometer vs Chamber Counting o supravivally stained specimens and conventional bacterial cultures. *Am J Clin Pathol* 1999; 112:25-35.
12. Regeniter AV, Haenni L, Risch HP, Köchli JP, Colombo R, Freihand AR. Huber Urine analysis performed by flow cytometry: reference range determination and comparison to morphological findings, dipstick chemistry and bacterial culture results. A multicenter study. *Clinical Nephrology* 2001; 55:384-92.
13. Manoni F, Valverde S, Antico F, Salvadego M, Giacomini A, Gessosi G. Field evaluation of a second-generation cytometer UF-100 in diagnosis of acute urinary tract infections in adult patients. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 662-8.
14. Manoni F, Valverde S, Antico F, Giacomini A, Salvadego M, Gessosi G. Measurement of urine leucocytes by a second generation flow cytometer: application in the diagnosis of acute urinary tract infections in adult patients. *Riv Med Lab JLM* 2001; 2:19-27.
15. Valverde S, Maturi P, Penzo L, Giacomini A, Antico F, Manoni F et al. Diagnostica delle infezioni delle vie urinarie mediante UF-100: un anno di esperienza in un laboratorio generale. *Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio* 2003; 9:5-12.
16. Rossetti R, Masi R. Impiego dello strumento UF-100 come metodica di screening per la diagnosi delle infezioni urinarie. *Microbiologia Medica* 2002; 17:312-6.