

Utilizzo sperimentale di Sysmex UF-1000i nello screening di uretrite non gonococcica

Experimental evaluation of the Sysmex UF-1000i to rule out non-gonococcal urethritis

Shamanta Grosso, Graziano Bruschetta, Alessandro Camporese

S.O.C. di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli, Pordenone, Italy

INTRODUZIONE

Il termine "uretrite" sottende una serie di condizioni cliniche che possono provocare uno stato infiammatorio della mucosa dell'uretra, non sempre di natura infettiva [1].

Peraltro, più spesso le uretriti rappresentano invece l'espressione di un'infezione sessualmente trasmessa a carico dell'uretra. Le uretriti vengono così tradizionalmente distinte, in base all'eziologia, in gonococciche (GU) e non gonococciche (NGU) [1].

L'agente eziologico delle uretriti gonococciche è *Neisseria gonorrhoeae* mentre le uretriti non gonococciche sono più spesso riferibili a *Chlamydia trachomatis* (15-40%) e *Mycoplasma genitalium* (15-25%), secondo le più recenti stime americane [2-4]. Altri microrganismi sono più raramen-

te considerati rilevanti nella genesi delle NGU, salvo in particolari condizioni cliniche e/o immunitarie. Tra questi, gli enterobatteri, i cocchi gram positivi, *Trichomonas vaginalis* (raramente correlato ad episodi di uretrite), *Herpes virus*, che più spesso è causa di uretrite in corso di infezione primaria, e *Adenovirus*, spesso correlati alla pratica del sesso orale [2-6].

Tra i micoplasmi, se si esclude il citato *M. genitalium*, sembrano ormai aver perso importanza eziologica *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma parvum*, mentre rimane tuttora controversa la rilevanza clinica di *Ureaplasma urealyticum* [2-4, 7-9].

La situazione italiana, estrapolata dai dati raccolti dall'Istituto Superiore di Sanità attraverso i 14 laboratori nazionali (tra i quali il nostro) individuati per sorvegliare le infezioni sessual-

Tabella 1 - Prevalenza delle tre infezioni per genere e presenza o assenza di sintomi genito-urinari (aprile 2009-giugno 2011). Modificata da [6].

	% isolamento in pazienti sintomatici	% isolamento in pazienti asintomatici	% sul totale dei pazienti testati
DONNE			
<i>Chlamydia trachomatis</i>	3,0	1,7	2,3
<i>Trichomonas vaginalis</i>	0,9	0,4	0,7
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,2	0,1	0,1
UOMINI			
<i>Chlamydia trachomatis</i>	11,7	5,8	9,0
<i>Trichomonas vaginalis</i>	0,1	0,1	0,1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2,7	0,2	1,7

mente trasmesse (Tabella 1), dimostrano che l'infezione da *C. trachomatis* rappresenta il problema di maggiore rilevanza sia nell'uomo che nella donna, in assenza o meno di sintomatologia, confermando altresì il ruolo fondamentale dei portatori asintomatici nella diffusione dell'infezione [10].

L'evidenza di molti casi di NGU privi di diagnosi eziologica è spesso correlata alla metodica di analisi utilizzata [4]. Infatti, per diagnosticare la maggior parte degli agenti eziologici citati è necessario ricorrere a metodi molecolari, di cui pochi laboratori dispongono, inficiando così la possibilità di giungere a identificare correttamente la causa della malattia, rendendo più difficile individuare anche l'approccio terapeutico più efficace.

L'esame microscopico del secreto uretrale con colorazione di Gram è tradizionalmente considerato il test rapido più sensibile e specifico per documentare l'uretrite gonococcica, in attesa di eseguire l'esame colturale [1-3]. La dimostrazione dei caratteristici diplococchi Gram negativi, ben visibili microscopicamente in proporzioni variabili, e in sede più spesso intraleucocitaria, è infatti assolutamente patognomica.

Non altrettanto si può dire, invece, nel sospetto di NGU, in quanto l'esame microscopico della secrezione uretrale (quando presente) dopo colorazione di Gram, non sempre consente di sospettare l'infezione, per le diverse variabili a cui è soggetto: la consistenza della secrezione, e la conseguente qualità del prelievo, dello striscio e della colorazione, contestualmente all'esperienza del microscopista, influiscono infatti in modo significativo sui livelli di sensibilità e specificità del metodo [11].

Inoltre, anche in presenza di un preparato microscopico qualitativamente valido, molti soggetti sintomatici non dimostrano, anche all'occhio esperto, alcuna evidenza microscopica di infezione.

Si può dire, dunque, che l'esame microscopico può solo in alcuni casi contribuire a sospettare una NGU non garantendo, perciò, la stessa efficacia di *screening* che esso dimostra in presenza di GU [12-14].

Ciò nonostante, si ritiene che si possa sospettare una NGU quando sia dimostrabile microscopicamente la presenza di >5 polimorfonucleati (PMN) rilevati in almeno 5 campi ad elevato ingrandimento (x1000), anche se si è detto che pazienti sintomatici possono rivelare spesso valori inferiori di PMN, a conferma del ridotto va-

lore predittivo della microscopia nel sospetto di NGU [12].

Con lo scopo di individuare un metodo di *screening* che consenta di sospettare con maggiore efficacia una NGU prima di procedere all'esame colturale o molecolare del secreto uretrale, migliorando così il livello di efficienza diagnostica, si è pensato di valutare sperimentalmente un metodo altamente sensibile, quale la citofluorimetria, sfruttando contestualmente la recente evoluzione della tecnica di prelievo in terreno liquido.

■ MATERIALI E METODI

Duecento campioni di secreto uretrale sono stati prelevati, previa anamnesi, da pazienti non selezionati (160 maschi; 40 femmine) che riferivano sintomi genito-urinari associati o meno tra loro (disuria, pollachiuria, bruciore, riferita secrezione uretrale), afferenti agli ambulatori della nostra Unità Operativa. Tra i sintomi rilevati, l'entità e le caratteristiche di eventuali perdite dal meato uretrale al momento del prelievo, quando presenti, sono state valutate con particolare attenzione, in quanto sensibile espressione di malattia da infezione. Sono stati inoltre rilevati eventuali recenti rapporti a rischio riferiti dai pazienti, escludendo dallo studio eventuali soggetti che avessero rivelato all'esame microscopico e colturale un'infezione da *N. gonorrhoeae* (GU).

Il prelievo uretrale è stato eseguito dopo almeno due ore dall'ultima minzione, utilizzando un *device* (ESwab) che sfrutta una sonda floccata *microrheologica*[®] e un terreno di Amies liquido modificato in grado di mantenere la vitalità di un'estesa gamma di microrganismi (Copan, Brescia). Tale terreno, privo di enzimi e inibitori, stabilizzando gli acidi nucleici e gli antigeni, ha il vantaggio di poter essere impiegato anche per indagini non colturali.

Il kit di prelievo è costituito da una provetta a fondo conico e tappo a vite, contenente 1 ml di terreno di Amies liquido modificato e da una sonda floccata che permette di prelevare una quantità standardizzata di campione biologico, e di distribuirla nella fase liquida in modo rapido e completo, aumentando così in modo sostanziale il recupero di materiale prelevato. Per le analisi molecolari è stato utilizzata la stessa procedura di prelievo con sonda floccata in fase liquida, utilizzando il terreno UTM RT (Copan, Brescia).

La ricerca dei potenziali agenti eziologici di NGU è stata eseguita mediante esame colturale, tranne che per *C. trachomatis*, per la quale è stata utilizzato un metodo in Real Time PCR (Roche Diagnostics, Milano).

In questa prima valutazione non si è proceduto alla ricerca di *Mycoplasma genitalium*, *Herpes virus* e adenovirus.

Il materiale così prelevato è stato esaminato in tempo reale, direttamente dalla provetta con terreno liquido, utilizzando Sysmex UF1000i (Sysmex Co. Japan. Supplied by Dasit SpA, Cornaredo), citofluorimetro già dedicato nella nostra Unità Operativa alla diagnostica urinaria, che consente una valutazione puntuale dei leucociti e il conteggio dei batteri attraverso uno specifico canale (15).

L'esame microscopico con colorazione di Gram è stato eseguito su secreto uretrale fresco stemperato su vetrino al momento del prelievo in ambulatorio.

I risultati ottenuti con UF1000i sono stati confrontati con quelli dell'esame microscopico e dell'esame colturale e/o molecolare per la ricerca dei principali agenti eziologici di NGU, utilizzando un foglio *Microsoft Excel* e un sistema di elaborazione statistica dei dati registrati (*Analyse-It version 2.13 Clinical Laboratory module, Leeds, England*).

Il confronto statistico dei risultati dell'esame microscopico e degli esami colturali/molecolari, considerati come il *gold standard* contro cui misurare la *performance* del metodo di *screening* citofluorimetrico proposto, ha permesso di valutare diversi valori di *cut-off* strumentali per WBC e batteri, per individuare i migliori livelli di sensibilità, specificità e i valori predittivi del metodo.

■ RISULTATI

Nella Tabella 2 sono riassunti il numero e le percentuali di positività osservati con l'esame colturale/molecolare e i microrganismi rilevati. Il confronto tra i differenti risultati ottenuti con lo *screening* per la ricerca di leucociti (WBC) e batteri, eseguito con UF1000i, e i risultati degli esami colturali/molecolari del secreto uretrale, ha permesso di definire come soglia utilizzabile per lo *screening* strumentale per i WBC un valore di $500 \times 10^6/L$ e per i batteri un *cut-off* di $200 \times 10^6/L$, in grado di garantire le migliori *performance* del metodo in ordine a sensibilità, specificità e valore predittivo.

Nella Tabella 3 è riportato il confronto tra la percentuale di positività osservata con lo *screening* strumentale, ai livelli di *cut-off* definiti per WBC, e i diversi quadri microbiologici rilevati, rapportata alla percentuale di positività riscontrata con l'esame microscopico (alla soglia definita di >5 polimorfonucleati x almeno 5 campi x 1.000), e alla percentuale ottenuta nei medesimi quadri clinici in un'analogha valutazione di letteratura [12].

La sensibilità e la specificità dello *screening* strumentale, ai livelli di *cut-off* definiti, è risultata rispettivamente dell'84% e dell'82%. A un elevato valore predittivo negativo (VPN), pari al 96%, ha fatto riscontro un ridotto valore predittivo positivo (VPP), pari al 50%, molto probabilmente correlato con la bassa prevalenza di malattia.

Il metodo di *screening*, perciò, sembra assolvere correttamente e con notevole efficacia al ruolo di identificare i pazienti sani dai potenziali malati, così come richiesto a un test di *screening*.

In sintesi non sembra, perciò, almeno in prima istanza, essere in grado di distinguere con la

Tabella 2 - Risultati positivi degli esami colturali e/o molecolari eseguiti sui 200 campioni di secreto uretrale.

<i>Microrganismi</i>	<i>N. positivi rilevati</i>	<i>% su totale esaminati</i>	<i>N. positivi clinicamente significativi</i>	<i>% colonizzazione rilevata</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	15	7,5%	15	0%
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	13	6,5%	5	61,5%
Enterobatteri	14	7%	5	64,2%
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1%	2	0%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	2%	4	0%
Coinfezioni	4	2%	3	25%

stessa efficacia una “infezione” da una “malattia da infezione”.

Deve essere, infatti, rilevato che un paziente con “infezione”, ovvero con presenza di batteri nel sito di prelievo, non sempre manifesta necessariamente una “malattia da infezione”, in quanto è noto il ruolo di commensali di molti microrganismi comunemente riscontrabili nel secreto uretrale di pazienti altrimenti sani [2, 4]. Lo *screening* per WBC si è però confermato molto più sensibile, come è evidente nella Tabella 3, nel rilevare correttamente i soggetti malati in corso di infezione da *C. trachomatis*, senza dubbio il microrganismo maggiormente rilevante sotto il profilo clinico in corso di NGU.

In questo caso va segnalata altresì la sensibile capacità di UF1000i di individuare la potenziale positività del campione rispetto all’esame microscopico, alla soglia definita in letteratura alla quale ci siamo riferiti [12].

■ DISCUSSIONE

Dall’analisi dei dati ottenuti confrontando i risultati dello *screening* citofluorimetrico con UF1000i dei campioni di secreto uretrale rispetto a quelli dell’esame colturale/molecolare e dell’esame microscopico diretto, si possono trarre alcune considerazioni in merito alle possibili applicazioni del sistema per una valutazione preliminare dei campioni uretrali che preceda l’esecuzione dell’esame colturale e/o molecolare.

Innanzitutto, come già descritto da altri Autori, si conferma il ridotto valore predittivo dell’esame microscopico, mentre i risultati ottenuti con UF1000i hanno dimostrato una maggiore sensibilità nell’evidenziare l’aumento dei PMN in

corso di NGU, soprattutto nei casi sostenuti da *Chlamydia trachomatis* [12].

Se la sensibilità (84%) e la specificità (82%) dello *screening* citofluorimetrico esprimono una non elevatissima accuratezza del metodo, va rilevato che il valore di sensibilità potrebbe aumentare in modo anche apprezzabile qualora da un’analisi più estesa risultasse che una parte dei falsi positivi, come probabile, sia in realtà rappresentato da campioni nei quali si evidenzia la presenza di microrganismi che non sono stati oggetto della nostra indagine.

I risultati ottenuti, infatti, sono da considerarsi sperimentali, in quanto per validare in modo definitivo il metodo si renderà necessario analizzare un più ampio numero di campioni, rivalutando il livello di sensibilità e di specificità una volta esteso lo spettro della ricerca eziologica anche a quei microrganismi che in questo lavoro non sono stati considerati.

I limiti del presente studio, infatti, possono essere così riassunti: la ricerca di micoplasmi urogenitali è stata ristretta a *M. hominis*, peraltro considerato un colonizzatore delle vie urogenitali, e *U. urealyticum*. Non si è potuto procedere, invece, per motivi tecnici, alla ricerca molecolare di *M. genitalium*, che si configura come uno dei più significativi agenti eziologici di NGU dopo *Chlamydia* [2-4].

Inoltre, com’è noto, la ricerca con metodo colturale di *U. urealyticum* ha l’ulteriore limite di rilevare contestualmente *M. parvum*, che risulta indistinguibile in coltura da *U. urealyticum*, e il cui ruolo eziologico appare ancora molto controverso [4].

Oltre al problema legato all’inquadramento delle infezioni da micoplasmi, non è stato possibile eseguire la ricerca molecolare di *HSV* e *Adenovirus*.

Tabella 3 - Rapporto tra percentuale di risultati positivi rilevati allo screening (UF1000 o esame microscopico) e risultato analitico.

Metodo o riferimento	Campioni positivi per <i>Chlamydia trachomatis</i> (% positività)	Campioni positivi per <i>Ureaplasma urealyticum</i> (% positività)	Campioni positivi per altri batteri (% positività)	Campioni negativi (% positività)
WBC con UF1000i ($\geq 500 \times 10^6/L$)	73,3	38,4	42,8	21,8
Esame microscopico (>5 PMNs/HPF*)	35,7	7,6	7,1	2
Bradshaw C.S. et al. (12)	68	-	-	29

Legenda: PMN, polimorfociti; HPF, high power field (>5 campi a 1000x)

Questi limiti procedurali e interpretativi rendono, perciò, del tutto preliminari le nostre conclusioni, in quanto tali limiti potrebbero spiegare almeno in parte la discreta percentuale di positività dello *screening* strumentale dei WBC (21.8%) in campioni poi risultati negativi all'esame colturale/molecolare (Tabella 3).

La nostra impressione, infatti, è che un metodo sensibile come la citofluorimetria consenta, a differenza dell'esame microscopico, di rilevare con estrema efficacia anche i quadri infiammatori sostenuti da microrganismi che difficilmente possono essere messi in evidenza, se non con un metodo ad elevata sensibilità, quale l'indagine molecolare.

Lo dimostrerebbe la differenza tra il valore percentuale di positività ottenuto con UF1000i rispetto all'esame microscopico nei campioni positivi per *Chlamydia* (Tabella 3), a conferma della maggiore sensibilità della citofluorimetria rispetto alla colorazione di Gram nel rilevare un'infezione, che a sua volta è dimostrabile solo con sistemi analitici ad elevata sensibilità.

In effetti, già Bradshaw citava esplicitamente la possibilità di riscontrare con discreta frequenza una discrepanza tra risultato dell'esame microscopico e quello dell'indagine molecolare [12].

Il conteggio batterico mediante il canale specifico di UF1000i non sembra, invece, rappresentare un parametro determinante per inquadrare le NGU, e in particolare quelle riferibili a *Chlamydia* e *Ureaplasma*, a causa delle peculiari caratteristiche cellulari e biologiche di questi microrganismi, che ne inficiano la rilevazione strumentale.

Esso ha consentito, però, quando $<200 \times 10^6/L$, insieme alla valutazione dei WBC, di migliorare l'interpretazione del risultato dell'esame colturale, permettendo una più efficace discriminazione tra casi di "infezione" e "malattia da infezione".

Il conteggio estremamente sensibile dei WBC con UF1000i si è dimostrato, infatti, un efficace strumento per migliorare l'interpretazione patogenetica del quadro microbiologico, in quanto un ridotto valore di WBC, rapportato alla specie di microrganismi rilevati (Tabella 2),

sembra rappresentare un importante parametro per valutare il livello di colonizzazione batterica.

Valori di conteggio dei batteri $<200 \times 10^6/L$, con WBC $<500 \times 10^6/L$, anche in presenza di sviluppo di microrganismi potenzialmente patogeni, sono infatti sempre risultati associati a quadri di colonizzazione e/o di portatore asintomatico, oppure di uretrite non infettiva.

Su questi presupposti, come evidenziato nella Tabella 2, si è confermato un ruolo a prevalente carattere colonizzante di *Ureaplasma urealyticum* (61,5%) e degli enterobatteri (64,2%), che più spesso correlano invece con infezioni delle basse vie urinarie, piuttosto che con NGU, come riferito in letteratura [4, 12].

In conclusione, l'utilizzo di UF1000i si è rivelato un ottimo ausilio per lo *screening* di campioni di secreto uretrale nel sospetto clinico di NGU, viceversa difficilmente inquadrabile mediante la sola esecuzione dell'esame microscopico con colorazione di Gram.

L'elevato VPN rilevato con UF1000i (96%) ha consentito di identificare con buona attendibilità i pazienti sani, rappresentando così un efficace sistema per la selezione dei campioni da sottoporre a esame colturale/molecolare, con il valore aggiunto di fornire un risultato analitico di batteri e WBC fruibile in tempo reale, senza dover ricorrere a colorazioni specifiche e alla microscopia, con un sensibile risparmio in termini di risorse umane ed economiche. Il conteggio di WBC e batteri ha permesso, inoltre, una più efficace interpretazione dei quadri microbiologici emersi dall'esame colturale/molecolare.

L'utilizzo di un unico *device* di prelievo, rappresentato da una sonda floccata e una provetta con terreno liquido consente inoltre un migliore *comfort* di prelievo per il paziente, rispetto al tampone tradizionale, e un migliore *sorting* dei campioni, e al tempo stesso permette di eseguire da un'unica provetta sia lo *screening*, sia la semina per l'esame colturale, anche in automazione.

Keywords: nongonococcal urethritis, flow cytometry, microscopic examination.

RIASSUNTO

L'uretrite non gonococcica (NGU) rappresenta una delle più comuni infezioni sessualmente trasmesse nell'uomo e nella donna. La diagnosi di NGU richiede, tradizionalmente, un'evidenza microscopica di infiammazione uretrale. Peraltro, una significativa percentuale di pazienti con sintomi a carico dell'uretra non rivelano un quadro microscopico di uretrite. Lo scopo del presente studio è stato valutare sperimentalmente le *performance* analitiche di UF1000i, un citofluorimetro di recente introduzione, dedicato all'analisi delle urine, che consente di ottenere una serie di parametri particolarmente utili nella diagnostica microbiologica, per escludere o predire una NGU.

Sysmex UF1000i è un citofluorimetro in grado di quantificare un numero elevato di particelle, tra cui batteri (BACT) e globuli bianchi (WBCs). Per

valutare le *performance* analitiche di UF1000i nell'escludere una NGU, sono stati esaminati 200 campioni di secreto uretrale, raccolto utilizzando un nuovo terreno di trasporto in fase liquida (Copan). I risultati ottenuti con UF1000i sono stati confrontati con quelli ottenuti con le metodiche colturali/molecolari standard e con l'esame microscopico. Ai valori di *cut-off* definiti di 200 BACT $\times 10^6/L$ e 500 WBCs $\times 10^6/L$, si è ottenuta una sensibilità del metodo pari all'84%, una specificità dell'82%, e un elevato valore predittivo negativo (96%). Se l'esame colturale/molecolare rimane il *gold standard* per la diagnosi di NGU, Sysmex UF1000i ha dimostrato di migliorare l'efficienza della diagnosi presuntiva di NGU, fornendo i risultati in pochi minuti, con un'elevata sensibilità e un altrettanto elevato valore predittivo negativo.

SUMMARY

Acute nongonococcal urethritis (NGU) is one of the commonest sexually transmitted infections affecting men and women. The diagnosis of NGU has traditionally required microscopic evidence of urethritis. However, a significant proportion of patients with urethral symptoms do not have microscopic evidence of urethritis. The purpose of the present study was to evaluate the analytical performance of the UF1000i, a recently introduced fluorescence flow cytometer intended for urinalysis purposes which provides new analytical features that seem particularly suitable for microbiological diagnostics, for ruling out NGU or predicting the presence of infection.

The Sysmex UF1000i is a flow cytometry analyzer capable of quantifying many particles, including bacteria (BACT) and white blood cells (WBCs). To evaluate the

analytical performance of the UF1000i as a method for ruling out NGU, we examined 200 urethral smear samples, collected in a new liquid transport medium (Copan), and compared the UF1000i results with standard culture/molecular and microscopic Gram stain results. With instrument cut-off values of 200 BACT $\times 10^6/L$ and 500 WBCs $\times 10^6/L$, we obtained a sensitivity of 84%, a specificity of 82%, and a high negative predictive value (96%).

Culture/molecular detection of pathogens remains the gold standard technique for the diagnosis of NGU. However, the Sysmex UF1000i is capable of improving the efficiency of NGU presumptive diagnosis, providing results in a few minutes, with a high negative predictive value and high values of sensitivity.

BIBLIOGRAFIA

- [1] <http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/urethritis-and-cervicitis.htm>. Ultimo accesso 4 ottobre 2011.
- [2] Workowski K.A., Bernan S.M. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *MMWR* 17, 59, 1-110, 2010.
- [3] Workowski K.A., Bernan S.M. Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin. Infect. Dis.* 44, Suppl 3, S73-S76, 2011.
- [4] Martin D.H. Nongonococcal urethritis: new views through the prism of modern molecular microbiology. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 10, 128-132, 2008.
- [5] O'Mahony C. Adenoviral non-gonococcal ure-

thritis. *Int. J. STD AIDS* 17, 203-204, 2006.

- [6] Manfredi R., Beltrami C., D'Antuono A., Chiodo F., Varotti C. Sexually transmitted diseases (STD) and their relationship with sexual behaviour and condom use, in a cohort of teenagers referring to a STD centre. A nine-year, prospective observatory. *Infezioni in Medicina* 3, 147-153, 2001.

- [7] Lanzafame M., Delama A., Lattuada E., et al. Prevalence and clinical significance of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the lower genital tract of HIV-1-infected women. *Infezioni in Medicina* 4, 213-215, 2006.

- [8] Fenkci V., Yilmazer M., Aktepe O.C. Have *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections any significant effect on female fertility? *Infezioni in Medicina* 4, 220-223, 2002.

- [9] Leli C., Mencacci A., Concetta J., et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in a population of Italian and immigrant outpatients. *Infezioni in Medicina* 2, 82-87, 2012.
- [10] Salfa M.C., Regine V., Ferri M., Suligoi B. e Rete Nazionale dei Laboratori per le Infezioni Sessualmente Trasmesse. La sorveglianza delle infezioni sessualmente trasmesse basata su una rete di laboratori: 27 mesi di attività. *Notiziario ISS* 24, 10, 15-19, 2011.
- [11] Falk L., Fredlund H., Jensen J.S. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. *Sex. Transm. Infect.* 81, 73-78, 2005.
- [12] Bradshaw C.S., Tabrizi S.N., Read T.R., et al. Etiologies of nongonococcal urethritis: bacteria, viruses, and the association with orogenital exposure. *J. Infect. Dis.* 193, 336-345, 2006.
- [13] Landis S.J., Stewart I.O., Chernesky M.A., et al. Value of the gram-stained urethral smear in the management of men with urethritis. *Sex. Transm. Dis.* 15, 78-84, 1988.
- [14] Desai K., Robson H.G. Comparison of the Gram-stained urethral smear and first-voided urine sediment in the diagnosis of nongonococcal urethritis. *Sex. Transm. Dis.* 9, 21-25, 1982.
- [15] De Rosa R., Grosso S, Bruschetta G., et al. Evaluation of the Sysmex UF1000i flow cytometer for ruling out bacterial urinary tract infection. *Clin. Chim. Acta* 411, 1137-1142, 2010.