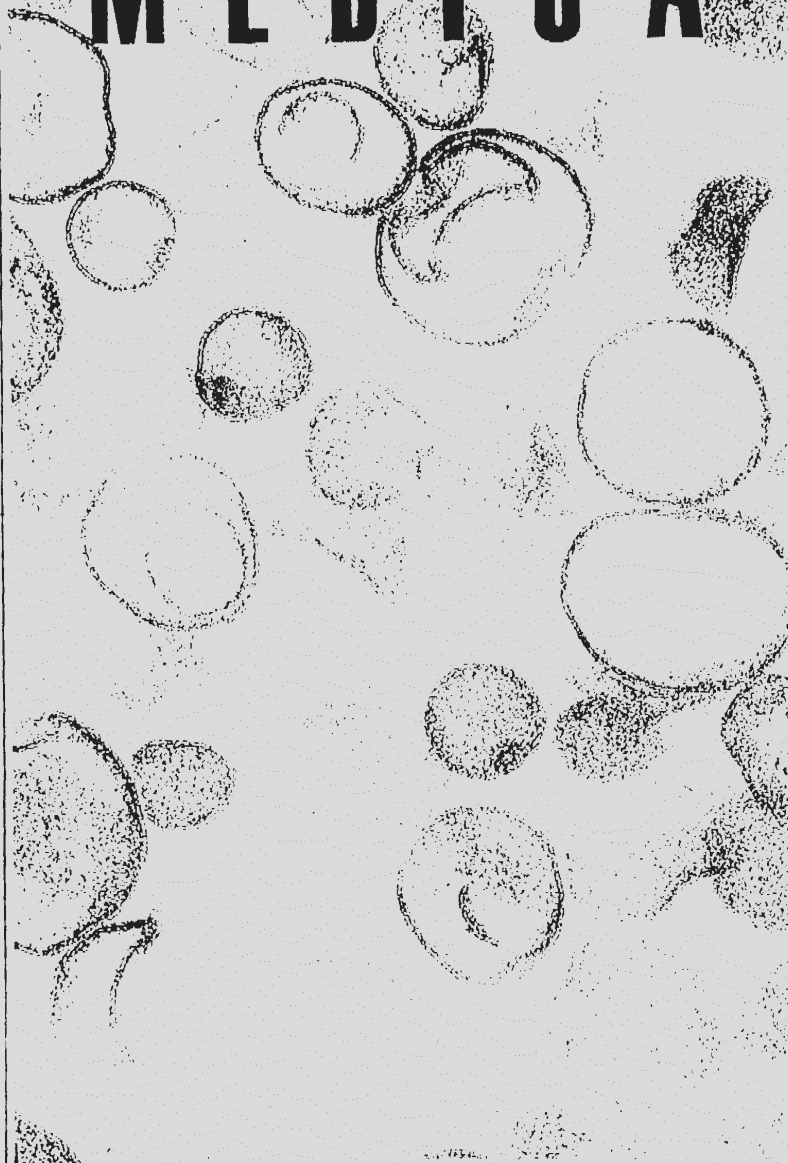


Numero 4
Volume 12
Anno 1997

MICROBIOLOGIA MEDICA

ISSN 1120-0146



Pubblicazione
Associazione
Microbiologi
Clinici Italiani

1997

Linear-count: un nuovo sistema integrato per la conta e l'isolamento microbico nelle urinoculture

MURGIA S., MANCA C.*, LAMPIS G.*, POMPEI R.*

*Società Microbiol S.n.c., Via Vittorio Emanuele II 40, 09028 SESTU (CA); *Sezione di Microbiologia Applicata, Istituto di Medicina Interna, Università di Cagliari, via Porcell 12, 09124 CAGLIARI*

RIASSUNTO

Nel presente lavoro è stato sperimentato e validato un nuovo sistema per la conta batterica nelle urine con un metodo di coltura lineare. Come sistemi di riferimento sono stati usati il metodo classico della conta batterica mediante inclusione di diluizioni di urine in agar e il metodo rapido "Urino-slide".

La sperimentazione è passata attraverso l'utilizzo di sospensioni batteriche e fungine, contenenti uno o più microrganismi in associazione, a concentrazione microbica variabile e nota, con ottimi risultati di riproducibilità e di precisione. Il sistema, in seguito, è stato

validato con campioni urinari di provenienza ospedaliera, sempre in confronto con il sistema classico ed col metodo rapido "Urino-slide". In questo caso il sistema si è dimostrato valido e confrontabile ai due metodi tradizionali e, per alcuni parametri, anche migliore. Il metodo ha portato allo sviluppo di un nuovo kit integrato per la conta e l'isolamento batterico nelle urinoculture, che è stato brevettato col nome di "Linear-count".

PAROLE CHIAVE:
URINOCULTURE, CONTA
BATTERICA, SISTEMI
RAPIDI

SUMMARY

LINEAR-COUNT: A NEW SYSTEM FOR MICROBIAL COUNT AND ISOLATION IN URINOCULTURES

A new rapid system for microbial count and isolation in urinocultures is proposed. It is based on a linear culture of urine samples which permits the recognition of significant and non-significant specimens on the basis of the culture-strip length. This method was compared with other rapid methods, including "Urino-slide", and proved to be more reliable and precise.

Based on this system, an integrated kit for microbial count and isolation, named "Linear-count", was designed and patented. The new kit has

shown itself to be rapid, simple and economical.

KEY WORDS:
BACTERIAL COUNT,
URINOCULTURE, RAPID
SYSTEMS

INTRODUZIONE

La determinazione del grado di batteriuria è di fondamentale importanza ai fini di una razionale valutazione clinica, in caso di sospetta infezione delle vie urinarie, e del proseguimento dell'indagine microbiologica. Infatti, concentrazioni microbiche non significative ($< 10^5$ UFC/ml) non richiedono in genere il proseguimento dell'analisi ed il trattamento terapeutico del paziente (9, 10, 15).

Le urinoculture rappresentano spesso più della metà del carico di lavoro del laboratorio di microbiologia e le urinoculture negative rappresentano il 70-80% del totale di campioni di urina analizzati (9). E' dunque auspicabile l'utilizzo di metodi rapidi e sensibili che portino all'individuazione delle urinoculture negative, con evidenti benefici sia a livello dei costi di analisi, che dei tempi di refertazione.

Sono stati descritti molti tipi di sistemi di urinocultura, alcuni dei quali sono più rapidi sia nell'esecuzione che nella risposta del metodo standard di coltura per inclusione in agar-germi. Tra questi metodi vi sono l'esame diretto previa colorazione di Gram (8, 11), la conta quantitativa leucocitaria (12), l'analisi diretta del sedimento urinario (7), la valutazione della crescita dei microrganismi su un supporto agarizzato bagnato nel campione

(Urino-slide), l'impedenza elettrica (5), vari metodi biochimici (8, 4, 16, 17) e metodi basati sulla lettura turbidimetrica del campione (6, 13).

Ognuno di questi metodi presenta vantaggi e svantaggi, ma nessuno di essi può essere considerato il più valido in assoluto. Tra i problemi che si possono segnalare vi sono la lettura soggettiva nella colorazione di Gram e nel sistema "Urino-slide", la poca sensibilità, in alcuni casi, dei metodi biochimici, i problemi di lettura nel sistema nefelometrico dati dalla presenza di cristalli o precipitati.

L'idea di sperimentare un nuovo sistema per la conta microbica nelle urine è nata dalle considerazioni su alcune esigenze non ancora pienamente soddisfatte dai sistemi rapidi oggi in uso, quali, in particolare, l'affidabilità, soprattutto in merito all'assenza di falsi negativi, la precisione nel determinare la carica batterica presente, l'economicità e la praticità del sistema di conta e isolamento.

In questo lavoro viene descritto un nuovo sistema integrato, semplice e rapido, che permette contemporaneamente la conta microbica nelle urine e l'isolamento delle colonie per ulteriori analisi, in confronto con altri metodi quali il sistema "Urino-slide" e il sistema nefelometrico semiautomatizzato. Come metodo di riferimento, per mettere a punto il sistema, si è utilizzato il sistema convenzionale

di diluizione e di semina per inclusione in agar, considerata, a tutt'oggi, il più preciso.

MATERIALI E METODI

Campioni di urine

Sono state analizzate 396 urine di origine ospedaliera. I campioni di urina non analizzati subito sono stati conservati a 4-5°C per non più di 5 ore.

Microrganismi

Sono stati usati, per la validazione del sistema, i seguenti ceppi batterici e fungini: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 27959, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, Streptococco β -emolitico di gruppo A e *Pseudomonas aeruginosa* erano ceppi della collezione del nostro Istituto.

Terreni di coltura

Per la coltura e differenziazione dei microrganismi sono stati utilizzati i seguenti terreni e kit: CLED, McConkey agar, Plate-count agar (PCA), Brain heart infusion, Tryptose broth, Sabouraud dextrose Agar, Mannitol Salt Agar, kit "Urino-slide" a 3 terreni, kit "color Gram", tutti forniti dalla ditta Microbiol (Sestu, CA).

Sistema di coltura e conta lineare

Il sistema di conta batterica sperimentato e descritto in questo lavoro consiste nella semina lineare di un'ansata di sospensione batterica o campione di urine su un terreno agarizzato e nel ricavare il titolo batterico dalla misura in centimetri della striscia di batteri cresciuti, a partire dall'inizio della semina fino al fronte di crescita a confluenza.

Prima di individuare la procedura migliore sono state utilizzate per la semina anse di vario tipo e calibro; per esempio le anse di metallo sono state modificate nella forma dell'occhiello oppure nel calibro.

Anche i metodi di semina lineare utilizzati sono stati diversi: semina dopo aver depositato il liquido all'inizio ed aver flambato l'ansa di metallo, semina a zigzag, diverse semine parallele, semina a L o a U. Tutti questi tentativi hanno portato a riconoscere la semina lineare semplice, dopo deposizione del liquido all'inizio con un'ansa di plastica da 10 mL, come il metodo più pratico valido. Come sistemi di riferimento sono stati usati la conta batterica di sospensioni diluite incluse in agar, il metodo "Urino-slide" e il metodo nefelometrico.

Per la messa a punto del sistema di coltura lineare sono stati seminati batteri e miceti in terreno liquido (Tryptose broth per i batteri e Sabouraud per i miceti) e incubati per 24 ore a 37°C; da queste colture sono state fatte diverse diluizioni in serie con soluzione fisiologica in rapporto 1:10 e seminate sia con il sistema tradizionale per inclusione in terreno plate-count agar, sia con la tecnica di coltura lineare su terreno CLED in appositi contenitori di varie dimensioni.

Dopo 24 ore di incubazione a 37°C sono state contate le colonie cresciute nel PCA ed è stata misurata la lunghezza della semina di batteri cresciuti su CLED. Una pri-

ma serie di prove è stata eseguita con singole specie in coltura pura, rappresentative dei patogeni più spesso isolati da infezioni urinarie, in seguito sono state valutate associazioni di due microrganismi.

Calcolo dei valori predittivi

La sensibilità, specificità e il valore predittivo di un risultato positivo o negativo sono stati calcolati come segue; sensibilità, $VP/(VP + FN)$; specificità, $VN/(VN + FP)$; valore predittivo di un risultato positivo, $VP/(VP + FP)$; e valore predittivo di un negativo, $VN/(VN + FN)$. VP rappresenta il numero di campioni veri positivi, VN il numero di veri negativi, FP i falsi positivi, FN i falsi negativi (2,3,14).

RISULTATI

Sperimentazione della coltura lineare con ceppi di collezione

I risultati ottenuti sulla valutazione della carica batterica di sospensioni a concentrazioni note, mediante la coltura lineare, sono illustrati nella figura I.

È possibile osservare come sospensioni microbiche con $\geq 10^5$ UFC/ml hanno determinato misure di colture lineari che rientravano in uno spazio compreso fra 4,5 e 8,5 cm. Al disotto di questa misura le sospensioni erano da ritenere negative, al disopra altamente positive ($\geq 10^6$). Fa eccezione lo Streptococco β -emolitico, che mostrava, in rari casi, valori di coltura lineare superiori a 8,5 cm per sospensioni di 10^5 UFC/ml. Invece nel caso di colture miste di microrganismi, i valori di crescita lineare rientravano generalmente nelle misure indicate, confermando la validità del sistema.

Verifica della validità del sistema su campioni urinari

La seconda fase della ricerca è consistita nella validazione del sistema messo a punto, con l'uso di campioni urinari di provenienza ospedaliera.

Tutti i campioni sono stati analizzati col sistema classico dell'inclusione in agar-germi, col metodo "Urino-slide" e col sistema della conta lineare qui descritto.

Si sono osservati risultati analoghi a quelli ottenuti con i ceppi di collezione anche se leggermente diversi nelle misure. I dati ottenuti, che sono riassunti nella Figura II, mostrano come a valori di lunghezza della coltura lineare superiori ai 4 cm corrispondono cariche batteriche significative ai fini diagnostici, ovvero $\geq 10^5$ UFC/ml.

Con una buona approssimazione sono stati determinati dei ranges di misura della coltura lineare che corrispondono a 10^4 , 10^5 e 10^6 UFC/ml.

La ragione dei risultati non perfettamente sovrapponibili a quelli degli esperimenti eseguiti nella fase sperimentale con l'uso di sospensioni batteriche note, è probabilmente dovuta sia alla diversità e variabilità dei parametri fisico-chimici dell'urina rispetto alle sospensioni in soluzione fisiologica e sia alla presenza di colture miste contenenti anche tre microrganismi diversi nelle urine.

Dei 396 campioni di urine esaminati con i vari sistemi per urinocoltura, 97 (24%) contenevano meno di 10^5 UFC/ml e sono stati considerati negativi, i rimanenti 299

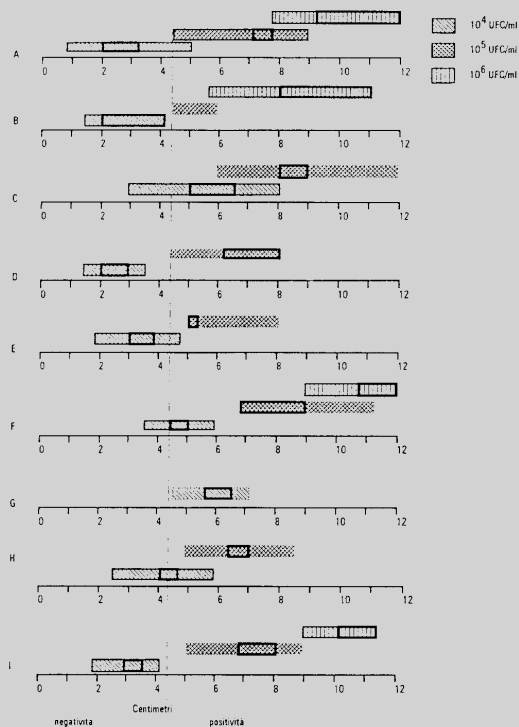


FIGURA 1
Distribuzione dei valori delle colture lineari di vari ceppi batterici. I ceppi utilizzati sono A=Escherichia coli, B=Proteus mirabilis, C=Staphylococcus aureus, D=Enterococcus faecalis, E=Candida albicans, F=Streptococco β -emolitico, H=E.coli + E. faecalis + S. aureus. Le zone circoscritte da cornice più scura indicano un maggior numero di campioni che presentano quei valori.

(76%) erano positivi con UFC/ml $\geq 10^3$.

Il margine di errore diagnostico del sistema di conta lineare (tabella 1), rappresentato dalla lettura di falsi negativi, era quasi irrilevante (0.5%). Questo margine di errore era invece superiore con l'uso di "Urino-slide" ad immersione in cui, dai dati da noi ricavati nella conta batterica delle urine, risultava essere di circa il 6%. Da questi dati si possono ricavare gli indici esposti nella tabella 2; la sensibilità risultava essere superiore per il sistema di conta lineare (99%) rispetto all'"Urino-slide" (93%), la specificità (82 rispetto a 84%) e il valore predittivo per i campioni positivi erano praticamente simili (93% per la conta lineare contro il 94% per l'"Urino-slide"), mentre il valore predittivo per i campioni negativi era nettamente superiore (il 98 contro l'83%).

Sviluppo di un kit per la conta e per l'isolamento batterico nelle urine

Il kit realizzato per l'uso nel laboratorio di microbiologia (vedi Figura III), brevettato con il nome di "Linear-count" da parte della Società Microbiol di Sestu, è composto da una piastra di plastica trasparente con coperchio, con un pozzetto superiore rettangolare di 15.5 cm di lunghezza e 1.7 cm di larghezza, contenente terreno CLED, che permette la crescita della maggior parte dei microorganismi abitualmente riscontrabili nelle urinocolture. Sotto questo pozzetto ne sono disposti altri in numero variabile da due a quattro, di forma lineare. Nella figura è rappresentato il sistema "Linear-count-3" con due pozzetti lineari supplementari. Questi ultimi possono contenere il terreno McConkey per microorganismi Gram-negativi e il terreno cetrimide per Pseudomonas, oppure altri terreni come il terreno Sabouraud per miceti, il terreno sale-mannite per stafilococchi o agar sangue per altri microorganismi esigenti. Sul bordo superiore della piastra è stampata una scala millimetrica che indica immediatamente la lunghezza del fronte della coltura, e quindi consente una rapida e oggettiva valutazione del numero di microrganismi presenti nel campione urinario.

TABELLA 1
Confronto della conta microbica ottenuta col sistema classico mediante diluizione in agar-germi, il metodo "Urino-slide", il metodo nefelometrico e il sistema "Linear-count"

METODO USATO	N° URINE ESAMINATE	NEGATIVI	FALSI NEGATIVI N (%)	POSITIVI N. (%)	FALSI POSITIVI N. (%)
Inclusione in Agar	396	97 (24)	-	299 (76)	-
Metodo Nefelometrico	396	0	-	396 (100)	97 (24)
Urino-slide	199	55 (28)	11 (6)	144 (72)	10 (5)
Linear-count	396	78 (20)	2 (0,5)	318 (80)	21 (5)

TABELLA 2
Confronto degli indici di sensibilità, specificità e del valore predittivo positivo

METODO USATO	SENSIBILITA' %	SPECIFICITA' %	VALORE PREDITTIVO %	
			POSITIVO	NEGATIVO
Urino-slide	93	84	94	83
Linear-count	99	82	93	98

CONCLUSIONI

Il metodo originale proposto, che consente la conta batterica delle urine mediante semina lineare, è pratico ed affidabile, come è stato dimostrato sia sperimentalmente che per la valutazione di campioni patologici clinici. Infatti, ha dimostrato di essere notevolmente più sensibile e avere un valore predittivo negativo superiore rispetto al metodo "Urino-slide", che è uno dei più semplici e più diffusi metodi rapidi per urinocoltura. Questo vuol dire che permette di evitare la refertazione di falsi negativi, che non sono accettabili da parte di un sistema di analisi moderno. Inoltre, rispetto a quest'ultimo, presenta anche altri vantaggi, in quanto può essere usato con quantità di urine anche molto piccole, consente una lettura del numero di microorganismi presenti oggettivo e permette un più facile e agevole isolamento delle colonie microbiche.

I risultati ottenuti dimostrano che è possibile, con una semplice semina lineare di una sospensione batterica su un opportuno terreno di coltura, in condizioni rigidamente standardizzate, ottenere con elevata precisione l'indicazione del numero di batteri presenti in essa, misurando la lunghezza in cm della coltura stessa e quindi individuando immediatamente una coltura significativa di infezione in atto.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander MK, Khan MS, Dow CS. Rapid screening for bacteriuria using a particle counter pulse-height analyser, and computer. *J Clin Pathol* 1981; 34:194-8.
- Benfari-Ferraro MJ, Kunz LJ. Predictive value of microbiological diagnostic tests, p. 248-251. In V. Lorian (ed.) 1982. Significance of medical microbiology in the care of patients, 2nd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Bixler-Forrel E, Bertram MA, Bruckner DA. Clinical evaluation of three rapid methods for the detection of significant bacteriuria. *J Clin Microbiol* 1985; 22:62-7.
- Brenner B, Gilbert VE. Elevated levels of lactic dehydrogenase, glutamicoxalacetic transaminase, and catalase in infected urine. *Am J Med Sci* 1963; 245:31-42.
- Cady P, Dufour SW, Lawless P, Nunke B, Kraeger SJ. Impedimetric screening for bacteriuria. *J Clin Microbiol* 1978; 7:273-8.
- Hale DC, Wright DN, Mckie JE, Isenberg HD, Jenkins RD, Matsen JM. Rapid screening for bacteriuria by light scatter photometry (Autobac): a collaborative study. *J Clin Microbiol* 1981; 13:147-50.
- Henze PA, Thrupp LD, Anselmo CR. A rapid (4-6 hour) urine culture system for direct identification and direct antimicrobial susceptibility testing. *Am J Clin Pathol* 1979; 71:177-83.
- Jorgensen JH, Jones PM. Comparative evaluation of the Limulus assay and the direct gram stain for detection of significant bacteriuria. *Am J Clin Pathol* 1975; 63:142-8.
- Kass EH. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans Assoc Am Physicians* 1956; 69:56-64.
- Kass EH. Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract. *Arch Intern Med* 1957; 100:709-14.
- Lewis JF, Alexander EJ. Microscopy of stained urine smears to determine the need for quantitative culture. *J Clin Microbiol* 1976; 4:372-4.
- McGeachie JE, Kennedy AC. Simplified quantitative methods for bacteriuria and pyuria. *J Clin Pathol* 1963; 16:32-8.
- Nicholson DP, Koepke JA. The Automicrobic System for Urines. *J Clin Microbiol* 1979; 10:823-33.
- Pezlo MT, Tan GL, Peterson EM, De La Maza LM. Screening of urine cultures by three automated system. *J Clin Microbiol* 1982; 15:468-74.
- Pryles CV, Steg N. Specimens of urine obtained from young girl by catheter versus voiding. A comparative study of bacterial cultures, gram stains, and bacterial counts in paired specimens. *Pediatrics* 1959; 23:411-52.
- Resnick B, RI. Cella. KS Soghikian, AH Lieberman e E Weil. Mass detection of significant bacteriuria. *Arch Intern Med* 1969; 124:165-9.
- Smalley DL, Dittmann AN. Use of leukocyte esterase-nitrate activity as predictive assays of significant bacteriuria. *J Clin Microbiol* 1983; 18:1256-7.

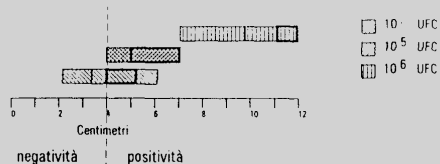


FIGURA II
Distribuzione dei valori delle semine ricavati da 396 campioni di urine. Le zone circonscritte da cornici più scure all'interno di ciascun range indicano un maggior numero di campioni aventi quei valori

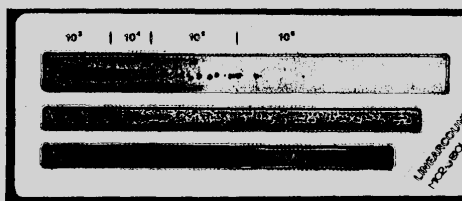


FIGURA III
Kit "Linear-count" per urinocolture: il pozzetto superiore contenente CLED (Andrade) serve per la conta batterica mediante coltura lineare; i pozzetti inferiori contengono terreni selettivi e differenziali per la prima identificazione dei batteri presenti (in questo caso MacConkey agar per Gram-negativi e terreno selettivo per enterococchi). La scala millimetrica sul bordo superiore della piastra consente una lettura immediata ed oggettiva del numero dei microorganismi presenti nelle urine e quindi un rapido riconoscimento delle batteriurie significative da quelle non significative