

# Diagnosi microbiologica delle infezioni del tratto urinario

**Maria Rita Rossi**

Modulo Dipartimentale  
di Microbiologia e Sierologia  
Azienda Ospedaliera- Universitaria  
S. Anna Ferrara



Il tratto urinario è normalmente sterile ad eccezione del primo centimetro distale dell'uretra che può essere colonizzato da microrganismi presenti sulla pelle:

- ✓ Staphylococcus epidermidis
- ✓ Streptococcus gr.D Enterococcus
- ✓ Corynebacterium species

e, occasionalmente:

- Escherichia coli
- Proteus species

## INFEZIONI DELLE VIE URINARIE (UVI)

- Sono il risultato della presenza e della moltiplicazione di batteri in una o più strutture del tratto urinario con possibile invasione dei tessuti
- Il termine UVI definisce un gruppo di infezioni accomunate da sintomi clinici ed eziologia
- Colpiscono soggetti di tutte le età e di appartenenza ad entrambi i sessi
- Possono avere un andamento ricorrente, sia per ricadute che per reinfezioni

## Classificazione anatomica delle UVI

- UVI genitali
  - Prostatiti, epididimiti, vesciculiti seminali ed orchiti
- UVI alte
  - Pielonefriti acute e croniche ed accessi renali
- UVI basse
  - Cistiti ed uretriti

## Terminologia

- **Batteriuria**
  - Indica la colonizzazione del tratto urinario da parte di batteri, senza invasione dei tessuti
- **Paziente asintomatico**
  - Esempi: donne gravide, diabetici
- **Paziente sintomatico**
  - Indica un paziente con o senza batteriuria, portatore di sintomi
- **Sintomi UVI**
  - Minzione frequente, disuria (dolore e difficoltà alla minzione), urgenza, nocturia o enuresi notturna, incontinenza, prostatismo, colica renale

## Incidenza UVI

Bambini	Associata ad anomalie del tratto urinario, reflusso vescico-ureterale.
Adulti	Più elevata nelle giovani donne. Nei giovani maschi è spesso correlata ad anomalie del tratto urinario. Con l'età l'incidenza diventa analoga nei due sessi.
Gravidanza	5% delle gravide al primo trimestre hanno batteriuria. Se non diagnosticate e curate il 30% delle pazienti va incontro a pielonefrite acuta.
Diabete	Glicosuria e disfunzioni vescicali legate a neuropatie sono fattori predisponenti per le UTI
Trapianto renale	Cateterizzazione e tubi di drenaggio post-intervento o infezioni pregresse durante la dialisi sono a rischio
Immuno depressione	Immunodeficienza, uso prolungato di antibiotici o steroidi

## Incidenza UVI

UTI comunitarie	Legate a germi che colonizzano la parte anteriore dell'uretra o l'introito vaginale, poco frequenti la diffusione ematogena (infezioni prostata), i calcoli renali, il passaggio attraverso una fistola (pazienti Crohn's o con tumori)
Pazienti cateterizzati	La batteriuria non è sinonimo di infezione. 10-20% dei pazienti con catetere ha batteriuria. 2-6% dei pazienti con catetere ha infezione. Frequente la batteriemia da Gram-negativi (1-4% dei pazienti con UVI con aumento dei costi per il ricovero), mortalità 13-30%. La cateterizzazione a lungo termine (>30 die) provoca batteriuria nel 100% dei casi, frequente batteriuria polimicrobica. La terapia antibiotica può ridurre le complicanze ma determina l'insorgenza di resistenze.

## EZIOLOGIA

- UTI acute non complicate
  - *Escherichia coli* (germe di provenienza fecale)
    - Fattori di virulenza rilevati
      - Aumentata aderenza alle cellule vaginali e uroepiteliali nei pazienti con infezione acuta rispetto al paziente con batteriuria asintomatica
      - Resistenza agli antibiotici
      - Aumentata produzione di di antigene K
      - Produzione di emolisine
  - *Proteus mirabilis* (comune nei giovani maschi, associato ad anomalie anatomiche del tratto renale, calcoli. Nei pazienti ospedalizzati causa infezioni croniche)
  - *Staphylococcus saprophyticus* (responsabile del 20% delle uretriti e delle cistiti nelle donne sessualmente attive)
  - *Streptococcus spp* (raramente causa UTI: *S.agalactiae* causa infezioni nelle donne, *Enterococcus spp* causa occasionalmente infezioni non complicate)

## EZIOLOGIA

- UTI complicate
  - *Escherichia coli* (rimane il germe piu' isolato)
  - *Klebsiella, Enterobacter e Proteus spp, Enterococcus spp* (in associazione con interventi strumentali e cateterizzazione)
  - *Pseudomonas aeruginosa* (associata con anomalie strutturali o catetere a permanenza)
  - *Staphylococcus aureus* (raramente causa infezioni, in associazione con anomalie renali o secondaria a batteriemia, interventi strumentali, cateterizzazione. Spesso deriva da contaminazione a partire dalla regione perianale)
  - *Candida spp* (associata a cateterizzazione, presente come contaminazione dal tratto genitale)
  - In rari casi sono implicati *Haemophilus influenzae, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum e Corynebacterium urealyticum*
  - E' da chiarire il ruolo di germi difficili come anaerobi, *Lactobacillus spp, Gardnerella vaginalis* e streptococchi "fastidious"

Nelle UVI non complicate il clinico non ricorre all'indagine colturale

L'urinocoltura è raccomandata nelle seguenti circostanze:

- Gravidanza
- Recente ospedalizzazione
- Recenti manovre invasive a livello uretrale
- Sospetta pielonefrite
- UVI complicate
- UVI che non rispondono alla terapia ragionata
- Bambini sotto i 6 anni e maschi adulti con anomalie anatomiche congenite o acquisite

*Reference Guide 7th Edition "Urinary Tract Infection"*

*American Board of Family Practice 2001*

## MODALITA' DI PRELIEVO

- Da puntura sovrapubica
- Da mitto intermedio
- Da cateterismo estemporaneo
- Da catetere a permanenza
- Da sacchetto
- Da condotto ileale, cistoscopia, nefrostomia, urostomia
- Da lavaggio vescicale

## MODALITA' CONSERVAZIONE

- A temperatura ambiente i germi contenuti nel campione si moltiplicano falsando il risultato dell'esame colturale
- Conservare il campione a +4°C fino a 18 ore
- Utilizzare come conservante acido borico al 1-2% per bloccare la conservazione fino 48-96 ore (poche le segnalazioni di tossicità)

## DIAGNOSI DI LABORATORIO DI UTI

- Esame microscopico
  - Globuli bianchi (WBCs)
  - Globuli rossi (RBCs)
  - Cristalli
  - Cilindri
  - Cellule epiteliali squamose
  - Batteri
  - Altro

Per batteri una goccia di urina non centrifugata osservata a 40X  
Sensibilità 10<sup>4</sup> CFU/ml  
96% dei pazienti sintomatici con batteriuria hanno >10<sup>5</sup> WBCs/ml  
NB: Proteus spp, urina alcalina, no WBCs
- Esame colturale
  - Carica batterica significativa
    - Donne > 10<sup>5</sup> CFU/ml
    - Uomini > 10<sup>3</sup>CFU/ml, 1 sola specie o ripetere
    - Bambini > 10<sup>5</sup> CFU/ml  
1 sola specie o verifica con puntura sovrapubica
    - Portatori di catetere a permanenza > 10<sup>5</sup> CFU/ml  
difficile discriminare tra colonizzazione ed infezione
  - Identificazione
  - Antibiogramma

Il "gold standard" per la diagnosi delle UVI è un esame colturale delle urine positivo con carica batterica significativa\*.

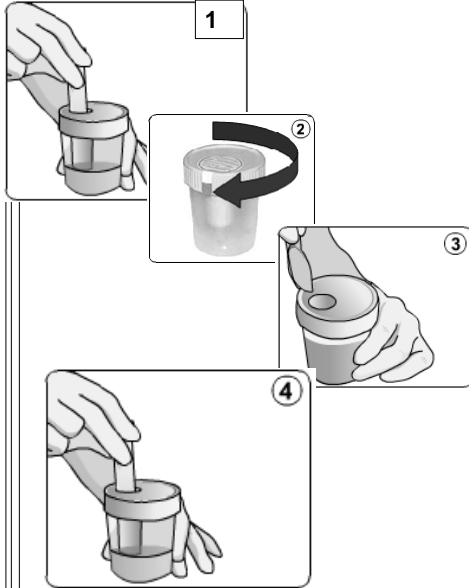
**\*Nell'adulto con batteriuria asintomatica una carica batterica  $\geq 10^5$  unità formanti colonia/ml permette di distinguere una contaminazione da una infezione vera, se il campione di urine è raccolto con la metodica del "mitto intermedio".**

***Sanford JP Annual Reviews Inc, 1975; Kass EH Trans Assoc Am Physicians 1956;69:56-63***

**Nel soggetto con batteriuria e sintomi, l'accuratezza aumenta se il cut-off è 10<sup>2</sup> unità formanti colonia/ml.**

***Stamm WE et Al. N Engl J Med 1982;307(8):463-468***

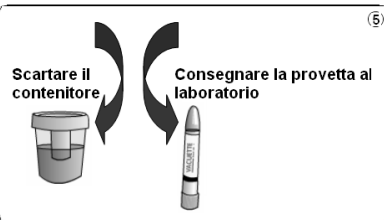
## NEL 2008 - INTRODUZIONE NUOVO SISTEMA DI RACCOLTA URINE



Travaso da contenitore  
a bocca larga in provetta  
Vacuette

Operazione effettuabile  
al momento della raccolta

1. in Reparto
2. al Centro prelievi
3. in Laboratorio



## Screening urine

### FINALITA'

- Individuare i campioni positivi
- Definire il numero di Unità Formanti Colonia per ml (CFU/ml)

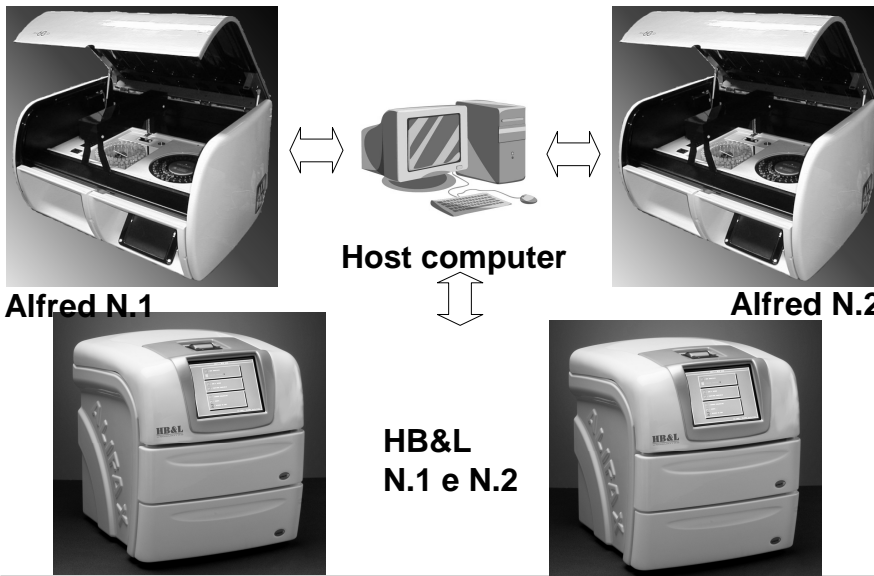
### STRUMENTO

- Alfred e HB&L composto da:
  - Alfred inocula e incuba e legge con 60-120 posti
  - HB&L incuba e legge 60-120 posti
  - Personal computer
  - Stampante
  - Fornito di collegamento bidirezionale con host computer

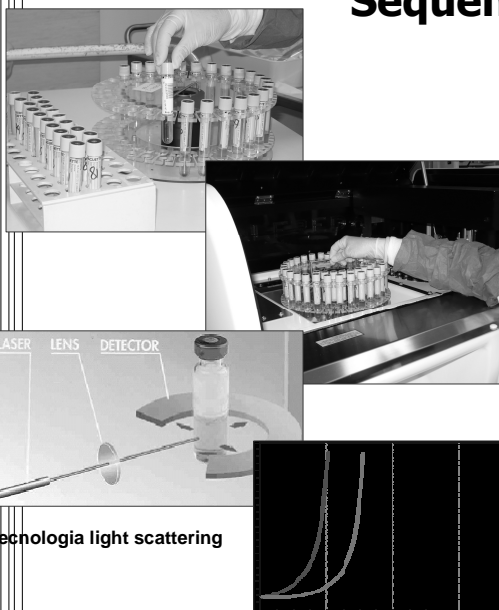




**NUOVO SISTEMA AUTOMATICO PER  
LO SCREENING DELLE URINOCOLTURE E PAR TEST**



**Sequenza attività**



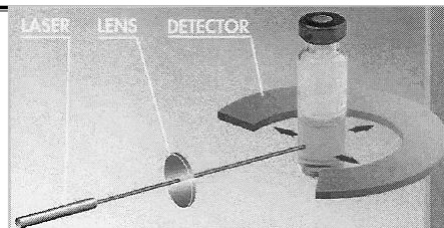
1. Alloggiamento delle provette primarie sul rotore
2. Caricamento del rotore sullo strumento
3. Caricamento in continuo di diversi batch
4. Alfred preleva automaticamente l'urina dalla provetta madre e inocula il vial con il brodo eugonico
5. Inizia l'incubazione e la lettura del vial
6. Alfred evidenzia i positivi e la carica

## Alfred e HB&L

- Lo strumento utilizza il principio del light scattering "NEFELOMETRIA LASER"
- Un raggio laser opportunamente polarizzato, collimato e focalizzato viene inviato sul campione da analizzare (provetta contenente 2 ml di brodo nutritivo+ 0,5 ml di urina) posto nella stazione di lavoro dello strumento.

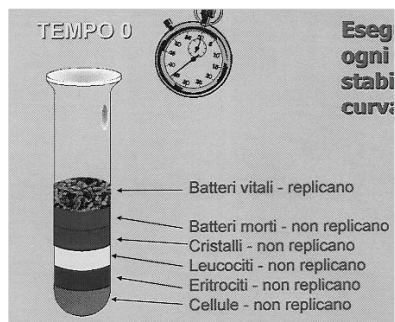
## Alfred e HB&L

- La temperatura di lavoro è 37°C
- Un'ancoretta, calamitata sul fondo della provetta, miscela la brodocoltura favorendo la replicazione dei batteri
- Due detectors ad angoli diversi di rilevazione posti a 30° ed a 90° rispetto al raggio incidente permettono di dare indicazioni sulla forma e le dimensioni dei batteri.



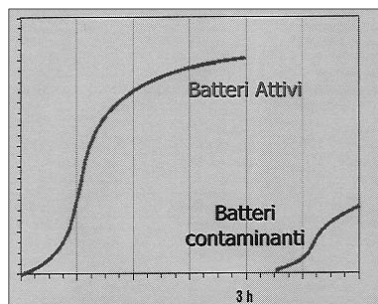
## Alfred e HB&L

- ❑ Dopo 5 minuti dall'introduzione del campione, tempo necessario allo scioglimento di eventuali sali ed a rendere omogeneo il campione, lo strumento esegue una prima lettura che funge da bianco
- ❑ Se un campione è molto torbido viene segnalata all'operatore la possibilità di errore nel risultato



## CURVA DI CRESCITA

- ❑ Ogni 5 minuti esegue numerose letture per ciascun campione
- ❑ Il segnale luminoso viene tradotto in curve di crescita
- ❑ Calcola la cinetica dei batteri replicanti, i batteri non vitali e le particelle presenti nel campione non contribuiscono all'aumento di torbidità nel tempo e all'incremento esponenziale della curva di crescita



## Alfred e HB&L

- L'analisi delle curve può dare indicazioni sulla tipologia dei batteri e sulla carica batterica
- Il risultato espresso in CFU/ml indica il numero di batteri presenti nel campione al momento dell'inoculo
- La sensibilità dello strumento varia in funzione del tempo di incubazione e del software selezionato:
 

– Minuti 65	Software fast	CFU/ml > 1.000.000
– " 120	" "	" " 50.000
– " 150	" "	" " 9.000

## TERRENI DI COLTURA, CONDIZIONI DI INCUBAZIONE E MICRORGANISMI

CONDIZIONI CLINICHE	TERRENO DI COLTURA	INCUBAZIONE			ORGANISMO TARGET
		TEMP. °C	ATMOSFERA	TEMPO	
UTI	Agar sangue Mac Conkey Enterococcus agar	35-37°C	aria	16-24 h	Enterobacteriaceae Enterococchi S.agalactiae grB Pseudomonas S.saprophyticus Altri Staphylococchi coag – S.aureus
SOSPETTA INFEZIONE DA FUNGHI	Sabouraud agar	35-37°C	aria	40-48 h	Candida albicans Altri lieviti
URINE RIPETUTAMENTE STERILI PAR-	Fastidious anaerobe agar	35-37°C	Anaerobiosi	40-48 h	Anaerobi Streptococchi
	Agar cioccolato	35-37°C	5/10% CO2	40-48 h	Fastidious organisms

Diagnosi di IVU spesso inficiata o ritardata dalla presenza nel campione di:

- Antibiotici
- Principi attivi farmacologici
- Sostanze naturali assunte con l'alimentazione che interferiscono nello sviluppo in vitro dei microrganismi

Conseguenza: false negatività dell'esame colturale delle urine nonostante evidenti sintomi a favore di UVI

## **POTERE**

### **ANTIMICROBICO RESIDUO**

**È il test che individua**

- ♥ Residui di farmaci antibiotici
- ♣ Residui di farmaci non antibiotici ma con attività antimicrobica
- ♠ Sostanze naturali con effetto antimicrobico simile

## ALCUNI ESEMPI DI PIANTE CON POTERE ANTIBATTERICO

- ❖ Vari cereali
- ❖ Carote
- ❖ Patate
- ❖ Liliacee come aglio e cipolla
- ❖ Crocifere come rafano, senape, crescione
- ❖ Propoli
- ❖ Aloe vera

- ❖ Estratto di semi di pompelmo
- ❖ Rosmarino
- ❖ Ceci
- ❖ Salvia
- ❖ Timo
- ❖ Fragole
- ❖ Aceto di mele ecc...ecc...

Numerosi oli essenziali hanno azione antiseptica perché contengono fenoli e aldeidi

Aromatic Medicine in the Treatment of Infections

*Colin Nicholls British Journal of Phytomedicine, Vol 5 N° 1, 1998*

Carvacrol	Origanum vulgare Satureja montana
Thymol	Thymus vulgaris Trachyspermum ammi
Eugenol	Eugenia caryophyllus
Cinnamic aldehyde	Cinnamomum zeylanicum

Numerosi oli essenziali hanno azione antisettica perché contengono alcoli

Aromatic Medicine in the Treatment of Infections

*Colin Nicholls British Journal of Phytomedicine, Vol 5 N° 1, 1998*

Linalol	Lavandula vera Lavandula latifolia/spica Citrus aurantium ssp. Aurantium
Terpinen-4-ol	Melaleuca alternifolia
Alpha-terpineol	Melaleuca quinquenervia Melaleuca cajuputii Ravensara aromatica
Geraniol	Pelargonium x asperum Cymbopogon martinii

### **Residui di farmaci non antibiotici**

Possono evidenziare un'attività antibatterica nei liquidi biologici

Esempi:

- O Neurolettici
- O Antimalarici
- O Antistaminici
- O Diuretici
- O Anti-ulcera
- O Anti-ipertensivi
- O Anestetici

## Fattori naturali di difesa e principi attivi diversi dagli antibiotici

Possono evidenziare un'attività antibatterica nei liquidi biologici

Esempi:

- Frazione del complemento
- Opsonine e anticorpi specifici
- Proteine di derivazione fagocitaria
- $\beta$ -lisine

## PAR-test: metodiche manuali

### SAGGIO DI DIFFUSIONE IN AGAR

- Piastra di agar germi contenente spore di *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953
- Si deposita sull'agar un dischetto imbevuto di urina
- Si incuba a 60°C per 3 h
- Si osserva l'eventuale presenza di alone di inibizione senza misurare il diametro
  - ✓ Controllo negativo: dischetto sterile
  - ✓ Controllo positivo: dischetto imbevuto con 0,01 U.I. di penicillina

### METODO COLORIMETRICO IN MICROPIASTRA

- Spore di *Bacillus subtilis* ATCC 6633 essiccate in pozzetti di micropiastra con terreno di coltura e indicatore cromogenico di crescita
- Si inocula l'urina nel pozzetto
- Si incuba a 37°C per 18 h
  - ✓ PAR-test POS: pozzetto giallo
  - ✓ PAR-test NEG: pozzetto rosso

A 60° si inattivano i fattori antibatterici naturali

Incubazione prolungata rende impossibile la refertazione in giornata



## PAR-test

### APPLICAZIONE SU URO QUICK

- ❑ Sistema analitico automatizzato per lo screening delle urine e del PAR-test, basato sul principio della laser-nefelometria *Light Scattering*
- ❑ Procedimento
  - Vengono inoculate con 500 µl di urina
    - Una provetta con brodo di coltura per lo screening
    - Una provetta con una sospensione di *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, sensibile a tutti gli antibatterici, per il PAR-test
  - Le due provette vengono incubate in appositi alloggiamenti del cassetto dell'Unità di Lettura
  - Il PAR-test viene ricavato dal confronto tra le cinetiche di crescita della provetta di screening e del PAR-test

**L'analisi dura 120-180 minuti**

**SI REFERTANO IN GIORNATA PAR-test e Screening**

## PAR-test a confronto

- Non esiste uno standard internazionale per la determinazione del PAR
- Le diverse metodiche presentano una buona correlazione
- Le diverse interpretazioni possono derivare da:
  1. Diverse modalità di crescita in brodo o in agar
  2. Interpretazione visiva nella versione manuale o cut-off strumentale nel sistema automatico

PAR-test		INTERPRETAZIONE
PAR -	Coltura -	Il risultato dell'esame colturale è avvalorato
PAR -	Coltura +	Il risultato dell'esame colturale è avvalorato
PAR +	Coltura -	<p>Attenzione alle basse cariche batteriche!            Germi difficili?            Utili tests diagnostici rapidi di approfondimento (esterasi leucocitaria, nitriti)            Indispensabili le informazioni cliniche: Paziente sintomatico? Terapia antibiotica in atto?            Assunzione di sostanze antibatteriche con l'alimentazione? Terapie alternative con effetto antimicrobico?</p>
PAR +	Coltura +	Se il paziente è in terapia antibiotica questa è inefficace

## CONCLUSIONI

- ♣ L'esecuzione del PAR-test in associazione all'esame colturale delle urine è fondamentale per una corretta diagnosi delle IVU
- ◆ In assenza di dati clinici, il risultato del PAR-test aiuta il microbiologo nell'interpretazione dell'esame colturale
- ♥ Il laboratorio offre al clinico uno strumento aggiuntivo nella diagnosi delle infezioni delle vie urinarie inducendo:
  - ♠ Anamnesi approfondita tesa alla conoscenza di abitudini alimentari, aromaterapia, uso non appropriato della terapia antibiotica, uso di farmaci non antibiotici....
  - ♠ Indagini diagnostiche alternative

Grazie per l'attenzione

