

## Diagnosi delle infezioni delle vie urinarie mediante quantificazione della batteriuria e della leucocituria con un citometro a flusso

S. Valverde, F. Antico, G. Gessoni, A. Giacomini, M. Salvadego, F. Manoni

Regione Veneto, ASL 14, Dipartimento di Patologia Clinica, Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Chioggia

**Abstract.** Background: A large numbers of screening test for rapid diagnosis of UTI were suggested in the Clinical Laboratory but every of these supposed questions other than showed solutions. So the ideal screening test for diagnosis of UTI is until now not available. Aim of this study is to evaluate the feasibility of a screening for rapid diagnosis of UTI by using a second generation flow cytometer. The authors evaluated the analytical performance of the Sysmex UF-100 cytometer versus the diagnosis of UTI supported by laboratory data coming from urine culture, microscopic examination, routine chemical analysis, and clinical data.

Materials and Methods: We considered 2010 consecutive subjects, age between 18 and 78, 870 males and 1140 females, whose recently collected urine samples were submitted for microbiological examination to our Laboratory. The majority (90.2% ) of the samples was voided urine specimens collected by using the midstream technique. The samples were collected in sterile containers and a 12 mL aliquot was transferred into test tubes and analysed within one hour. Each sample was submitted to microbiological evaluation (culture + RAA), dipstick tests, UF-100 examination and microscopic observation. These Laboratory results were considered together clinical data and patient's characteristics to obtain a final diagnosis of UTI. The analytical performance of the Laboratory tests was obtained by using this diagnosis as standard.

Results: Of the considered 2010 subjects in 529 (26.32%) we obtained a clinical diagnosis of UTI. The UF-100 based screening give these results SE=0.94, SP=0.93, PPV=0.83, NPV=0.98, CCI=0.93.

Conclusions: In our experience the results of the UF-100 based screening are comparable to data obtained from culture examination based on the simple evaluation of bacterial growth on CLED agar (cut-off 100.000 UFC/mL). The classical culture method needs of 24 hours for a results indeed the UF-100 based screening give us a results in few minutes with obvious benefit for patients and physicians. Moreover the quantification of bacteriuria and pyuria, used in this study as screening test for UTI, is not an new further time and labour expensive test in the to introduce in the Clinical Laboratory practice with corresponding costs, but it is a by-product of the examination of the corpuscle portion of urine by using a flow cytometer.

### Introduzione

Le principali manifestazioni cliniche delle infezioni acute delle vie urinarie (IVU) nei pazienti adulti sono la disuria con pollachiuria e stranguria eventualmente associate a febbre, senso di peso sopra pubico, ematuria etc. I principali segni rilevabili dal Laboratorio di Patologia Clinica sono la batteriuria e la piuria, di norma è necessario condurre un esame microbiologico delle urine sia per evidenziare, quantificare ed identificare l'agente eziologico, sia per studiarne il profilo di sensibilità ai farmaci antibatterici (1). Per la diagnosi di laboratorio delle IVU è di importanza critica la definizione di cosa si intenda per

batteriuria e/o piuria significative. Per quanto attiene la batteriuria i criteri stabili da Kass oltre 40 anni fa sembrano ancora validi ed è ampiamente accettato il criterio di considerare significativa di IVU una batteriuria superiore alle 100.000 unità formanti colonie /mL (UFC/mL) (2,3). Per quanto attiene la leucocituria il valore soglia non è ancora ben stabilito poiché la quantificazione microscopica dei leucociti urinari manca ancora di una adeguata standardizzazione, si può comunque ritenere che la presenza di più di 5-10 leucociti per campo ad alto ingrandimento (HPF) possa essere considerata significativa (3). Nella pratica del Laboratorio Clinico, sono stati proposti, nel corso degli anni, numerosi test per la dia-

gnostica rapida delle IVU questo è avvenuto in seguito a tutta una serie di considerazioni (4). In primo luogo il gran numero di campioni di urine che vengono quotidianamente inviati in Laboratorio per un esame microbiologico, si tratta senza alcun dubbio dell'esame colturale maggiormente richiesto nella pratica quotidiana. In secondo luogo l'osservazione che gran parte dei campioni dà esito negativo all'esame colturale. In terzo luogo il fatto che, di norma, le IVU sono mono microbiche, sono caratterizzate da una elevata carica batterica e che una varietà relativamente ristretta di germi è responsabile della quasi totalità delle forme morbose. Infine il fatto che, in condizioni usuali, i campioni di urine sono ottenibili in volumi adeguati e senza particolare disturbo per il paziente. I test per la diagnostica rapida delle IVU possono essere suddivisi in test colturali e test non colturali. Tra i test non colturali l'esame microscopico delle urine costituisce una metodica semplice per valutare la batteriuria e la leucocituria, peraltro richiede tempo, un osservatore esperto, manca in standardizzazione (5). La filtrazione su carta delle urine con intrappolamento dei batteri, loro colorazione, e lettura colorimetrica non ha dato i risultati sperati soprattutto perché il metodo non permette una corretta valutazione delle urine ipercromiche (6). Il test alla catalasi si è dimostrato dotato di scarsa Specificità e di una Sensibilità insoddisfacente (7,8). Sono disponibili anche dei test basati sulla bioluminescenza od utilizzanti sonde. Questi test sono sufficientemente accurati ma sono ancora troppo costosi per permetterne un largo impiego pratico (9,10). L'approccio più comune alla diagnostica rapida delle IVU utilizzando dei test non colturali rimane al momento l'impiego dei dip-stick per nitriti ed esterasi (11-15). Tra i test colturali l'unico che ha una certa diffusione prevede l'inoculazione di una aliquota del campione urinario in esame in una fiala contenente del terreno liquido: ad esempio brodo-triptosio (TSB), con incubazione a temperatura controllata in agitazione e lettura fotometrica per evidenziare l'eventuale sviluppo di torbidità. Si tratta di un metodo dotato di buone Specificità e Sensibilità che però risulta essere alquanto costoso e richiede almeno quattro ore per fornire un risultato (16,17).

Scopo dello studio è quello di valutare l'utilità di uno screening, per la diagnosi rapida delle IVU, condotto utilizzando la valutazione quantitative della batteriuria e della leucocituria ottenute utilizzando un citometro a flusso di ultima generazione (Uf-100) sviluppato espressamente per lo studio qualitativo e quantitativo della componente corpuscolata delle urine. Come riferimento per valutare la performance diagnostica del test in esame abbiamo ritenuto ottimale non utilizzare il risultato di un altro test di laboratorio ma la diagnosi finale di infezione acuta

delle vie urinarie che scaturisce non solo dai risultati dei test colturali e di laboratorio ma anche dalla sintomatologia, dalle caratteristiche del paziente, dalla sua storia clinica.

## Materiali e metodi

**Selezione dei pazienti:** Il presente studio è stato condotto presso il Dipartimento di Patologia Clinica della ASL 14 della Regione del Veneto, al dipartimento afferiscono i campioni di una area con una popolazione di circa 130.000 abitanti con due Ospedali per acuti uno di circa 300 e l'altro di circa 350 posti letto e di una struttura per lungodegenti di 120 posti letto. In questo studio sono stati valutati 2010 pazienti le cui urine sono state inviate al nostro Laboratorio per un esame microbiologico, l'età era compresa tra 18 e 78 anni (media 56,4), si trattava di 1130 pazienti ambulatoriali (496 maschi e 634 femmine) e di 880 pazienti ricoverati (374 maschi e 506 femmine). La gran parte dei campioni considerati (90,2%) erano stati ottenuti con la tecnica del mitto intermedio, i rimanenti mediante catetere endovesicale. I campioni sono stati raccolti in contenitori sterili e sono stati esaminati entro tre ore dalla raccolta. Per ogni paziente sono stati registrati sesso, età, sintomatologia, terapia, eventuali condizioni patologiche predisponenti le IVU, il sospetto diagnostico.

### *Esame chimico-fisico e screening per nitriti ed esterasi*

L'esame chimico fisico delle urine è stato eseguito con uno strumento completamente automatico utilizzante degli stick ad immersione in grado di fornire, dopo lettura fotometrica, una indicazione semi quantitativa relativamente a: peso specifico, pH, esterasi leucocitaria, nitriti, proteine, glucosio, corpi chetonici, urobilinogeno, bilirubina ed emoglobina (dip-stick Uriflet e strumentazione Super-Aution, Menarini FI) (18).

### *Esame microscopico*

L'esame microscopico del sedimento urinario è stato condotto in accordo con le raccomandazioni NCCLS/95. Una aliquota di 10 mL di ciascun campione considerato è stata centrifugata a 400g per 10 minuti al termine dei quali 9,5 mL sono stati eliminati e dal sedimento risopeso è stato allestito un vetrino che è stato esaminato a 400x (HPF) senza colorazione. Per ciascun campione sono stati esaminati, da un osservatore esperto, almeno 10 campi microscopici ed è stato valutato il numero medio di leucociti per campo (19).

### *Esame colturale*

Per la valutazione microbiologica dei campioni inviati 0,001 mL di urina sono stati inoculati, utilizzando una ansa calibrata, in un terreno ad ampia fertilità (agar CLED) per la valutazione quantitativa della batteriuria, ed in terreni elettivi e selettivi: agar di Mc Conkey per lo studio delle *enterobacteriaceae* e agar CNA per lo studio degli *enterococchi* (20,21). Nei campioni che all'esame colturale evidenziavano una batteriuria significativa, è stata eseguita una identificazione biochimica dei ceppi batterici e uno studio del profilo di sensibilità ai farmaci antibatterici utilizzando uno strumento completamente automatico (Microscan, DADE International Inc. Sacramento Tx). (22, 23).

### *Determinazione del PAR e screening colturale*

Per l'esecuzione di entrambi questi test abbiamo utilizzato una strumentazione automatica Uro-Quick (Alifax PD). Per quanto attiene lo screening con metodo colturale per ogni campione una aliquota da 0,5 mL è stata inoculata in una ampolla contenente TSB, questa ampolla è stata incubata a 37°C in agitazione per tre ore, ogni cinque minuti veniva eseguita in automatico una lettura dello scattering a 30° e 60° dopo illuminazione della coltura con luce laser a 670 nm. L'intensità dello scattering è proporzionale alla crescita batterica. Per quanto attiene la determinazione del potere antibiotico residuo (PAR) una aliquota da 0,5 mL di urina è stata inoculata in una ampolla contenente TSB ed un ceppo di *S. epidermidis* (ATCC 1222), l'eventuale presenza di PAR viene desunta dalla diversa cinetica di crescita rispetto a quella osservata in un controllo non inoculato con urine (24).

### *Esame con UF-100*

Lo strumento Sysmex UF-100 è un citometro a flusso di seconda generazione sviluppato dalla TOA Corporation (Jpn) per lo studio in completa automazione della porzione corpuscolata delle urine (25). Questo analizzatore aspira 0.8 mL di urine fresche non centrifugate che vengono trasferite in una unità di reazione ove sono trattate con 1,2 mL di un diluente che ha lo scopo di dissolvere i cristalli amorfi (sia urati che fosfati). Dopo questo trattamento vengono aggiunti due differenti coloranti: la carbocianina e la fenantidrina, questa miscela entra in una cella per la misura della conduttività. Dopo questa misurazione le urine passano in una cella a flusso ove vengono illuminate da una sorgente argon-laser, in questa cella vengono misurate la fluorescenza (FL), la "pulse-intensity" (FPI), la "pulse-width" (FPW) e il "forward-light-scatter" (FLS) (26). Queste misure integrate assieme vengono trasformate in tre pittogrammi caratteristici detti scattergrammi (27). Gli

eritrociti, i leucociti, le cellule epiteliali ed i batteri sono rappresentati nello scattergramma della FSC e della FL. Le cellule epiteliali sono anche rappresentate nello scattergramma della FSCW e della FLW (28). Per quanto attiene gli eritrociti, i leucociti, i batteri e le cellule epiteliali viene valutato anche il numero di elementi/ $\mu$ L, vengono inoltre forniti dati circa la morfologia degli elementi citati (29). In questo studio, per valutare l'efficacia dello screening con UF-100 nella diagnostica delle infezioni urinarie abbiamo considerato solamente la valutazione quantitativa della batteriuria con valore soglia a 100.000 elementi/mL, e della leucocituria con valore soglia a 25 elementi/ $\mu$ L (30, 31).

### *Elaborazione statistica*

In questo studio la performance analitica di tutti i test di laboratorio considerati è stata valutata non nei confronti di un altro test di laboratorio considerato come standard di riferimento ma contro il vero standard di riferimento e cioè la diagnosi finale di infezione acuta delle vie urinarie scaturita dall'integrazione di considerazioni cliniche e semeiologiche. L'analisi delle performance analitica dei test considerati ha compreso la valutazione della Sensibilità (SE), della Specificità (SP), del Valore Predittivo Negativo (VPN), del Valore Predittivo Positivo (VPP), della Incidenza di Ben Classificati (IBC). Per il raffronto delle medie abbiamo utilizzato il test "t" di Student, per il confronto delle proporzioni abbiamo utilizzato il test "ci quadro" di Pearson, in entrambi i casi abbiamo considerato significativo dal punto di vista statistico un valore  $p$  inferiore a 0.05 (32).

## **Risultati**

Nei 2010 pazienti considerati 529, pari al 26,3% sono stati giudicati affetti da una infezione delle vie urinarie, come evidenziato nella tabella 1 la prevalenza delle IVU differisce in maniera statisticamente significativa ( $P < 0.05$ ) considerando separatamente i pazienti ricoverati (IVU = 33,5%) dai pazienti ambulatoriali (IVU = 20,7%), nel nostro studio, al fine di correggere i dati di inerenti la Sensibilità e la Specificità alla luce della frequenza del fenomeno nella popolazione esaminata secondo un approccio corretto alla luce delle teorie di Bayes abbiamo considerato la prevalenza media nella popolazione considerata (26,3%). Nei 529 campioni di urine provenienti da pazienti affetti da IVU la batteriuria era superiore a 100.000 UFC/mL in 473 (89,4%), in 34 (6,4%) casi era positivo il PAR test ed i campioni provenivano da soggetti cui era già stata diagnosticata una IVU ed avevano iniziato una terapia antibatterica che pe-

**Tabella 1. Descrizione della casistica.**

Sono stati considerati 2010 campioni di urine provenienti da pazienti adulti, sottoposti per un esame microbiologico al Laboratorio dell'Ospedale di Chioggia. La grande maggioranza di tali campioni (90,2%) sono stati ottenuti con il metodo del mitto intermedio, i rimanenti 9,8% sono stati ottenuti mediante catetere endo-vescicale.

Pazienti	Numero	Maschi	Femmine	Affetti da IVU	% IVU
Ambulatoriali	1130	496	634	234	20,7
Ricoverati	880	374	506	295	33,5
Totale	2010	870	1140	529	26,3

La differenza nella prevalenza delle infezioni acute delle vie urinarie è risultata significativamente maggiore ( $p < 0,05$ ) tra i pazienti ricoverati piuttosto che tra i pazienti ambulatoriali.

**Tabella 2. Rapporti tra diagnosi di infezione delle vie urinarie e carica batterica rilevata all'esame colturale.**

Sono stati considerati 2010 soggetti, 529 dei quali (26,3%) sono stati trovati affetti da una infezione acuta delle vie urinarie. I valori di batteriuri indicati sono quelli desunti dalla conta-colonie eseguite su agar-CLED dopo incubazione per 24 ore a + 37°C in atmosfera libera.

Batteriuria UFC/mL	Considerazioni	Numero	%
<b>Pazienti in cui non è stata diagnosticata una infezione delle vie urinarie</b>			
< 10.000	Negativi	1.014	50,5
10-100.000	Batteriuria non significativa	432	21,5
> 100.000	Batteriuria mista = Contaminazione	35	1,7
<b>Pazienti in cui è stata posta diagnosi di infezione delle vie urinarie</b>			
< 100.000	Batteriuria considerata significativa in base a considerazioni di tipo clinico	56	2,8
> 100.000	Batteriuria significativa	473	23,5

Tra i pazienti non affetti da IVU la gran parte (97%) presentavano una batteriuria al di sotto del valore di significatività (100.000 UFC/mL), il rimanente 3% dei campioni presentavano una pesante contaminazione con crescita di una flora polimicrobica. Tra i pazienti affetti da IVU la grande maggioranza (89%) presentava una batteriuria superiore al valore soglia (100.000 UFC/mL) ma una percentuale non trascurabile (11%) presentava una batteriuria inferiore al valore soglia pur in presenza di una IVU.

rò non aveva risolto completamente il quadro sintomatologico, si trattava quindi di esami di riconferma in corso di terapia non adeguata. Nei rimanenti 22 casi (4,2%) pur in presenza di una batteriuria inferiore alle 100.000 UFC/mL si è ritenuto di diagnosticare una IVU considerando il tipo di germe isolato, i risultati dell'esame delle urine, il tipo di paziente, la presenza di sintomatologia, l'associazione con anomalie anatomiche o patologie predisponenti, la presenza di cateteri etc. Tra i 1491 soggetti che sono stati giudicati non affetti da una IVU la batteriuria era inferiore alle 10.000 UFC/mL in 1014 (68%), in 432 (29%) la batteriuria era compresa tra 10.000 e 100.000 UFC/mL, in 35 casi era superiore a 100.000 UFC/mL. Questi pazienti sono stati giudicati non affetti da una IVU per l'assenza di sintomatologia clinica, in base alla non significatività dell'esame delle urine, per l'osservazione di una flora polimicrobica. I rapporti tra diagnosi di IVU e batteriuria sono ri-

portati nella Tabella 2. L'esame colturale con la successiva identificazione dei ceppi batterici isolati permetteva di evidenziare che, sui 529 pazienti affetti da IVU, in 344 casi (65%) erano in causa dei batteri Gram negativi con 221 ceppi di *Escherichia coli* come patogeno Gram negativo di più frequente isolamento; in 181 casi (34%) erano in causa dei batteri Gram positivi, con 127 ceppi di *Enterococco* come patogeno Gram positivo più frequente; in 8 casi (1%) si evidenziava un micete lieviforme del genere *Candida*.

La performance analitica del classico screening delle IVU utilizzando un dip-stick reattivo in grado di dimostrare la presenza nel campione urinario da esaminare della esterasi leucocitaria e dei nitriti è risultata, nella nostra esperienza piuttosto deludente. I falsi negativi sono stati 171 (8,5%) ed i falsi positivi sono stati 184 (9,2%). Pertanto per questo test la SE risultava 0,64, la SP 0,88, il VPP 0,63, il

VPN 0,89 e la IBC 0,82. La performance analitica del classico screening colturale delle IVU utilizzando una strumentazione completamente automatica in grado di svelare per mezzo di letture turbidimetriche la crescita batterica dopo inoculazione in TSB presenta comunque dei problemi infatti i falsi negativi sono stati 35 (1,7%) ed i falsi positivi sono stati 56 (2,8%). Pertanto per questo test la SE risultava 0,89, la SP 0,98, il VPP 0,93, il VPN 0,96 e la IBC 0,95. La valutazione quantitativa della sola batteriuria eseguita utilizzando lo UF-100 denunciava 69 falsi negativi (3,4%) e 42 falsi positivi (2,1%), per questo test la SE risultava 0,87, la SP 0,97, il VPP 0,92, il VPN 0,95 e la IBC 0,94. La valutazione quantitativa della sola leucocituria eseguita utilizzando lo UF-100 denunciava 54 falsi negativi (2,7%) e 96 falsi positivi (4,8%), per questo test la SE risultava 0,90, la SP 0,94, il VPP 0,83, il VPN 0,96 e la IBC 0,93. Usando in associazione, contemporaneamente, la valutazione quantitativa di batteriuria e leucocituria fornite dallo UF-100 i falsi negativi scendevano a 29 (1,4%) mentre i falsi positivi salivano a 102 (5,1). Per la combinazione dei due test, eseguiti contemporaneamente, la SE risultava 0,94, la SP 0,93, il VPP 0,83, il VPN 0,98 e la IBC 0,93. Questi dati sono descritti nella tabella 3.

## Discussione

Nella quotidiana pratica del Laboratorio un gran numero di campioni urinari vengono quotidianamente sottoposti all'esame microbiologico. Solo una piccola percentuale di questi vedranno confermata la presenza di una IVU, infatti nella nostra esperienza almeno il 75% di tutte le urocolture darà un risultato negativo. In questa maniera una cospicua quantità di risorse viene impiegata per effettuare un protocollo diagnostico che sarà risultato inutile in circa 3 casi su 4. Per questo motivo, allo scopo di ottimizzare l'impiego delle risorse, sono stati proposti numerosi test di screening per la diagnosi rapida delle infezioni urinarie nell'idea di poter eliminare un test sensibile, velocemente eseguibile, poco costoso quel 75% di campioni negativi per concentrare mezzi ed attenzione sul restante 25% di campioni significativi. Tra i metodi non colturali il primo screening proposto si basava sull'esame microscopico diretto (HPF) delle urine non centrifugate, il test veniva considerato positivo se si osservava almeno un leucocita e/o un batterio per campo. Questo test era accreditato di una SE di 0.8 e di una SP di 0.6. Si tratta di un test poco costoso ma che richiede tempo ed un osservatore esperto, inoltre i risultati sono insoddisfacenti soprattutto perché il valore soglia diagnostico è prati-

**Tabella 3. Performance analitica, nei confronti della diagnosi definitiva, dei diversi test adottati valutati nello screening delle IVU.** La valutazione della performance analitica è stata effettuata tenendo conto della prevalenza delle IVU nella popolazione esaminata.

SE	SP	VPP	VPN	IBC
<b>Esterasi + Nitriti</b>				
0,64	0,88	0,63	0,89	0,82
<b>Uro-Quick</b>				
0,89	0,98	0,93	0,96	0,95
<b>UF-100 Batteriuria</b>				
0,87	0,97	0,92	0,95	0,94
<b>UF-100 Leucocituria</b>				
0,90	0,94	0,83	0,96	0,93
<b>UF-100 Batteriuria + Leucocituria</b>				
0,94	0,93	0,83	0,98	0,93

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

La Sensibilità di un test diagnostico esprime la sua capacità di evidenziare, nella popolazione in esame, il maggior numero possibile di soggetti affetti da una determinata patologia ed è sostanzialmente funzione dei falsi negativi. La Specificità di un test diagnostico esprime la sua capacità di diagnosticare correttamente, nella popolazione esaminata, una determinata patologia ed è sostanzialmente funzione dei falsi positivi. Il Valore Predittivo Positivo di un test diagnostico esprime la probabilità percentuale che un determinato soggetto, con positività al test in esame, sia effettivamente affetto da una determinata patologia. Il Valore Predittivo Negativo di un test diagnostico esprime la probabilità percentuale che un determinato soggetto, con negatività al test in esame, sia effettivamente esente da una determinata patologia. La Incidenza totale di Ben Classificati esprime semplicemente la percentuale di concordanza tra la classificazione dei soggetti effettuata in base ai risultati del test e la classificazione corretta.

camente sovrapponibile alla sensibilità analitica del metodo. Pertanto lo screening delle IVU mediante osservazione microscopica delle urine non centrifugate non ha trovato, almeno in Italia e non ostante alcuni sostenitori, una grande diffusione (33-36). Il test non colturale più largamente diffuso per la diagnostica rapida delle IVU è senza alcun dubbio quello basato sull'impiego di strisce reattive in grado di rilevare la presenza di esterasi leucocitaria e di nitriti prodotti dal metabolismo batterico a partire dai nitrati. Questo test è accreditato di una buona performance analitica ( $SE = 0,70$  e  $SP = 0,85$ ) nelle IVU conclamate con batteriuria superiore alle 100.000 UFC/mL e con importante leucocituria (almeno 20 WBC/ $\mu$ L) (37, 38). L'unico test colturale per lo screening delle IVU che ha avuto una certa diffusione è basato sulla rilevazione fotometrica della torbidità indotta dalla crescita batterica dopo inoculazione in TSB. Questo test è sensibile e specifico ( $SE = 0,90$ ,  $SP = 0,98$ ) ma è piuttosto costoso e richiede alcune ore per fornire un risultato, cosa che può creare dei problemi nel trattamento delle urine risultate positive allo screening e che andranno seminate su piastra almeno 4 ore dopo l'arrivo in Laboratorio (39).

In questo studio i tre test per la diagnosi rapida delle IVU sono stati paragonati non ad un ulteriore test di laboratorio, sia pure il classico esame colturale, considerato come standard, ma contro il vero standard di riferimento e cioè la decisione clinica finale: la diagnosi di infezione delle vie urinarie scaturente dall'integrazione dei dati anamnestici ed anagrafici relativi al paziente, dalla sintomatologia clinica, dalla semeiotica di laboratorio. La performance analitica del classico test basato sulla rilevazione dei nitriti e delle esterasi leucocitarie è risultata poco soddisfacente infatti i falsi negativi erano 171 (8,5%) ed i falsi positivi 184 (9,1). Nella nostra esperienza quindi questo test presentava una  $SE$  di 0,64, una  $SP$  di 0,88, un  $VPP$  di 0,63, un  $VPN$  di 0,89 ed una  $IBC$  di 0,82, questi dati sembrano correlare con quanto riportato in letteratura (11-13,37,38,40). La valutazione della performance analitica dello screening colturale dopo semina in TSB presentava 56 (2,7%) falsi negativi e 35 (1,7%) falsi positivi, questo test nella nostra esperienza presentava una  $SE$  di 0,89, una  $SP$  di 0,98, un  $VPP$  di 0,93, un  $VPN$  di 0,96 ed una  $IBC$  di 0,95. In effetti è logico che la semplice valutazione della carica batterica, comunque ottenuta, non correli perfettamente con la diagnosi di IVU. Infatti il valore soglia a 100.000 UFC/mL proposto da Kass (2,3) ha validità solo per urine raccolte con il metodo del mitto intermedio in un contenitore sterile e privo di conservanti; critico appare peraltro il tempo intercorrente tra la raccolta del materiale e la valutazione microbiologica poiché a temperatura ambiente la carica batterica raddoppia ogni 30-60 minuti (41-

43). Una volta osservate tutte queste precauzioni in letteratura sono riportati valori di  $SE$  pari a 0,85 e di  $SP$  pari a 0,97 (39,44-47) che appaiono assolutamente sovrapponibili a quanto ritrovato in questo studio. La quantificazione della batteriuria e della leucocituria effettuate con lo strumento UF-100 ha denunciato 29 falsi negativi (1,4%) e 102 (5,1%) falsi positivi, questo screening combinato ha dimostrato una  $SE$  di 0,94, una  $SP$  di 0,93, un  $VPP$  di 0,83, una  $VPN$  di 0,98 ed una  $IBC$  di 0,93. I risultati ottenuti in questo studio suggerirebbero quindi che la performance analitica ottenuta dalla combinazione della valutazione quantitativa della batteriuria e della leucocituria ottenute mediante lo UF-100 correlino, con la diagnosi clinica di IVU, non solo meglio dello screening basato sull'uso dei dip-stick ma anche meglio della valutazione della crescita batterica in TSB. Dai dati presentati si evince che un soggetto non presentante batteriuria o leucocituria significative all'analisi con UF-100 presenta il 98% di probabilità di essere effettivamente esente da una patologia infettiva acuta a carico delle vie urinarie. Questa osservazione se confermata da altri autori in diverse casistiche potrebbe essere di notevole interesse pratico poiché si potrebbe anche prendere in considerazione di non sottoporre ad esame microbiologico completo i campioni di urine risultati negativi allo screening, concentrando attenzione e risorse ai campioni risultati positivi o presentati problematiche particolari (48-51). Nella valutazione di un test di screening delle IVU il primo requisito da prendere in considerazione è la Sensibilità analitica poiché un campione risultato falsamente negativo potrebbe non essere ulteriormente esaminato e dare origine ad un errore diagnostico, meno critica appare invece la Specificità analitica poiché comunque tutti i campioni risultati positivi, sia i veri che i falsi positivi, verranno sottoposti all'esame colturale permettendo una diagnosi corretta, al massimo un test dotato di bassa specificità provocherà l'esecuzione di un certo numero di uroculture inutili ma non genererà alcun errore diagnostico. Vale inoltre la pena di ricordare che il risultato dello screening con UF-100 potrebbe essere disponibile addirittura pochi minuti dopo l'arrivo del campione in laboratorio pertanto in caso di un risultato che il Medico curante giudichi incongruo con la sintomatologia sarebbe estremamente semplice la raccolta di un nuovo campione di urine, prima dell'inizio di qualsiasi terapia. Tale campione andrà inviato al Laboratorio previo contatto segnalando le problematiche inerenti al paziente in maniera tale da permettere oltre ad una accurata valutazione microbiologica di base l'allestimento di procedure tendenti all'evidenziazione di patogeni inusuali ed esigenti. Inoltre lo strumento UF-100 è in grado di fornire all'utilizzatore molte altre informazioni

circa la composizione della frazione corpuscolata delle urine (52,53). Ad esempio nelle infezioni urinarie non è infrequente un danno della mucosa con presenza di emazie nelle urine. In questo caso la determinazione della sede della ematuria, che lo UF-100 esegue studiando la morfologia eritrocitaria, può risultare di una certa utilità pratica (54-58). Nelle IVU non complicate la batteriuria cala drammaticamente entro 48 ore dall'inizio di una terapia antibatterica efficace, la clearance della batteriuria si accompagna di norma alla remissione della sintomatologia. La persistenza della sintomatologia indica il perdurare dell'infezione con necessità di effettuare delle ulteriori ricerche al fine di identificare un patogeno misconosciuto in prima battuta (ad esempio un micete od un germe particolarmente resistente). Tuttavia l'esecuzione dei classici test colturali, sotto antibiotico terapia, si presenta di difficile esecuzione per l'ovvia presenza di sostanze ad azione antibatterica nelle urine e per la dicotomia, sempre da considerare, che esiste tra l'interazione tra farmaco e batterio in vitro ed in vivo. In queste condizioni critiche lo UF-100 oltre ad una affidabile quantificazione di batteriuria e piuria, ci fornisce degli interessanti dati aggiuntivi circa la morfologia dei leucociti urinari. Infatti nelle fasi iniziali della infezione i leucociti urinari sono giovani e si raggruppano nella regione ad elevato FLS mentre dopo le 24 ore la positività alla FLS tende progressivamente a diminuire (59-61). In tal modo lo UF-100 è in grado di fornirci un dato circa la morfologia dei leucociti urinari che potrebbe rivestire un certo interesse almeno in casi selezionati (62).

## Conclusioni

I risultati riportati nel presente lavoro pur necessitando di conferma soprattutto in casistiche consideranti tipologie di pazienti non esaminati in questo studio come ad esempio soggetti in età pediatrica o con infezioni croniche ci sembrano assai interessanti e speriamo inducano una discussione nel campo della diagnostica rapida delle infezioni delle vie urinarie (63,64). In breve comunque nella nostra esperienza, maturata nel campo delle IVU acute in pazienti adulti, lo screening basato sulla valutazione quantitativa della batteriuria e della leucocituria utilizzando un citometro di seconda generazione dedicato allo studio della porzione corpuscolata delle urine quale lo UF-100, permette di ottenere dei risultati che sono comparabili a quelli forniti dalla valutazione della crescita batterica in TSB ed indubbiamente assai superiori di quelli forniti dallo screening con dip-stick. Il vantaggio dello screening condotto con UF-100 è duplice: da un lato il risultato è

disponibile in pochi minuti, dall'altro non ci troviamo in presenza di un nuovo test da introdurre nella pratica quotidiana in aggiunta a tutti gli altri che dovranno comunque essere eseguiti. Infatti lo UF-100 esegue la valutazione quantitativa di batteriuria e leucocituria nell'ambito dello studio della frazione corpuscolata delle urine che è un esame teso a sostituire e migliorare l'esame microscopico del sedimento urinario.

## Bibliografia

1. Andreoni S. Experience of a new work flows in the diagnostics of the infections of the urinary tract (UTI). XXV National Congress Italian Association of Clinical Microbiology. Pesaro 8-11 October 1996.
2. Asscler A. The clinical significance of asymptomatic bacteriuria in non pregnant women. *J Infect Dis* 17, 120-4, 1969.
3. Balows A, Hausler K, Isemberg H, Shadomy H. Manual of clinical microbiology 5<sup>th</sup> edition. American Society of Clinical Microbiology Washington DC 1991.
4. Bartolucci M, Filippetti A, Scatista G. Application of the automated system for the research of residual antimicrobial activity in urines. 25<sup>o</sup> National Congress of the Italian Association of Clinical Microbiology. Pesaro October 8-11 1996.
5. Ben-Ezra J, Bork L, McPherson R. Evaluation of Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer. *Clin Chem* 44, 92-5, 1998.
6. Berger S, Bogowsky B, Block C. Rapid screening of urine from bacteria and cells using a catalase reagent. *J Clin Microbiol* 26, 1066-77, 1990.
7. Bradbury S. Collection of urine specimens in general practice – to clear or not to clear? *J R Coll Gen Pract* 38, 363-5, 1988.
8. Burlina A. Medicina di Laboratorio: Fondamenti di Diagnostica. Edizioni Medico Scientifiche. Torino 1992.
9. Christenson R, Tucker J, Allen E. Results of dipstick tests, visual inspection, microscopic examination of urine sediment and microbiological cultures of urine compared for simplifying urinalysis. *Clin Chem* 31, 338-450, 1985.
10. Clapp M, Grossman A. The quantitative evaluation of bacteriuria and pyuria. *Am J Med Sci* 160, 58-61, 1966.
11. Colombrita D, Ravizzola G, Pirali F et al. Evaluation of BACTEC system for urine culture screening. *J Clin Microbiol* 27, 118-9, 1989.
12. Drow D, Baum C, Hirschfield G. Comparison of the Lumac and Moonlight systems for detection of bacteriuria by bioluminescence. *J Clin Microbiol* 20, 797-801, 1984.
13. Fenili D, Pirovano B. The automation of sediment urinalysis using a new urine flow cytometer (UF-100). *Clin Chem Lab Med* 36, 909-17, 1998.

14. Gavan T, Town M. A microdilution method for antibiotic susceptibility testing. *Amer J Clin Pathol* 53, 880-5, 1970.
15. Gillenwater J, Harrison R, Kunin C. Natural history of bacteriuria in schoolgirls. *N Engl J Med* 301, 396-9, 1979.
16. Hawkins T, Ross M, McLennan J, Gyory A. Urine microscopy; its clinical value. *Sysmmex J Int* 6, 41-5, 1996.
17. Hyodo T, Kumano K, Haga M et alii. Evaluation of the source and count of urinary erythrocytes in healthy individuals using an automated flow cytometer. *Nephron* 73, 349, 1996.
18. Hyodo T, Kumano K, Haga M et alii. The validity of the criteria to differentiate the origin of hematuria in the automated flow cytometer. *Nephron* 75, 112, 1996.
19. Hyodo T, Kumano K, Haga M, Sakai T. Detection of glomerular and non glomerular red blood cells by automated urinary sediment analyzer. *Jpn J Nephrol* 37, 35-43, 1995.
20. Hyodo T, Kumano K, Haga M, Sakai T. A method for differentiation of glomerular and non glomerular hematuria by an automated flow cytometer. *Nephron* 73, 348, 1996.
21. IUC Product Development Division TOA Medical Electronics. Performance of the Sysmex UF-100 fully automated urine cell analyzer. *Sysmex Journal International* 6, 36-40, 1996.
22. Jones C, Mc Pherson D, Stevens D. Inability of the Chemstrip LN compared with quantitative urine culture to predict significant bacteriuria. *J Clin Microbiol* 23, 160-2, 1986.
23. Kass E. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans Assoc Am Phys* 69, 59-63, 1956.
24. Kass E. Pyelonephritis and bacteriuria. *Ann Intern Med* 56, 46-53, 1961.
25. Keijzer M, Brandts R. Flow cytometry and the urine laboratory: field evaluation of the Sysmex UF-100. *Sysmex J Int* 7, 117-22, 1997.
26. Koenig C, Tick L, Hanna B. Analyses of the dflash track DNA probe and UTIscreen bioluminescence tests for bacteriuria. *J Clin Microbiol* 30, 342-5, 1992.
27. Koneman E, Allen D, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. *Color Atlas of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia Lippincott 1997.
28. Kouri T, Ahkonen U, Malmiemi K et alii. Evaluation of Sysmex UF-100 urine flow cytometer vs chamber counting of supravitality stained specimens and conventiona bacterial cultures. *Am J Clin Pathol* 112, 25-35, 1999.
29. Kunin C. Detection prevention and management of urinary tract infection. 4<sup>th</sup> Edition Lea & Febinger Philadelphia 1987.
30. Kunin C. Epidemiology of bacteriuria and its relation to pyelonephritis. *J Infect Dis* 1, 120-5, 1969.
31. Kutter D. Routine urinalysis yesterday, today, tomorrow. *Sysmex J Int* 6, 1-3, 1996.
32. Langlois M, Delalanghe J, Steyaert S et alii. Automated flow cytometry compared with an automated dipstick reader for urinalysis. *Clin Chem* 45, 118-22, 1999.
33. Lun A, Ziebig R, Priem F, Filler G, Sinha P. Routine workflow for use of urine strips and urine flow cytometer UF-100 in the Hospital Laboratory. *Clin Chem* 45, 1305-7, 1999.
34. Lung A, Ziebig R, Hammer H et alii. Reference values for neonates and children for the UF-100 urine flow cytometer. *Clin Chem* 45, 1879-80, 1999.
35. Luraschi P, Brambilla S, Morelli A, Franzini C. Preliminary evaluation data of a cytometry based instrument for particle measurements in urine. *Clin Chem Lab Med* 37 suppl., S392, 1999.
36. Manoni F, Valverde S, Antico F, Salvadego M, Gessoni G. Screening sella batteriuria con un citofluorimetro dedicato all'analisi della frazione corpuscolata delle urine. *Medicina di Laboratorio* 7/3, 245-52, 1999.
37. 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* 14, 1-5, 1992.
38. Murakana K. Clinical uses of UF-100 for the diagnosis of urinary tract infection. *Sysmex Journal International* 6, 46-50, 1996.
39. Murray P, Smith F, Mc Kinney R et alii. Clinical evaluation of three urine screening tests. *J Clin Microbiol* 25, 467-70, 1987.
40. Nakamoto H. Automated urinalysis. *Sysmex Journal International* 6, 168-72, 1996.
41. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Urinalysis and collection, transportation and preservation of urine specimens: approved guidelines. NCCLS Document GP16-A. Villanova PA: NCCLS, 51-69, 1995.
42. Needham C. Rapid detection methods in microbiology. *Med Clin North Am* 71, 591-605, 1987.
43. Petzlo M, Wetkowski M, Peterson E et alii. Detection of bacteriuria and pyuria within two minutes. *J Clin Microbiol* 21, 578-81, 1985.
44. Pezlo M. Detection of urinary tract infection by rapid methods. *Clin Microbiol Rev* 1, 268-80, 1988.
45. Pfaller M, Baum C, Niles A et alii. Clinical laboratory evaluation of an urine screen device. *J Clin Microbiol* 18, 674-9, 1983.
46. Pfaller M, Koontz P. Laboratory evaluation of leukocyte esterase and nitrite test for detection of bacteriuria. *J Clin Microbiol* 21, 840-2, 1985.
47. Sanford J. Urinary tract infections. *Ann Rev Med* 26, 485-9, 1975.
48. Sanford J. Urinary tract symptomts and infections. *Ann Rev Med* 26, 485-8, 1975.
49. Sawyer K, Stone L. Evaluation of a leukocyte dipstick test used for screening urine cultures. *J Clin Microbiol* 20, 45-61, 1984.
50. Siegman I, Kulka T, Schwartz D, Konforti N. Polymicrobial and monomicrobial urinary tract infection. *J Hosp Infect* 28, 49-56, 1994.
51. Smalley D, Dittmann A. Use of leukocyte esterase-ni-

- trate activity as predictive assays of significant bacteriuria. *J Clin Microbiol* 18, 1256-7, 1984.
52. Stamm W, Wagner K, Amsel R et alii. Causes of the acute urethral syndrome in women. *N Engl J Med* 303, 409-15, 1981.
  53. Stamm W. Guidelines for prevention of catheter-associated urinary tract infections. *Ann Intern Med* 82, 386-91, 1975.
  54. Stamm W. Measurement of pyuria and its relations to bacteriuria. *Am J Med* 75, 53-8, 1983.
  55. Sweets J. Measurement of the accuracy of diagnostic systems. *Science* 259, 2574-9, 1988.
  56. Toni M, Menozzi M, Allevato F, Schito G. Metodo semplificato di analisi batteriologica delle urine. *Ann Sclavo* 15/6, 1177-87, 1977.
  57. Trbos M, Tommasini L, Agape V et alii. The automation of urine analysis. *Clin Chem Lab Med* 37, suppl., S411, 1999.
  58. Turck M. Urinary tract infections. *Hosp Pract* 15, 49-56, 1980.
  59. Valenti W, Reese R. Genitourinary tract infection. In *A Practical approach to infectious diseases*. Reese R Douglas G Editors. Little Brown & Co. Boston, 327-58, 1986.
  60. Vecchio T. Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. *New Engl J Med* 274, 1171-3, 1966.
  61. Wallach J. Interpretation of diagnostic tests. 6<sup>th</sup> Edition. Little, Brown & Company New York 1996.
  62. Washington J. Evaluation of new in vitro diagnostic test in clinical microbiology. *Infect Contrl Hosp Epidemiol* 10, 77-9, 1989.
  63. Washinton J, White C, Laganbiere et alii. Detection of significant bacteriuria by microscopic examination of urine. *Lab Med* 12, 59-68, 1981.
  64. Wenk R, Dutta D, Rudert J et al. Sediment microscopy, nitrituria and leukocyte esteraseuria as predictors of significant bacteriuria. *J Clin Lab Automation* 2, 117-21, 1982.
  65. Yasui Y, Tatsumi N, Park K, Koezuka T. Urinary sediment analyzed by flow cytometry. *Cytometry* 22, 75-9, 1995.