

# VALUTAZIONE DEL SISTEMA MICROSCOPICO AUTOMATIZZATO SEDIMAX APPLICATO ALLO SCREENING MICROBIOLOGICO DI MATERIALI DIVERSI DA URINA



Provincia Autonoma di Trento  
Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari



M. Calzà<sup>2</sup>, R. Predazzo<sup>1</sup>, M. Gaino<sup>1</sup>, P. Ober<sup>1</sup>, M. Fedrizzi<sup>1</sup>, A. Gardumi<sup>1</sup>, L. Meneghelli<sup>1</sup>, D. Girelli<sup>3</sup>, A. Visentini<sup>3</sup>, S. Berti<sup>3</sup>, P. Lanzafame<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>U.O. Microbiologia e Virologia, APSS, Ospedale S. Chiara, Largo Medaglie d'Oro 9, 38123 Trento  
<sup>2</sup>Università degli Studi di Trento, Facoltà di Scienze e Tecnologie Biomolecolari- Povo (TN)  
<sup>3</sup>A. Menarini Diagnostics- Italia

## INTRODUZIONE

L'identificazione di microrganismi e la differenziazione dei tipi cellulari riscontrati in liquidi che sono solitamente sterili è indispensabile per la localizzazione della sede d'infezione e rappresenta uno dei principali fattori influenzanti il trattamento dell'infezione e l'outcome del paziente. L'esame microscopico dopo colorazione Gram rappresenta il Gold Standard per la conta, la differenziazione dei tipi cellulari presenti nei liquidi biologici e la classificazione morfotipica dei probabili patogeni coinvolti. In alternativa i sistemi automatizzati normalmente utilizzati nei laboratori per la differenziazione di leucociti, globuli rossi e piastrine nel sangue presentano un limitato uso per gli altri liquidi biologici in quanto non in grado di rilevare tipi cellulari differenti.

Le infezioni polmonari rappresentano una delle più comuni cause di morbidità e mortalità che necessitano di diagnosi tempestiva e trattamento antibiotico mirato. L'accurata identificazione dei patogeni respiratori è associata ad un basso tasso di mortalità. Per la diagnosi di infezioni delle basse vie respiratorie l'espettorato rappresenta il campione maggiormente utilizzato in quanto ottenuto più facilmente ed in maniera non invasiva. Metodi invasivi includono broncolavaggio o broncoaspirato e tracheoaspirato che permettono la raccolta delle secrezioni polmonari distali e aumentano la possibilità di identificare l'agente causale. La colorazione di Gram su campioni provenienti dalle basse vie respiratorie permette di verificare la qualità preanalitica del campione, rilevare la presenza di leucociti e definire in via presuntiva i probabili patogeni coinvolti.

Scopo del presente studio è stato quello di valutare nella diagnosi di infezioni delle basse vie respiratorie e infezioni coinvolgenti distretti normalmente sterili l'utilizzo dello strumento di screening SediMAX (A. Menarini Diagnostics, Firenze) in comparazione con l'osservazione microscopica e l'esame colturale.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo dicembre 2012 - gennaio 2013 sono stati analizzati con lo strumento SediMAX 93 campioni provenienti dalle basse vie respiratorie e liquidi biologici suddivisi come riportato in Tab. 1, sottoponendoli contemporaneamente ad esame colturale e a valutazione microscopica semiquantitativa dei leucociti dopo colorazione di Gram.

La suddivisione dei vari campioni in base al reparto di provenienza viene riportata nelle Tab.2 e Tab.3. Lo strumento SediMAX permette l'identificazione delle varie particelle costituenti i campioni biologici come leucociti, batteri, cellule lieviformi, cellule dell'apparato respiratorio mediante l'acquisizione d'immagini direttamente dal campione. Le immagini di ciascun campione vengono archiviate e sono consultabili anche successivamente. (Fig.1)

La valutazione quantitativa della carica batterica per i materiali provenienti dalle basse vie respiratorie è stata eseguita mediante semina dei campioni su terreno TSA + 5% sangue montone usando un'ansa calibrata da 1 ml e incubata a 37°C per 24 ore, dopo diluizione fluidificazione degli stessi con Oxoid Sputasol. Nel caso degli altri liquidi biologici è stata eseguita la semina su TSA + 5% sangue montone per germi aerobi e un'Agar Schaedler per germi anaerobi usando un'ansa da 10 µl dopo centrifugazione a 3000 rpm per 15 minuti e incubati a 37°C per 48 ore. I campioni sono stati sottoposti all'analisi mediante lo strumento SediMAX dopo diluizioni seriali con Sputasol e soluzione fisiologica nel caso di campioni provenienti dalle basse vie respiratorie e soluzione fisiologica per gli altri materiali biologici come riportato in Tab.4.

Tipo di campione	n° campioni
tracheoaspirato	29
broncoaspirato	7
liquido cefalo rachidiano	4
liq. addominale	5
liq. pleurico	16
broncolavaggio alveolare	1
liq. cisti	2
liq. ascitico	3
liq. peritoneale	7
tubo drenaggio / drenaggio	4
vario	10
liq. articolare	4

Tab.1. Numero di campioni suddivisi per tipologia.

	reparto	n°
basse vie	Rianimazione	30
	Medicina	4
	Pronto Soccorso	1

Tab.2. Numero di campioni suddivisi per reparto.

liq. biologici	reparto	n°
LCR	Neurologia	2
	Pronto Soccorso	1
	Medicina	1
Drenaggio Addominale	Rianimazione	1
	Chirurgia	5
Liq. pleurico	Rianimazione	4
	Medicina/pneumologia	8
	Oncologia	1
	Chirurgia	3
Liq. peritoneale	Nefrologia	3
	Medicina	1
	Rianimazione	1
	Chirurgia	1
Materiale da drenaggio	Rianimazione	4
	Medicina	2
Liq. articolare	PS	2
	Chirurgia	2
Liq. da cisti	Chirurgia	3
Liq. pericardico	Unità coronarica	1
Materiali vari	Rianimazione	2
	Medicina	3
	Chirurgia	2
	Esterni	2
	Esterni	2

Tab.3. Numero di campioni suddivisi per reparto.

tipo campioni	diluizioni
basse vie	1:2 Sputasol
	1:10 soluzione fisiologica
liquidi biologici non LCR	1:5 sol. fisiologica
	1:10 sol. fisiologica
	1:100 sol. fisiologica
	1:200 sol. fisiologica

Tab.4. Diluizioni applicate.

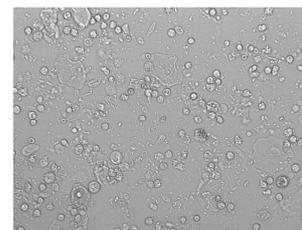


Fig.1. Immagine campione basse vie respiratorie.

Leucociti/µl	n°	positivi	negativi	% pos.
0-49	7	0	7	0,0
50-99	3	0	3	0,0
100-249	14	6	8	42,9
250-499	8	0	8	0,0
500-999	10	2	8	20,0
≥1000	51	34	17	66,7

Tab.5. Numero campioni positivi e negativi divisi in base a conta leucocitaria con SediMAX.

Leucociti/µl	sensibilità	specificità	VPP	VPN
<100	100,0%	19,6%	45,1%	100,0%
<250	85,7%	35,3%	52,2%	75,0%
<500	85,7%	58,1%	59,0%	81,3%
<1000	81,0%	66,7%	66,7%	81,0%

Tab.6. Valori di sensibilità, specificità, VPP e VPN dello strumento SediMAX.

	sensibilità	specificità	VPP	VPN
basse vie <100 leu/µl	100,0%	27,3%	76,5%	100,0%
L. Biologici <500 leu/µl	100,0%	56,0%	47,6%	100,0%

Tab.7. Valori di sensibilità, specificità, VPP e VPN dello strumento SediMAX con i cut-off specifici per tipologia di materiale.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

La valutazione dei dati è stata condotta suddividendo la conta leucocitaria valutata da SediMAX in 6 differenti range come da Tab.5. dove viene riportato il numero di campioni positivi e negativi all'esame colturale rientranti negli stessi. Da tale valutazione sono stati esclusi i dati riguardanti la conta batterica in quanto non correlava con le diluizioni applicate ai campioni.

Dall'osservazione dei dati si evince che la maggior parte dei campioni positivi corrispondono ad una conta leucocitaria ≥ 500 leucociti/µl e fra i 100 e 250 leucociti/µl. Inoltre tutti i campioni riportanti col SediMAX una conta leucocitaria inferiore a 100 leucociti/µl sono risultati negativi.

La comparazione fra conta leucocitaria ed esame microscopico dopo colorazione di Gram ha evidenziato una perfetta correlazione dello strumento SediMAX nei range 0-99 leucociti/µl e ≥ 1000 leucociti/µl.

L'osservazione delle corrispondenti immagini dei campioni rientranti nei rimanenti range, dove si riscontra una discordanza maggiore fra SediMAX ed esame microscopico, ha messo in evidenza la presenza di numerose emazie (acantociti), le quali possono in parte spiegare la sovrastima della conta leucocitaria. Inoltre i suddetti campioni erano prevalentemente liquidi articolari e pleurici.

La Tab.6 riporta i valori di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e valore predittivo negativo (VPN) del SediMAX rispetto all'esame colturale a differenti cut-off senza distinzione fra le varie tipologie di campione. Dalla tabella si evince che lo strumento SediMAX presenta un VPN e una sensibilità del 100% per un cut-off <100 leucociti/µl e un VPN del 81,3% e una sensibilità del 85,7% se il cut-off considerato è <500 leucociti/µl.

Poiché lo strumento non presenta falsi negativi per una conta leucocitaria <100 leucociti/µl nel caso di campioni provenienti dalle basse vie respiratorie e <500 leucociti/µl per i liquidi cavali, ciò ha portato alla formulazione di cut-off differenti per le due categorie di materiali considerati.

Con i nuovi cut-off riportati in Tab.7 la sensibilità e il VPN dello strumento risultano pari al 100% per entrambe le categorie di materiali.

In conclusione lo strumento SediMAX per l'esame microbiologico dei campioni provenienti dalle basse vie respiratorie e dei liquidi provenienti da siti sterili risulta molto promettente per la ridotta manutenzione ed i costi contenuti.

Mediante diagnostica per immagine SediMAX oltre a consentire la valutazione delle singole componenti cellulari permette di verificare l'idoneità del campione per una corretta fase preanalitica in particolare in caso d'infezioni delle basse vie respiratorie.

Inoltre, lo studio di un protocollo di diluizione potrà consentire il miglioramento delle performance in termini di specificità nell'identificazione delle singole componenti cellulari.

## BIBLIOGRAFIA

A Multicenter Evaluation of the Iris iQ200 Automated Urine Microscopy Analyzer Body Fluids Module and Comparison With Hemacytometer Cell Counts. Anthony Wudch et al. Am J Clin Pathol 2008; 129:445-450

Automated morphological analysis of cells in body fluids by digital microscopy system DM96. Jürgen A.riedl et al. J Clin Pathol 2010; 63: 538-543

