L'esame microbiologico dell'urina

A. Camporese
Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Unità di Microbiologia Clinica e Terapia Antibiotica, Pordenone.

La patologia infettiva delle vie urinarie

Le infezioni delle vie urinarie (IVU) rappresentano la patologia infettiva con maggiore incidenza nella popolazione ospedaliera e comunitaria[1].
Il termine infezione delle vie urinarie è, peraltro, un termine generico e spesso usato in modo non chiaro, in quanto talora riferito solo alla presenza di batteri nelle urine, presenza che non necessariamente esita in malattia: mai come nel caso delle vie urinarie è, infatti, necessario distinguere tra infezione e malattia da infezione in quanto la sola evidenza di microrganismi non correla necessariamente con l'insorgere di sintomatologia clinica specifica.
Nella genesi di malattia infettiva delle vie urinarie, alta o bassa, ascendente o meno frequentemente discendente, giocano un ruolo non indifferente l'entità dell'inoculo batterico, la virulenza del microrganismo e i meccanismi di difesa dell'ospite, mentre diverse anomalie congenite o acquisite delle vie urinarie influiscono non poco come determinanti di una possibile infezione[1].
L'urina è normalmente sterile, ma nell'uretra dell'uomo si trovano anche normalmente dei batteri, il cui numero è relativamente elevato in vicinanza del meato urinario mentre va decrescendo man mano che si procede verso la vescica.
Nel maschio, se si somma la lunghezza dell'uretra e la lontananza del meato urinario da possibili contaminazioni fecali, si spiega come l'incidenza delle IVU sia inferiore rispetto alla donna.
Nella donna, appunto, la brevità dell'uretra e la facilità con cui si può realizzare una contaminazione fecale della stessa sono fattori di base predisponenti all'infezione urinaria: è noto che dal 20 al 40% delle donne hanno almeno un episodio di batteriuria nella loro vita e circa la metà ne presenta più di uno.
L'incidenza di dette infezioni aumenta con l'età, in rapporto all'aumento dell'attività sessuale: il trauma meccanico sull'uretra femminile e la sua spremitura durante i rapporti sessuali facilita la risalita di microrganismi e aumenta la possibilità di infezione.
L'incidenza aumenta altresì con il succedersi delle gravidanze e con il rilassamento del pavimento pelvico. Le infezioni durante la gravidanza sono rappresentate per la maggior parte dei casi da episodi asintomatici nel corso del primo trimestre, la cui incidenza può raggiungere oltre il 6% e il cui trattamento razionale rappresenta uno dei capitoli più controversi della patologia urogenitale.
E' inoltre noto che gli enterobatteri annidati nel vestibolo vaginale possono facilitare l'insorgenza e il ripetersi di IVU e talvolta innescare un meccanismo a "ping-pong" tra infezione vaginale e IVU.
Se l'incidenza di IVU nei maschi è ridotta rispetto alle donne per motivi soprattutto anatomici, tale evidenza si riduce con gli anni, in quanto con l'età più avanzata può esserci la tendenza alla comparsa di un'uropatia ostruttiva essenzialmente dovuta a ipertrofia prostatica e la presenza di un ristagno vescicale di urine (evidenziato dal residuo vescicale postminzionale all'esame urografico) che predispone indubbiamente all'infezione. Talora, tuttavia, anche in assenza di ristagno o di ostruzioni al deflusso delle urine si possono avere anche nell'uomo infezioni ricorrenti o persistenti, così come sono frequenti i casi di IVU da reflusso vescico-ureterale.

Agenti eziologici

Nelle linee guida dell'European Confederatio of Laboratory Medicine (ECLM) – European Urinalysis Group[2] viene proposta una classificazione degli agenti eziologici di IVU in base alla loro potenziale uropatogenicità, con la fondamentale premessa che tale classificazione di patogenicità è comunque sempre subordinata alla situazione clinica del paziente.
Vengono così distinti due principali gruppi di microrganismi, che i microbiologi sono soliti definire genericamente **patogeni convenzionali**, suddivisi in: patogeni primari, quali *Escherichia coli* e *Staphylococcus saprophyticus* e patogeni secondari, tra i quali

Enterococcus spp., Proteus spp., Pseudomonas aeruginosa, S. aureus e tutto il gruppo *KES* (*Klebsiella spp., Enterobacter spp., Serratia spp.*).
Un terzo gruppo è rappresentato dai microrganismi che si è soliti definire **patogeni condizionali**, quali ad esempio i miceti lievitiformi, lo *Streptococcus agalactiae* o di gruppo B, gli stafilococchi coagulasi negativi, *Pseudomonas spp. e Stenotrophomonas maltophilia*, mentre in un quarto gruppo sono compresi i microrganismi considerati sicuramente contaminanti, quali ad esempio i difteroidi e i lattobacilli.
Nella Tabella 1 sono riassunti i principali agenti eziologici messi in evidenza dalla nostra Unità in un biennio: trattasi di ceppi microbici la cui frequenza di isolamento ricalca in maniera pressochè sovrapponibile i dati della letteratura internazionale: infatti, *Escherichia coli* rappresenta il ceppo maggiormente isolato, a conferma della sua particolare uropatogenicità.
Seguono in percentuale le infezioni sostenute dagli *Enterococchi*, implicati spesso anche nell'eziologia delle prostatiti e di grande rilevanza soprattutto per la notevole resistenza espressa nei confronti della maggior parte dei farmaci antimicrobici.
Tra gli altri batteri gram negativi di provenienza intestinale, *Proteus sp., Klebsiella sp., Enterobacter sp., Serratia sp., Pseudomonas aeruginosa* costituiscono un ampio gruppo chiamato in causa, insieme agli *Enterococchi*, nella genesi delle IVU opportunistiche e croniche, nonché nelle infezioni recidivanti in pazienti cronici o nei pazienti ospedalizzati o domiciliati sui quali vengano eseguite ripetute manovre strumentali.
Da notare la discreta percentuale di casi di isolamento di *Streptococcus agalactiae* o di gruppo B, patogeno condizionale delle vie urinarie, la cui origine nella donna è quasi sempre da ricercare a livello vaginale, e il cui ruolo controverso nella genesi di malattia infettiva delle vie urinarie necessita, per essere inquadrato correttamente, di precise notizie cliniche e anamnestiche.
Negli ultimi anni, inoltre, stanno assumendo una crescente evidenza le infezioni da Stafilococchi, genere che a sua volta sottende diverse specie, più o meno equamente distribuite percentualmente tra gli isolati, quali *Staphylococcus aureus e Staphylococcus saprophyticus*, patogeni convenzionali, *e Staphylococcus epidermidis e Staphylococcus hominis*, patogeni condizionali, che insieme si attestano mediamente intorno al 5% degli isolati: un risultato per certi versi atteso e con tendenza all'incremento, vista l'importanza sempre maggiore delle patologie stafilococciche soprattutto nella popolazione anziana con patologie croniche (anch'esse in netto aumento) e in pazienti defedati e/o cateterizzati.
Infine, in determinate situazioni, quali ad esempio una protratta terapia antibiotica, o in pazienti diabetici e/o immunodepressi, è possibile isolare dalle vie urinarie anche miceti lievitiformi come *Candida spp*.

Appropriatezza della domanda e controversie analitiche

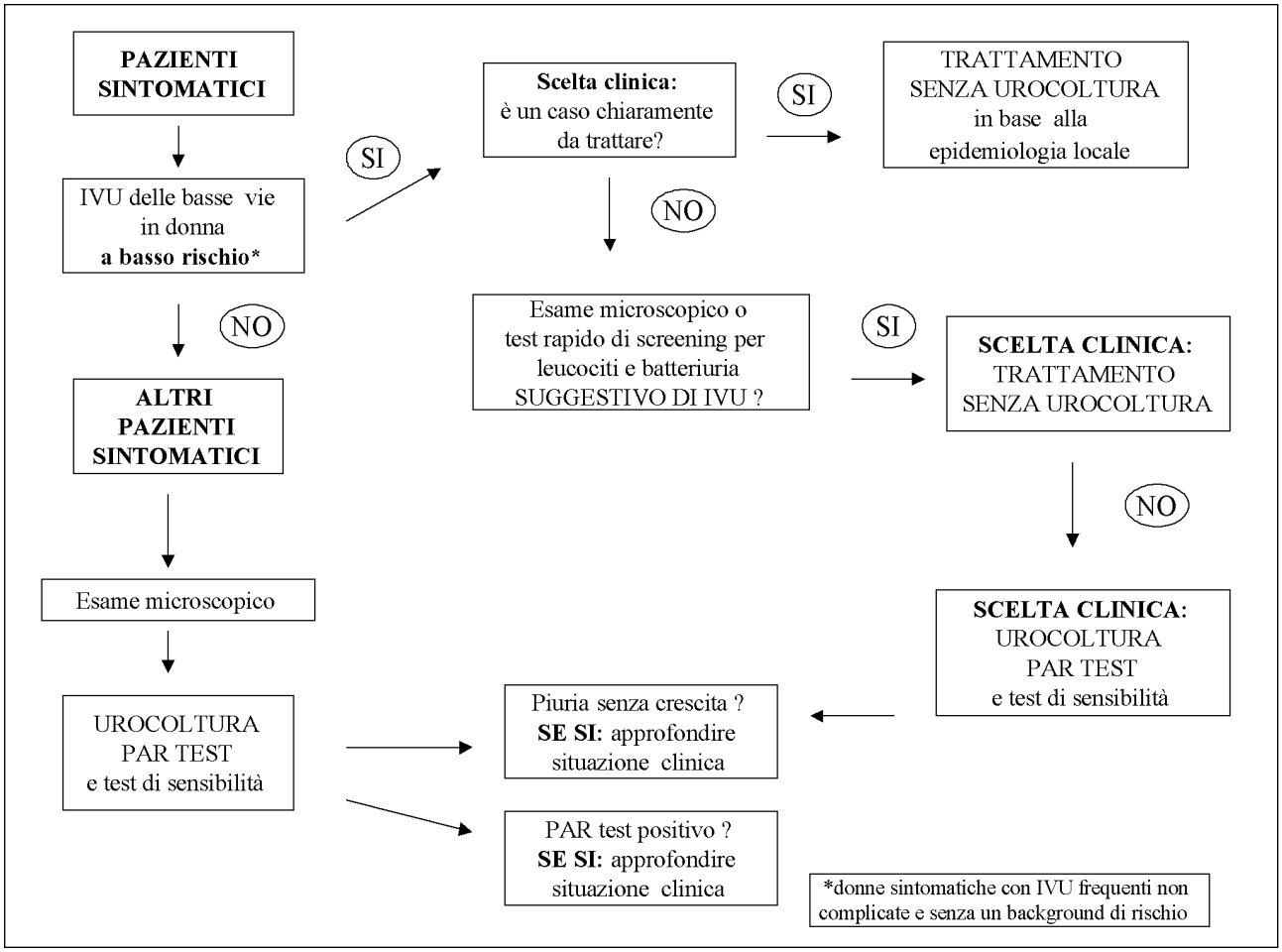
Lo scopo dell'esame colturale dell'urina consiste nel rilevare l'agente eziologico di un'infezione delle vie urinarie e di misurarne la concentrazione. Esso consente inoltre di fornire un test di sensibilità agli antimicrobici sul ceppo isolato e di seguire eventualmente l'evoluzione della malattia o l'esito del trattamento antibiotico prescritto.
Consente infine di rilevare l'eventuale presenza di antibiotico nell'urina attraverso l'esecuzione del PAR test, esame ormai considerato parte integrante della diagnostica infettivologica di routine delle vie urinarie e che consente talora di giustificare una piuria in assenza di crescita batterica.
Da un punto di vista strettamente clinico, come evidenziato anche nelle Figure 1 e 2, non è sempre necessario ricorrere all'esame colturale quando si sospetti un'infezione delle vie urinarie: per questo motivo è razionale pensare di distinguere in primo luogo quando si debba e quando non si debba ricorrere a questo presidio diagnostico e come si possa procedere secondo razionali analisi di flusso.

Tabella I. Incidenza di ceppi isolati nelle urinocolture nel biennio 2000/2001 in pazienti esterni e ospedalizzati

Ceppi maggiormente isolati	% Esterni 2000	% Esterni 2001	% Ospedale 2000	% Ospedale 2001
Escherichia coli	58.8	54.9	58	52.6
Enterococchi	12.3	14.6	13.5	15.3
Streptococcus gruppo B	9.2	6.7	8.1	6.0
Proteus spp.	6.3	8.1	5.0	7.0
Gruppo KES (Klebsiella, Enterobacter,Serratia)	4.7	6.5	6.4	7.2
Stafilococcus spp.	4.2	4.8	5.6	5.7
Pseudomonas aeruginosa	0.7	2.0	1.5	3.4
Candida spp.	1.5	2.8	1.4	2.9

Le Figure 1 e 2 rappresentano una rielaborazione degli schemi dell'ECLM- European Urinalysis Group[2], relativi all'appropriatezza della domanda di esami per la conferma di una sospetta IVU: nella valutazione è evidente il ruolo preponderante attribuito all'anamnesi e alla situazione clinica del paziente e il ruolo di filtro degli esami di screening di base, quale ad esempio l'esame microscopico.
Non c'è, peraltro, ancora una valutazione univoca in letteratura[3,4] su quale rappresenti il test di screening più idoneo per valutare il sospetto di IVU, anche se a nostro avviso si può ritenere che la rilevazione della batteriuria, unitamente alla quantificazione dei leucociti mediante esame microscopico, possa considerarsi ancora oggi il metodo di valutazione preli-

Figura 1. Analisi di flusso e razionale clinico-diagnostico in pazienti sintomatici con sospetto di IVU



minare più razionale e idoneo per indirizzare verso un sospetto di IVU.

Molti fattori possono influire sulla sensibilità e specificità dei metodi utilizzati per la diagnostica microbiologica delle IVU primo fra tutti la contaminazione pre-analitica, che può portare a una valutazione falsamente positiva dell'urinocoltura in mancanza di notizie cliniche[2,3].

Escludendo in questa sede considerazioni sulla corretta gestione delle varie procedure adottate per l'esecuzione dell'urocoltura (inoculo, identificazione batterica, antibiogramma), che implicitamente presuppongono un costante ed accurato controllo di qualità, sono fondamentalmente due gli elementi che maggiormente possono influire sulla corretta interpretazione dell'analisi colturale dell'urina: la gestione pre-analitica e la valutazione della carica microbica.

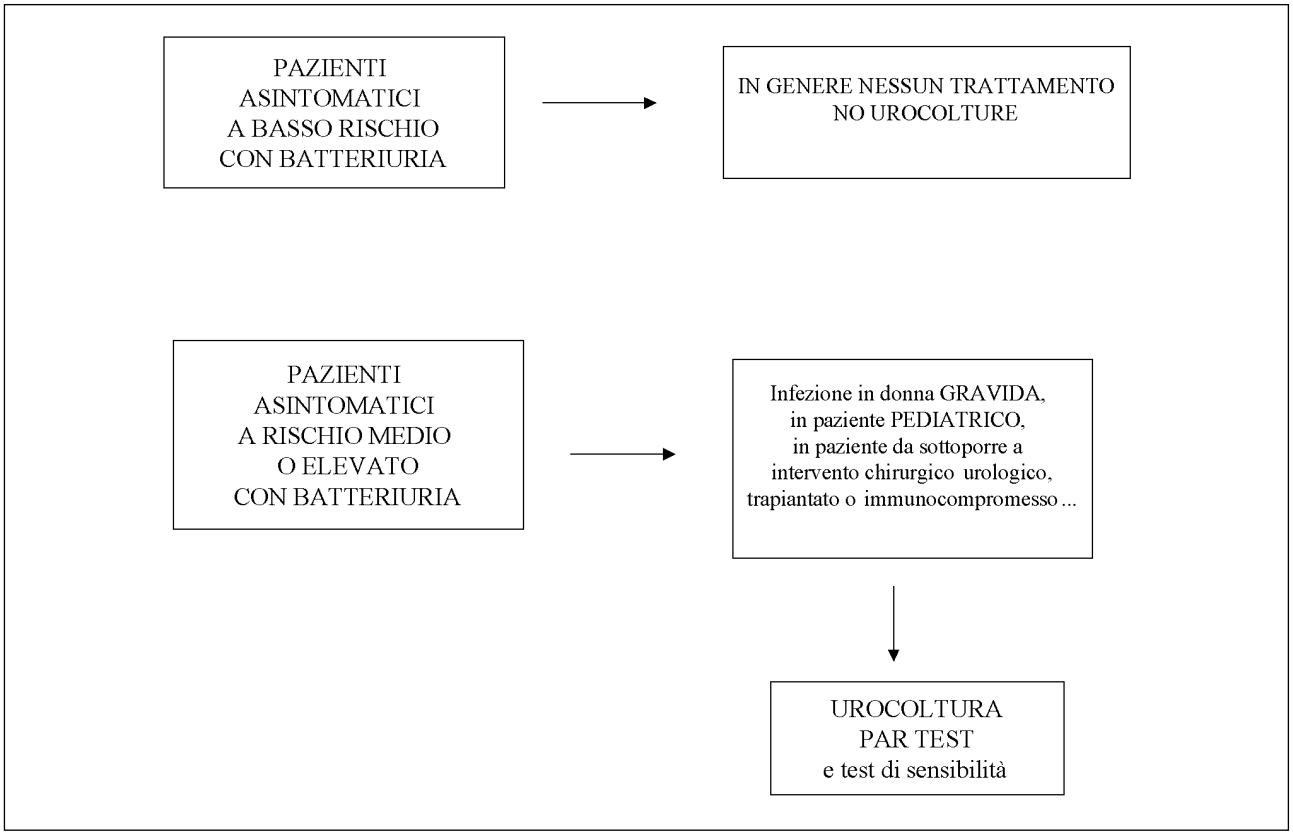
I due elementi spesso si correlano, in quanto ancora troppo spesso si tende a discriminare tra un campione più o meno significativo in base alla sola carica microbica rilevata. Ragionando in questi termini, una scorretta gestione della fase pre-analitica (dall'esecuzione della raccolta con "mitto intermedio" alla conservazione e al trasporto del campione) può trasformarsi già in un primo *pitfall*, il cui peso appare sempre più rilevante in relazione al fatto che oggi sempre più spesso l'organizzazione dei laboratori si muove verso una strutturazione in termini di *factory-like laboratory*[5], con una sempre più estesa concentrazione di campioni da centri-prelievo periferici verso un unico *core-laboratory*.

Da un punto di vista strettamente procedurale, credo si possa dunque oggi considerare in modo critico il criterio di valutazione quantitativa di Kass[6,7] e l'importanza di un valore soglia o *cut-off* come unico elemento per considerare un campione clinicamente significativo.

Tale criterio inoltre viene tanto più messo in discussione, quanto più ci si affida a una più corretta correlazione tra uropatogenicità del microrganismo isolato e carica rilevata, ma soprattutto quando si dia più spazio alla valutazione clinica del paziente, unitamente alla valutazione di altri parametri urinari, quali ad esempio la presenza di leucociti.

Proprio per valorizzare e rendere maggiormente sfruttabili dal microbiologo i vari parametri chimico-fisici e microscopici dell'urina, da qualche tempo si è cominciato a pensare di integrare e "consolidare" settori diversi della diagnostica urinaria[5,8], dall'esame chimico fisico all'esame colturale, in modo da migliorare l'inquadramento clinico del paziente con patologie infettive delle vie urinarie.

Figura 2. Analisi di flusso e razionale clinico-diagnostico in pazienti asintomatici con batteriuria



I criteri di Kass possono essere superati comunque da innumerevoli situazioni cliniche contingenti, organiche e/o funzionali, rappresentate ad esempio dai casi di batteriuria asintomatica, frequentemente rilevabile nei portatori di cateteri a permanenza, nelle anomalie ostruttive delle vie urinarie, in gravidanza o nelle bambine in età scolare. Ma l'importanza del concetto di carica può venire superato anche in senso opposto, come nel caso del bambino in età prescolare, dove cariche inferiori a 10^5 CFU/mL possono risultare talora molto significative e vanno correlate con la clinica e la presenza di leucociti nelle urine, o nel caso di giovani donne in età feconda con sindrome uretrale acuta, laddove una carica anche di 10^2 CFU/mL può risultare importante, soprattutto se in presenza di una concomitante piuria, richiedendo talora un approfondimento mediante l'esecuzione di tampone uretrale per la ricerca di *Chlamydie* e *Mycoplasmi*.

La stessa rilevazione di un PAR test positivo svincola il microbiologo dalla valutazione *sensu stricto* della carica, in quanto in questi casi anche la rilevazione di una ridotta concentrazione del microrganismo isolato deve indurre a procedere ugualmente verso la valutazione della sensibilità agli antimicrobici.

Secondo l'ECLM, riscontrare in pazienti sintomatici un patogeno primario con carica di 10^3 UFC/mL può già considerarsi clinicamente significativo; per un patogeno secondario il limite può essere invece individuato in un valore di 10^4 per le donne e 10^3 UFC/mL per l'uomo, mentre per i patogeni condizionali viene riferita una soglia intorno a 10^5 UFC/mL, quando essi siano presenti in coltura pura.

Anche dalle definizioni dell'ECLM appare evidente, dunque, che l'importanza della carica batterica come parametro discriminante può oggi apparire davvero superato dalla più razionale correlazione tra notizie anamnestiche e presenza di un determinato microrganismo nell'urina ad una determinata concentrazione.

Solo nei pazienti asintomatici, nei quali si sia proceduto comunque all'esame colturale, può ritenersi giustificato riferirsi ad un livello soglia di 10^5 UFC/mL, anche in considerazione di quanto si è detto a proposito dell'influenza negativa del fattore relativo alla scarsa qualità generale del campionamento con "mitto intermedio".

Tutte le urine, poi, che presentano cariche miste con oltre due ceppi, indipendentemente dalla carica rilevata, devono casomai essere ripetute per individuare l'eventuale agente eziologico sotteso e comunque vanno refertate in prima battuta con la definizione di "presenza di flora batterica da probabile contaminazione", così come non vanno clinicamente considerati tutti i microrganismi appartenenti al gruppo dei contaminanti propriamente detti.

Il concetto di carica e di *cut-off* appare per ultimo superato anche dal fatto che esso richiede una univocità interpretativa tra laboratori diversi che, come è noto, talora non esiste: gli stessi studi epidemiologici vengono spesso inficiati da un diverso

modo di valutare il livello di carica microbica significativa, venendo così a modificarsi anche il risultato epidemiologico e il confronto tra i risultati di centri diversi.

Ruolo clinico del referto microbiologico

Per quanto concerne l'esame colturale delle urine, da un punto di vista dell'appropriatezza della domanda, quanto sin qui detto evidenzia l'assoluta necessità di intendere la microbiologia sempre più in senso clinico e di inquadrare attentamente il paziente con IVU avendo a disposizione adeguate notizie anamnestiche per valutare clinicamente e criticamente il risultato analitico dell'esame colturale.
In questi termini, non credo che si possa intendere ancora l'urinocoltura come esame di screening, se non nei limitati casi mirati riferiti nella Figura 2. Questa definizione, infatti, si scontra con il razionale stesso della richiesta di esame microbiologico: l'indagine microbiologica, infatti, a differenza di molte altre indagini di laboratorio, deve presupporre sempre e comunque il sospetto di malattia da infezione.
Per questo motivo l'esame microbiologico dovrebbe essere sempre richiesto con un'adeguata motivazione clinica, possibilmente espressa in apposite schede di rilevazione anamnestica da accompagnare al campione.
Per quanto riguarda i test di screening preliminari per definire la strategia diagnostica da seguire in pazienti selezionati (gravide, bambini in età prescolare…) si fa sempre più pressante l'esigenza di "consolidare" la diagnostica microbiologica con la diagnostica microscopica e chimico fisica. Tale esperienza, già evoluta in altri Paesi[8], costituirà obiettivo prioritario del nostro Dipartimento per migliorare ulteriormente in futuro la qualità analitica del campione urinario.
Nel contesto dell'analisi microbiologica delle urine, gli strumenti automatizzati hanno contribuito a migliorare alcuni aspetti di gestione del campione e del referto e consentono di eseguire un PAR test automatizzato, ma sono affetti ancora da alcuni elementi di criticità e richiedono un'attenta valutazione costo/beneficio in relazione a ciascuna realtà operativa e in base alla numerosità dei campioni esaminati.
Per quel che riguarda, ad esempio, i metodi nefelometrici, essi consentono una risposta in tempi brevi dei campioni negativi in base a un *cut-off* predeterminato, ma al tempo stesso dilatano i tempi di semina dei campioni risultati positivi.
Gli strumenti dotati di semina automatizzata, invece, pur con i limiti della semina su *slide*, oltre a ridurre sensibilmente i tempi di allestimento del campione, consentono anche di migliorarne la qualità pre-analitica e di lavorare con un sistema chiuso, oltre a favorire contestualmente il trasporto, la conservazione e la semina di altri campioni microbiologici.
Entrambe i metodi hanno comunque un elevato costo operativo e per essere pienamente sfruttati in tutte le loro potenzialità richiedono una collocazione in un più ampio programma riorganizzativo del laboratorio di microbiologia, che passa attraverso l'informatizzazione del servizio e un più esteso programma di *paperless hospital*, costituito dal collegamento LIS con i reparti di degenza, ma soprattutto passa attraverso una diversa organizzazione del flusso di lavoro in microbiologia che consenta di lavorare in continuo.
Ciò che oggi viene richiesto a un moderno laboratorio di microbiologia per passare da una visione squisitamente "biologica" a una visione "clinica" della diagnostica consiste infatti essenzialmente in una maggiore velocità di refertazione[5].
Il flusso analitico in molte microbiologie è purtroppo ancora troppo laborioso e lento e la tendenza verso una maggiore velocità analitica è vista da molti microbiologi come elemento critico per garantire la qualità del risultato[5].
In realtà, l'incremento della velocità analitica non significa affatto una minore accuratezza, piuttosto invece esso rappresenta un nuovo e concreto apporto per poter incidere maggiormente su una migliore scelta terapeutica da parte del clinico[5,9].
Gli strumenti automatizzati per l'esecuzione dell'esame colturale delle urine, quelli dedicati all'identificazione dei microrganismi e all'antibiogramma e gli strumenti informatici di ultima generazione consentono oggi di raggiungere tempi di refertazione impensabili fino a pochi anni fa.
L'obiettivo primario della moderna microbiologia consiste perciò nello sfruttamento ottimale delle novità tecnologiche a disposizione e nella loro integrazione in un più ampio modello di riorganizzazione del laboratorio.
Refertare, infatti, un campione di urocoltura negativa in giornata senza poter al tempo stesso incidere in modo significativo sui tempi di refertazione dei campioni positivi e dei test di sensibilità non sortisce un concreto miglioramento dell'impatto clinico dell'esame microbiologico: è infatti clinicamente più significativo fornire nel più breve tempo possibile un risultato positivo piuttosto che un risultato negativo.
Uno degli obiettivi prioritari della nostra Unità negli ultimi tre anni è stato proprio finalizzato all'utilizzo dell'automazione contestualmente alla revisione dei flussi analitici secondo turni di lavoro sette giorni su sette, mentre nell'immediato futuro il collegamento informatico esteso a tutti i reparti e l'estensione del lavoro su turni pomeridiani sarà in grado di ridurre in modo ulteriore il TAT indicato come ottimale dall'ECLM.
Solo infatti lavorando in modo continuativo e sfruttando a tempo pieno, per tutto il giorno e per tutta la settimana, le strumentazioni analitiche di ultima generazione e il mezzo informatico è possibile raggiungere e per certi aspetti addirittura migliorare i tempi di refertazione suggeriti dall'ECLM, mantenendo il tempo di identificazione da coltura pura per il 90% dei casi entro le 24 ore e dell'identificazione

da coltura mista per il 90% dei casi entro le 48 ore, riducendo al tempo stesso la refertazione dell'antibiogramma per il 90% dei casi entro le 30 ore anziché le 48 previste.

Bibliografia

1. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology Washington, DC: ASM Ed, 7ª edizione, 1999.
2. Kouri T, Fogazzi G, Gant G, Hallander H et al. European Urinalysis Guidelines. Scand J Clin Lab Invest 2000;60/231: 1-97.
3. Huicho L, Campos-Sanchez M, Alamo C. Metaanalysis of urine screening tests for determining the risk of urinary tract infection in children. Pediatr Infect Dis J 2002; 21: 1-11.
4. Kaplan RE, Springate JE, Feld LG. Screening dipstick Urinalysis: a time to change. Pediatrics, 1997; 100: 919-21.
5. Eldere JV. Models for change in clinical microbiology. Clin Microbiol Infect 2000; 6: 445-8.
6. Kass E. Asymptomatic infections of the urinary tract. Trans Assoc Am Phys 1956; 69: 59-63.
7. Kass E. Pyelonephritis and bacteriuria. Ann Intern Mede 1961; 56: 46-53.
8. Robinson A, Marcon M, Mortensen JE, Mc Carter YS et al. Controversies affecting the future practice of clinical microbiology. J Clin Microbiol 1999; 37: 883-9.
9. Nicolas-Chanoine MH. Future needs-diagnostic services. Clin Microbiol Infect 2000; 6: 423-5.