

Tecnologia ed automazione dell'esame urine microbiologico

F. Manoni, S. Valverde*, P. Hoffer

Regione Veneto AULS 17 – Dipartimento di Patologia Clinica Servizio di Medicina di Laboratorio, Monselice PD.

* Regione Veneto AULS 14 – Dipartimento di Patologia Clinica Servizio di Medicina di Laboratorio, Chioggia, VE.

Considerazioni Introduttive

Ancora oggi la Microbiologia è la branca della Medicina di Laboratorio che si è meno giovata dell'introduzione dell'automazione del processo analitico. Schematicamente possiamo scomporre il procedimento di una indagine microbiologica classica (mediante esame colturale) in cinque fasi:

Fase pre-analitica.

Fase analitica in cui distinguere: a) una procedura obbligata di approccio: semina del campione e rilevazione della eventuale crescita microbica eseguita su tutti i campioni; b) una fase discrezionale di valutazione della crescita microbica in relazione a quantità e qualità di crescita delle colonie a cui segue c) una fase di approfondimento in cui effettuare l'isolamento, l'identificazione la determinazione del profilo di sensibilità ai chemio-antibiotici.

Fase post-analitica: produzione di un referto ed elaborazione di dati statistico-epidemiologici locali.

La necessità di prelievi dedicati alle analisi microbiologiche rende solitamente superflua l'adozione di una automazione della fase pre-analitica non essendo necessario "condividere" il campione con altre aree diagnostiche all'interno del laboratorio né, di norma, è richiesta l'esecuzione di numerose e diverse analisi richiedenti differenti tecniche analitiche. Il processo analitico in microbiologia è quindi un processo discontinuo con momenti decisionali legati alla capacità discrezionale del microbiologo. L'analisi microbiologica utilizza diverse tipologie di campione che necessitano di procedure di semina e di coltura differenziate. Considerata la tipologia del processo analitico in microbiologia è evidente che le fasi nelle quali risulta più vantaggiosa l'introduzione di tecnologie per l'automazione delle procedure siano la fase obbligata di screening, le prove di identificazione, l'esecuzione degli antibiogrammi.

Presupposti all'automazione delle urinocolture

Le urinocolture sono state l'esame su cui si sono maggiormente concentrati gli sforzi tecnologici per fornire procedure che consentissero una risposta ra-

pida ed affidabile. Questo è riconducibile a vari ordini di fattori¹⁻³:

- a) grande numero di richieste,
- b) elevata incidenza di campioni negativi,
- c) materiale liquido disponibile solitamente in discreta quantità,
- d) bassa contaminazione del materiale in condizioni fisiologiche,
- e) elevata percentuale di infezioni monomicrobiche.

Nella diagnostica microbiologica tradizionale i tempi analitici, essendo funzione della velocità di replicazione dei batteri, sono assai lenti rispetto alle altre branche della medicina di laboratorio. Il TAT indicato come ottimale dalla ECML (European Confederation of Laboratory Medicine – European Urinalysis Group) è il seguente⁴:

- Identificazione di micro-organismi da coltura pura: 90% entro 24 h
- Identificazione di micro-organismi da coltura mista: 90% entro 48h
- Produzione dell'antibiogramma: 90% entro 48h

Quindi anche rispettando questi obiettivi (cosa non facile, soprattutto per quanto attiene la produzione del 90% dei referti completi entro le 48h) non sempre è possibile, per il medico pratico, attendere il referto microbiologico per formulare una diagnosi ed impostare la terapia. La tecnologia ha quindi assunto il compito di ridurre i tempi per le fasi analitiche obbligate consentendo la refertazione dei campioni negativi nel più breve tempo possibile escludendo dalla diagnostica differenziale la possibilità di una infezione delle vie urinarie (UTI) ciò si traduce in un abbattimento del TAT in almeno il 60-70% dei campioni.

I Test Automatizzati per la Diagnostica Rapida (test di Screening)

I metodi di screening si basano sulla dimostrazione di batteriuria e/o leucocituria "significative" ed in questo campo si sono focalizzati gli sforzi della tecnologia biomedica.

I metodi di diagnostica rapida nel campo delle UTI trovano indicazione in almeno quattro classi di ap-

plicazioni:

1. Giovani donne a basso rischio in presenza di sintomatologia tipica.
2. Servizi di emergenza come primo approccio diagnostico.
3. Screening in gruppi di pazienti selezionati ad esempio donne a termine di gravidanza.
4. Selezione dei campioni da avviare all'esame colturale classico.

Procedure diagnostiche rapide non colturali

- Esame microscopico di un preparato allestito facendo asciugare su di un vetrino porta oggetti una goccia di urine non centrifugate, un volta evaporata la parte liquida il residuo secco viene fissato con metanolo e colorato secondo Gram.
- Il metodo è piuttosto laborioso e richiede un microscopista esperto, inoltre la sensibilità del metodo (1 batterio / μL) è equivalente al cut-off diagnostico (100.000 batteri / mL)^{5,6}.
- Rilevazione della esterasi leucocitaria che viene liberata a seguito dell'esposizione ad un medium non isotonic (urine), l'enzima liberato reagisce con un substrato (estere di indoxile) idrolizzando, l'indoxile libero reagisce con un sale di diazonio a dare un composto colorato. Il metodo ha una sensibilità di 25 batteri/mL, se le urine sono isotoniche si hanno falsi negativi.
- Rivelazione dei nitriti urinari che originano dai nitrati escreti dall'emuntorio renale per opera del metabolismo di alcune specie batteriche (es. *Escherichia coli* ed altre enterobacteriacee), i falsi negativi sono dovuti principalmente alla presenza di specie batteriche importanti come patogeni urinari che non sono in grado di ridurre i nitrati in nitriti (*Enterococchi*).
- L'associazione di questi due test ha dimostrato elevata specificità e sensibilità (oltre 0.85) nella diagnostica delle infezioni acute delle vie urinarie sostenute da batteri produttori di nitriti in pazienti non neutropenici^{7,8}.
- Filtrazione delle urine su carta con intrappolamento delle particelle (cellule, batteri, cristalli) e colorazione del materiale con arancio di acridina, il principale limite di questa metodica risiede nel fatto che non possono essere utilmente processate urine con marcata colorazione e pertanto risulta inapplicabile in percentuali elevate (sino al 20%) dei campioni⁹.
- Sistemi in chemiluminescenza che misurano la luminescenza prodotta dalla ossidazione della luciferina ad opera del metabolismo batterico come reazione accoppiata alla defosforilazione di ATP; la quantità di luce prodotta è direttamente proporzionale alla carica batterica presente nel campione, tale test è accreditato di elevata sensibilità (0.99) e discreta specificità (0,70)¹⁰⁻¹².
- Utilizzo di cards basate sulla immunocromatografia che permettono l'evidenziazione e l'identificazione presuntiva di *Escherichia coli* nei campioni urinari¹³.
- Citofluorimetri dedicati alla frazione corpuscolata delle urine (UF-100 Sismex, JPN) utilizzano due diversi fluorocromi: fenantidrina (di colore arancio 610 nm) che colora il DNA penetrando tra le basi e la carbocianina (di colore verde 505 nm) che colora le membrane essendo liposolubile. Oltre alla fluorescenza lo strumento utilizza l'impedenziometria per la conta delle particelle e la quantificazione delle loro dimensioni. I segnali vengono opportunamente elaborati in modo da fornire degli istogrammi bidimensionali che consentono di differenziare e quantificare le particelle corpuscolate delle urine tra cui i leucociti, batteri e miceti¹⁴⁻¹⁹.

Tabella I. Descrizione della casistica esaminata.

Pazienti	Numero	Maschi	Femmine	Positivi (N°)	Positivi (%)
Ambulatoriali	1.130	496	634	226	20
Degenti	880	374	506	295	33,5*
Totale	2.010	870	1.140	521	25,9

* La differenza nella prevalenza delle infezioni delle vie urinarie tra pazienti ambulatoriali e ricoverati appare statisticamente significativa ($p < 0.05$)

Tabella II. Performance analitica dei vari metodi di metodica rapida automatizzata

	SE	SP	VPP	VPN	IBC
Nitriti + Esterasi	0.88	0.64	0.63	0.89	0.82
Crescita in TSB e lettura fotometrica	0.98	0.89	0.90	0.96	0.95
UF-100 (batteriuria + leucocituria)	0.97	0.95	0.93	0.98	0.96

SE = Sensibilità, SP = Specificità, VPP = Valore Predittivo Positivo, VPN = Valore Predittivo Negativo, IBC = Incidenza di Ben Classificati.

Procedure diagnostiche rapide colturali

- Gli screening colturali si basano tutti sulla inoculazione di un piccolo volume di urine in un terreno liquido ad ampia fertilità e sulla rilevazione cinetica delle curve di crescita batterica in fase esponenziale. Ad esempio il sistema Uro-Quik (Alifax, ITA) si basa sull'uso di un terreno liquido (TSB) che viene inoculato con una piccola aliquota di urina ed incubato a 37°C in agitazione e sottoposto a ripetute letture fotometriche al fine di evidenziarne le eventuali variazioni di torbidità indice di una crescita batterica. Tale metodo è in grado di garantire prestazioni di elevata sensibilità e specificità (oltre 0,95), di contro richiede alcune ore per fornire il risultato. Su principi analoghi si basavano i sistemi Vitek e MS2²⁰.
- In questi ultimi tempi si sono resi disponibili dei dispositivi in grado di effettuare in completa automazione la semina dei campioni da sottoporre ad esame microbiologico delle urine. Il sistema Robobact proposto dalla Universal Diagnostics (UK) che semina i campioni su slide, mentre il sistema Inoculab proposto dalla Dynacon (CAN) è in grado di effettuare l'inoculo su piastra di Petri.

Automazione del PAR test

La presenza di sostanze ad attività antibatterica nelle urine può dare negatività all'esame colturale pur in presenza di una batteriuria significativa, in questo caso si evidenzia una discrepanza tra l'esame microscopico (che evidenzia batteriuria e leucocituria) ed esame colturale che risulterà negativo. In effetti ci può essere una discrepanza tra metodi colturali (che evidenziano le cellule batteriche vitali ed in grado di moltiplicarsi) e metodi che evidenziano i batteri come particelle da contare (conta degli elementi fisicamente presenti nel campione che siano vitali o meno). Attualmente sono disponibili delle metodologie in automazione per la determinazione del PAR, ad esempio misurando le differenti cinetiche di crescita di un ceppo sensibile in due ampole di terreno liquido una delle quali inoculata con le urine in esame (Uro-Quik, Alifax ITA).

Comparazione di metodiche per la diagnostica rapida automatizzata

In batteriologia al momento non esiste un test di riferimento universalmente accettato per l'urinocoltura, mentre esistono delle procedure qualificate di comparazione. Queste procedure prevedono la quantificazione della carica microbica con diluizione delle urine a fattore 10 e conta colonia (media di tre conte, una per ciascuna di tre diluizioni contigue), si usa un inoculo con ansa calibrata da 10 microlitri su CLED agar. Per quanto attiene la semina si racco-

manda l'uso di terreni selettivi e terreni ad ampia fertilità (addizionati con sangue e/o sangue cotto) in aerobiosi, microaerofilia ed anaerobiosi (i germi anaerobi sono raramente in causa nella eziopatogenesi delle infezioni urinarie ma molti dei patogeni comuni crescono meglio in anaerobiosi). Contro queste procedure qualificate di comparazione vengono valutate le procedure diagnostiche utilizzate nei Laboratori Clinici. Nella valutazione delle performance ottenute dai metodi rapidi automatizzati ci si deve necessariamente riferire a queste ultime od ancor meglio alla diagnosi clinica.

L'automazione delle urinocolture nella nostra esperienza

L'esigenza di ridurre il TAT e di orientare le ridotte risorse umane sulle procedure più complesse di indagine ha da oltre 13 anni spinto il nostro Servizio a ricercare quelle tecnologie che potessero automatizzare la fase obbligata dell'esame microbiologico delle urine senza scadimento della qualità analitica.

Proprio i limiti denunciati dalla mancanza di procedure analitiche di riferimento ci hanno indotto a confrontare tre metodi automatizzati di screening contro la diagnosi clinica ottenuta integrando i risultati ottenuti dall'esame colturale su tre terreni (CLED agar, Agar Mc Conkey ed agar Columbia CNA) con le informazioni anagrafiche e cliniche desunte dall'apposito modulo di richiesta.

Sono stati considerati i campioni urinari di 2010 pazienti consecutivi di età compresa tra 18 e 78 anni, gran parte dei quali ottenuti con la tecnica del mitto intermedio.

Ciascun campione è stato sottoposto ai seguenti accertamenti:

Dip-stick per esterasi e nitriti (Menarini, ITA)

Inoculazione in TSB e lettura fotometrica con sistema Uro-Quik

Esame con UF 100 (Sysmex, JPN)

Esame colturale classico con semina sui tre terreni citati precedentemente e correntemente in uso nel nostro Laboratorio.

I germi in grado di dare infezione delle vie urinarie sono classificabili in quattro classi in base al loro potere patogenetico:

Prima Classe: uropatogeni primari. Germi in grado di dare frequentemente UTI in soggetti con vie urinarie normali (es. *Escherichia coli*, *Enterococchi*).

Seconda Classe: uropatogeni secondari. Germi in grado di dare raramente UTI in soggetti con vie urinarie normali ma frequentemente in causa in UTI in soggetti con patologie predisponenti o nel caso di infezioni nosocomiali (es. *Enterobatteri*, *Stafilococco aureo*, *Pseudomonas*).

Terza Classe: germi di dubbia uropatogenicità. Germi che possono dare talvolta UTI in soggetti ospedalizzati, immunodepressi, con patologia predi-

Curve Roc: La figura mostra le curve ROC per la leucocituria suddivise per sesso e per pazienti ambulatoriali ed ospedalizzati.

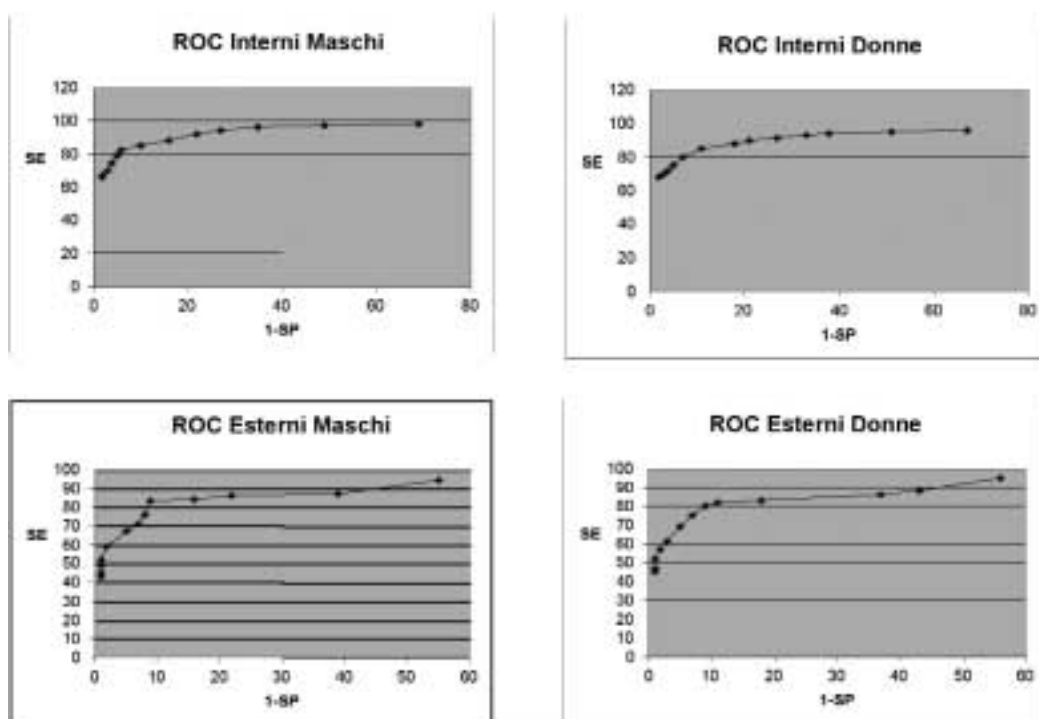


Tabella III. Germi isolati in 529 casi di infezioni urinarie acute nell'adulto

Micro organismo	Ceppi isolati	Classe di Patogeni
Batteri Gram Negativi		
Escherichia coli	221	I
Klebsiella sp	27	II
Pseudomonas sp	25	II
Proteus sp	22	II
Enterobacter sp	21	II
Serratia sp	18	II
Acinetobacter sp	6	III
Salmonella sp	4	II
Batteri Gram Positivi		
Group D Enterococcus	127	I
Staphylococcus aureus	33	II
Streptococcus sp	8	III
Staphylococcus albus	5	III
Altri	4	IV
Miceti		
Candida albicans	8	III

sponte (es. Miceti lieviformi, Stafilococco albo, Acinetobacter).

Quarta Classe: germi privi di uropatogenicità. Costituiscono la normale flora microbica delle mucose genitali, assumono rilevanza patologica solo in casi eccezionali e devono essere considerati solo in caso di isolamento da urine ottenute con metodica che ne pre-

servi la sterilità (es. puntura sovrapubica o cateterismo ureterale) (ad es. Streptococchi viridanti). Nella valutazione della performance analitica del test UF 100 abbiamo ritenuto interessante valutare la curva ROC relativamente alla leucocituria. Sono stati valutati separatamente i pazienti a seconda del sesso e della provenienza (degenti ed ambulatoriali)¹⁶.

Considerazioni conclusive

L'utilizzo di una procedura diagnostica deve tenere conto del contesto nel quale si evidenzia tale necessità e quindi anche test rapidi, in contesti privi di supporti diagnostici di laboratorio, possono dare utili informazioni al clinico. Oppure possono essere utilmente utilizzati in quei casi ove sia di preminente interesse la tempestività delle diagnosi. I test rapidi automatizzati si avvalgono oggi di tecnologie estremamente avanzate e di strumentazioni complesse ma di utilizzo relativamente semplice. La possibilità di disporre di sistemi diagnostici automatizzati consente inoltre una standardizzazione delle procedure analitiche. La possibilità di disporre di parametri aggiuntivi quale la quantificazione della leucocituria e la conoscenza di alcune caratteristiche morfologiche dei leucociti urinari consente di valutare l'impegno flogistico oltre che il dato batteriologico fornendo indicazioni circa i rapporti tra ospite e parassita aiutando la distinzione tra contaminazione ed infezione.

Bibliografia

1. Valenti W, Reese R. Genitourinary tract infection. In A Practical approach to infectious diseases. Reese R Douglas G Editors. Boston: Little Brown & Co.1986. p 327-58.
2. Kass E. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans Assoc Am Phys* 1956; 69: 59-63.
3. Kass E. Pyelonephritis and bacteriuria. *Ann Intern Med* 1961; 56: 46-53.
4. Kouri T, Fogazzi G, Gant G, Hallander H et alii. European Urinalysis Guidelines. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60/231: 1-87.
5. Toni M, Menozzi M, Allevato F, Schito G. Metodo semplificato di analisi batteriologica delle urine. *Ann Sclavo* 1977; 15/6: 1177-87.
6. Washinton J, White C, Laganbiere et al. Detection of significant bacteriuria by microscopic examination of urine. *Lab Med* 1981; 12: 59-68.
7. Pfaller M, Koontz P. Laboratory evaluation of leukocyte esterase and nitrite test for detection of bacteriuria. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 840-2.
8. Smalley D, Dittmann A. Use of leukocyte esterase-nitrate activity as predictive assays of significant bacteriuria. *J Clin Microbiol* 1984; 18: 1256-7.
9. Sawyer K, Stone L. Evaluation of a leukocyte dipstick test used for screening urine cultures. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 45-61.
10. Caciagli P, Caola I. Diagnostica delle infezioni delle vie urinarie: sinergia tra tecnologie. *Riv Med Lab JLM* 2001; 2/1: 266.
11. Drow D, Baum C, Hirschfield G. Comparison of the Lumac and Moonlight systems for detection of bacteriuria by bioluminescence. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 797-801.
12. Koenig C, Tick L, Hanna B. Analyses of the dflash track DNA probe and UTIscreen bioluminescence tests for bacteriuria. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 342-5.
13. Bartolucci M, Filippetti A, Scatista G. Application of the automated system for the research of residual antimicrobial activity in urines. 25° National Congress of the Italian Association of Clinical Microbiology. Pesaro October 8-11; 1996.
14. Ben-Ezra J, Bork L, McPherson R. Evaluation of Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer. *Clin Chem* 1998; 44: 92-5.
15. Manoni F, Valverde S, Antico F et al. 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; 2/3: 1-9.
16. Manoni F, Valverde S, Antico F, Salvadego M, Gessoni G. Screening della batteriuria con un citofluorimetro dedicato all'analisi della frazione corpuscolata delle urine. *Medicina di Laboratorio* 1999; 7/3: 245-52.
17. Murakana K. Clinical uses of UF-100 for the diagnosis of urinary tract infection. *Sysmex Journal International* 1996; 6: 46-50.
18. Kouri T, Ahkonen U, Malminiemi K et al. Evaluation of Sysmex UF-100 urine flow cytometer vs chamber counting of supravitality stained specimens and conventional bacterial cultures. *Am J Clin Pathol* 1999; 112: 25-35.
19. Langlois M, Delalanghe J, Steyaert S et al. Automated flow cytometry compared with an automated dipstick reader for urinalysis. *Clin Chem* 1999; 45: 118-22.
20. Mucignat G, Bianchini A, Callegaro A, Santini G. Un nuovo sistema automatico di screening per le urine URO-Quik. *Bollettino di Microbiologia e di Indagini di Laboratorio* 1992; 14: 1-5.