

Evaluation of an automated analytical system for rapid screening of lower respiratory tract infections

Shamanta Grosso, Graziano Bruschetta, Laura Favero, Marisa Gobbo, Paola Zigante, Alessandro Camporese

SOC Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli, Pordenone

Key Words: Lower respiratory tract infections, Rapid screening, Automation

Valutazione di un sistema analitico automatico per lo screening rapido di infezione delle basse vie respiratorie

SUMMARY

Respiratory tract infections are relevant causes of morbidity and mortality. It has been demonstrated that an appropriate initial antimicrobial regimen, or its early modification based on microbiological results, leads to a higher survival rate.

Automation in microbiology is of utmost importance in obtaining results in a shorter time, allowing an appropriate antimicrobial regimen to be started promptly.

Uro4 HB&L is an automated tool that uses light scattering technology to detect the growth of bacteria. The system is largely diffused for bacteriuria screening and the residual antimicrobial activity test (RAA) in urinary samples. In this study, the application of the Uro4 HB&L system for the automation of respiratory samples analysis was tested to evaluate the concordance with the standard culture methods.

Results of this study suggest that Uro4 HB&L can be able to speed up the laboratory procedures and grant reliable presumptive results for the clinician in very short time.

INTRODUZIONE

Nonostante l'evoluzione analitica e l'affinarsi della diagnosi clinica e strumentale, ancora oggi più del 50% dei casi di infezione respiratoria rimane privo di una precisa diagnosi eziologica, sia in ambito comunitario che nosocomiale (1, 3, 4, 5, 8, 9).

In effetti, in questo particolare contesto clinico, spesso le procedure analitiche sono ancora affidate a principi ormai superati (coltura, microscopia, sierologia), mentre gli elementi di efficienza sono talora ancorati all'epoca di Pasteur, con tempi di risposta che spesso, anziché risultare decisionali per la gestione clinica e terapeutica del paziente, finiscono per configurarsi come un inutile corollario anamnestico (1). Per cercare di indirizzare la terapia ai soli casi che ne richiedono l'immediata istituzione, evitando così di utilizzare antimicrobici nei contesti che non li richiedono, rischiando di aumentare la pressione selettiva e le resistenze, si è valutata l'ipotesi di utilizzare uno strumento di *screening*, comunemente impiegato prevalentemente per l'analisi dei campioni di urina e di liquidi biologici, per selezionare i campioni respiratori che necessitano di un approfondimento colturale dai campioni di pazienti che viceversa non richiedono ulteriori approfondimenti, e tanto meno prevedono un trattamento antimicrobico (2,

6, 7).

Considerando che nella *routine* diagnostica del nostro laboratorio in media più del 30% dei campioni respiratori non evidenzia positività per agenti eziologici significativi, la sperimentazione ha inteso anche individuare un possibile *cut-off* analitico che consenta di selezionare in poche ore i campioni negativi da quelli che invece necessitano di un approfondimento colturale, valutando l'impatto di tale modalità di *screening* sul TAT dei campioni negativi, sul carico delle semine e sul *workflow* del laboratorio.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 210 campioni provenienti dalle basse vie respiratorie (24 broncolavaggi e 186 broncoaspirati), prelevati con e senza sonde protette.

Dopo aver processato in una prima fase 50 campioni respiratori in doppio mediante due diverse tipologie di campionamento (Eswab Copan e SL Solution Copan, Brescia, Italia), avendo rilevato una maggiore concordanza dei risultati strumentali rispetto all'esame colturale utilizzando SL Solution (Copan) per il *pre*-trattamento dei campioni, si è scelto definitivamente di utilizzare per la sperimentazione quest'ultimo *device* in

Corresponding author: Shamanta Grosso

SOC Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli

Via Montereale, 24 - 33170 Pordenone - Tel.: 0434 399650;

E-mail: shamanta.grosso@libero.it; alessandro.camporese@aopn.fvg.it

provetta.

Non solo, infatti, SL Solution garantisce rispetto a Eswab una migliore omogeneizzazione del campione prelevato, ma consente anche una minore diluizione del materiale di origine, riducendo così il tempo necessario per l'esecuzione del processo di *screening*.

SL Solution contiene 1 mL di agente mucolitico (ditiotreitolo), che permette di ottenere una sospensione *ready to use* fluidificata, omogenea e quantitativamente standardizzata del campione, facilitando così l'analisi in automazione; 500 UI di campione, vortexati e mantenuti a temperatura ambiente per almeno 15 minuti, sono stati inoculati in appositi flaconcini (HB&L Culture kit, Alifax, Padova, Italia); al campione sono stati addizionati anche 200 UI di HB&L DEB (per favorire la crescita di *fastidious organisms*).

Lo strumento HB&L Uroquattro (Alifax, Padova, Italia), utilizzato per lo *screening*, sfrutta il principio del *light scattering* (2, 6, 7), mediante un nefelometro laser in grado di rilevare la crescita microbica in specifici flaconcini contenenti brodo eugonico (HB&L Culture kit).

L'incubazione avviene mediante alloggiamento dei flaconcini all'interno di cassette che fungono allo stesso tempo da incubatore (a 37 °C) e agitatore magnetico in continuo, nonché da sistema di lettura. Un raggio laser attraversa i flaconcini ogni 5 minuti permettendo al sistema di rilevare le variazioni di torbidità. L'eventuale presenza di microrganismi nella sospensione determina una deviazione della luce (*light scattering*), rivelata da un *detector* sul fondo degli alloggiamenti dei flaconcini. La prima lettura di ogni campione evita che la torbidità iniziale dovuta a sali, eritrociti, leucociti, cellule di sfaldamento o microrganismi non vitali interferisca con il risultato finale.

Il segnale viene elaborato da un *software* che, analizzando la curva di crescita dei microrganismi, elabora la stima della carica batterica espressa in CFU/ml.

La soglia oraria massima per la lettura strumentale è stata fissata a 8 ore dall'inizio del processo.

I risultati ottenuti utilizzando l'analizzatore HB&L sono stati confrontati con quelli ottenuti con l'esame colturale tradizionale, secondo gli standard previsti dalle procedure ISO 15189 del laboratorio. Le identificazioni biochimiche, quando necessarie, sono state eseguite con sistema Vitek2 o mediante gallerie API (bioMérieux Italia, Firenze).

RISULTATI

Nella Tabella 1 e 2 sono riassunti i risultati ottenuti dalla sperimentazione.

La soglia di 1 h e 30 min è stata considerata il *cut-*

off minimo di rilevazione strumentale, non essendosi manifestata alcuna crescita microbica prima di tale limite.

La soglia di 5 h e 30 min è stata considerata il *cut-off* massimo di rilevazione strumentale, con l'obiettivo di contenere il più possibile entro questo limite la quota dei falsi negativi, ottenendo al tempo stesso un tempo di rilevazione che consenta la massima sensibilità del metodo e il migliore valore predittivo negativo, rapportati al migliore *turnaround time* del sistema analitico.

Sei campioni positivi per *Candida* spp. sono stati considerati come negativi, in quanto rappresentativi di colonizzazione, così come previsto dalle più autorevoli e recenti linee guida.

L'analisi della sensibilità, specificità, valore predittivo negativo (VPN) e valore predittivo positivo (VPP) sono stati determinati seguendo due diversi profili valutativi.

Una prima valutazione è stata operata seguendo i *cut-off* strumentali e temporali prefissati (Tabella 1). Seguendo questi presupposti, si è ottenuta una sensibilità dell'89% e una specificità del 44%, con un VPN pari al 91%, e un VPP pari a 37%.

Una seconda valutazione è stata operata prendendo in considerazione solo l'effettiva performance strumentale (Tabella 2), senza considerare la soglia oraria predefinita.

Con questi presupposti, strettamente correlati all'accuratezza strumentale, si è ottenuta una sensibilità del 96% e una specificità del 25%, con un VPN pari al 95%, e un VPP pari a 33%.

Come è evidente, la differenza tra i due risultati è assolutamente sostanziale, con una sensibilità assolutamente rilevante in rapporto alla complessità del campione analizzato.

Questi risultati dimostrano l'ottima accuratezza del metodo e l'elevato VPN, parametro di riferimento per definire la performance di un *test* di *screening*.

Sul risultato della valutazione contestuale della *performance* analitica e della soglia temporale pesano, invece, i 6 risultati falsi negativi, 4 dei quali sono riferibili non tanto a una ridotta accuratezza del metodo, ma a un tempo di rilevazione più esteso di quello prefissato come *cut-off*.

Sul risultato della specificità ha pesato molto la scarsa qualità del campionamento. Il numero di FP, infatti, è direttamente proporzionale alla tipologia e alla qualità del campione analizzato.

Su broncolavaggi prelevati con sonde protette, infatti, nei quali è pressoché assente la contaminazione dovuta a flora microbica oro-faringea, l'efficacia dello *screening* è massima, mentre entrambe diminuiscono proporzionalmente, qualora si utilizzino broncoaspirati ottenuti senza protezione del prelievo, o peggio espettorati.

Nonostante la prevalente scarsa qualità del campionamento, rappresentato per la maggior parte (88%) da broncoaspirati prelevati con sonde non protette, utilizzando il *range* temporale di rilevazione tra 1.30 e 5.30 ore, circa il 33% dei campioni può considerarsi VN e può essere refertato in tempo reale.

Considerando la quota dei FP, direttamente riportata alla scarsa qualità del campione, si può sostenere che, se si dispone di soli materiali respiratori prelevati con sonde protette, solamente poco più del 30% dei campioni avrebbero necessità di essere processati mediante l'esame colturale dopo lo *screening*, riducendo così in modo marcato il TAT dei campioni negativi e altrettanto il numero di campioni da inviare in semina, con un netto miglioramento dei flussi analitici.

CONCLUSIONI

Le tecnologie analitiche che progressivamente stanno entrando a far parte della quotidianità diagnostica stanno radicalmente cambiando gli assetti organizzativi e gestionali dei laboratori di microbiologia.

La disponibilità di nuovi strumenti, e l'estensione delle loro funzionalità a diversi contesti, rispetto a quelli per i quali erano stati originariamente concepiti, sono parte integrante di una più moderna *vision* del microbiologo, sempre più spesso chiamato a fornire risultati nel minore tempo possibile, per ridurre l'utilizzo di terapie empiriche talora inappropriate, a favore di un più mirato indirizzo terapeutico, possibile quanto auspicabile, quando si dispone dell'evidenza degli agenti eziologici di

malattia in termini di tempo clinicamente utili.

Nel presente studio si è inteso volutamente analizzare una tipologia diversificata di campionamenti, per meglio valutare le possibili interferenze sull'efficacia dello *screening*, dimostrando ciò che peraltro era atteso, ovvero l'importante impatto della qualità del campionamento sulle *performance* analitiche.

Nonostante si sia deciso deliberatamente di operare nelle condizioni più critiche, con l'88% di campioni prelevati senza l'ausilio di sonde protette, in modo da "stressare" al massimo il sistema analitico sotto il profilo dell'accuratezza, esso ha comunque prodotto risultati molto incoraggianti, con livelli di sensibilità e di VPN di tutto rispetto. Il livello di accuratezza del metodo, capace di crescere esponenzialmente al crescere della qualità del campionamento, deve perciò costituire uno stimolo per il clinico e il microbiologo per ricercare la massima appropriatezza del prelievo.

I dati ottenuti dimostrano che un sistema così concepito, basato su una tecnologia ormai ben sperimentata in altri contesti diagnostici, inserito in un contesto operativo a orari estesi, consente di intervenire tempestivamente sulla gestione del paziente evitando, quando possibile, inutili interventi terapeutici e un inquadramento più puntuale della patologia in atto.

Se, come già previsto, si renderà disponibile anche un sistema di semina automatica operata direttamente dallo strumento dedicato allo *screening*, si potrà inoltre ottenere una completa gestione in automazione dei campioni respiratori, con un notevole impatto sul *workflow*.

Tabella 1. Risultati dell'analisi di 210 campioni della basse vie respiratorie (broncolavaggi e broncoaspirati), ottenuti utilizzando le rilevazioni strumentali rapportate alla fascia oraria (min 1.30 - max 5.30 ore), che ha prodotto la migliore performance analitica

Veri Positivi (VP)	Veri Negativi (VN)	Falsi Positivi (FP)	Falsi Negativi (FN)
52*	67**	85 [^]	6 ^{^^}

* Rilevati nella fascia oraria selezionata

** Rilevati in relazione alla fascia oraria selezionata e al risultato strumentale

[^] Definiti come positività strumentali, rivelatesi in coltura come colonizzazioni da flora microbica orofaringea, espressione di scarsa accuratezza del prelievo

^{^^} Quattro campioni sono stati classificati come FN in base alla fascia oraria di rilevazione (1 *Haemophilus influenzae*, 1 *Pseudomonas aeruginosa*, 2 *Haemophilus parainfluenzae*); due campioni sono stati classificati come FN in relazione al mancato rilevamento strumentale (*S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*).

N.B.: da un punto di vista strettamente analitico, i veri FN sono in realtà solo 2, ovvero i campioni contenenti i due microrganismi (*S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*) che non sono stati effettivamente rilevati dallo strumento.

Tabella 2. Risultati dell'analisi di 210 campioni della basse vie respiratorie (broncolavaggi e broncoaspirati), valutati considerando solo le rilevazioni strumentali

Veri Positivi (VP)	Veri Negativi (VN)	Falsi Positivi (FP)	Falsi Negativi (FN)
56	38	114 [^]	2

[^] Definiti come positività strumentali, rivelatesi in coltura come colonizzazioni da flora microbica orofaringea, espressione di scarsa accuratezza del prelievo.

BIBLIOGRAFIA

1. Camporese A. Nuove frontiere analitiche in microbiologia e virologia. *Trends Med* 2011; 11 (1): 27-32.
2. Fontana C, Favaro M, Minelli S, Bossa MC, Altieri A, Favalli C. A novel culturing system for fluid samples. *Med Sci Monit* 2009; 15: 55-60.
3. Lim WS, Baudouin SV, Gorge RC, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax* 2009; 64 (Suppl III): 1-55.
4. Loens K, Van Heirstraeten L, Malhotra-Kumar S, et al. Optimal sampling sites and methods for detection of pathogens possibly causing community-acquired lower respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2009; 47 (1): 21-31.
5. Rotstein C, Evans G, Born A, et al. Clinical practice guidelines for hospital-acquired pneumonia and ventilator associated pneumonia in adults. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2008; 19: 19-50.
6. Roveta S, Marchese A, Debbia EA. Evaluation of the Uro-Quick, a new rapid automated system, for the detection of well-characterized antibiotic resistant bacteria. *J Chemother* 2004; 16: 76-87.
7. Tessari A, Squarzon L, Cavallaro A, Parisi SG, Cruciani M, Palù G. Evaluation of the Uro4 HB&L system for the rapid diagnosis of lower respiratory tract infections in intensive care units. *J Microbiol Methods* 2010; 81 (3): 235-9.
8. Torres A, Ewig S, Lode H, Carlet J, for the European HAP Working Group. Defining, treating and preventing hospital acquired pneumonia: European perspective. *Intensive Care Med* 2009; 35: 9-29.
9. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, et al. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17 (Suppl. 6): E1-E59.