

In occasione del XXVIII Congresso Nazionale AMCLI, tenutosi a Stresa nel 1999, il Gruppo di Lavoro Malattie Sessualmente Trasmesse non AIDS (GLAMST) era uscito in pre-print con le “Linee-guida per le indagini diagnostiche microbiologiche nello studio delle infezioni uretro-cervico-vaginali”, pubblicate successivamente su *Microbiologia Medica* (vol. 14, numero 3, 1999).

Anche quest’anno, perseguendo il secondo degli obiettivi che si era proposto al momento della sua costituzione nel 1998, il GLAMST grazie al fattivo lavoro dei suoi componenti ha prodotto delle nuove linee-guida di interesse andrologico, le **“Linee guida per le indagini diagnostiche microbiologiche nello studio delle infezioni del tratto genito-urinario maschile”**.

L’uscita di queste nuove Linee guida in occasione del XXIX Congresso Nazionale AMCLI di Rimini, similmente a quanto era avvenuto l’anno scorso, vorrebbe segnare il prosieguo di una consuetudine che il GLAMST si propone di mantenere anche nel futuro e che si augura sia favorevolmente accolta dai Lettori.

Il Coordinatore
Gruppo di Lavoro Malattie Sessualmente Trasmesse non AIDS
Roberto Pozzoli

Il Segretario
Gruppo di Lavoro Malattie Sessualmente Trasmesse non AIDS
Anna Calì

Linee-guida per le indagini diagnostiche microbiologiche nello studio delle infezioni del tratto genito urinario maschile

Gruppo di Lavoro Malattie Sessualmente Trasmesse non AIDS (GLAMST)

Roberto Pozzoli, Barbara Suligo¹, Annamaria Cali², Pierangelo Clerici³, Alfonso Panuccio⁴, Riccardo Terramocci⁵, Aldo Gasponi⁶, Mario Rasso⁷, Giancarlo Cecchini⁸, Secondo Guaschino⁹, Maria Agnese Latino¹⁰, Patrizia Bordonaro¹¹, Enrico Magliano

Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Niguarda "Cà Granda", Milano

¹ Centro di riferimento MST, Istituto Superiore di Sanità, Roma

² Laboratorio Analisi Pluridisciplinare, Ospedale "S. Maria del Carmine", Rovereto (TN)

³ Laboratorio di Microbiologia, ASL Ospedale di Legnano, Milano

⁴ Laboratorio di Immunologia e Virologia, PMIP, Milano

⁵ Laboratorio Analisi, Ospedale Valduce, Como

⁶ Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Ospedale Bellaria, Bologna

⁷ Laboratorio Microbiologia e Virologia, USSL8, Vicenza

⁸ Servizio di Ginecologia, Casa di Cura "San Carlo", Paderno Dugnano (MI)

⁹ Istituto di Clinica Ostetrica e Ginecologica, Trieste

¹⁰ Laboratorio di Microbiologia, A. O. OIRM-Sant'Anna, Torino

¹¹ Laboratorio Microbiologia e Virologia, "La Piastra", Firenze

SUMMARY

Authors describe procedures for collection, transport and storage of samples of male genital tract, as semen, urethral, glans and prepuce swabs, urine and Stamey & Meares test. The microscopic, cultural and diagnostic researches are reported, underlining major pathogens and focussing the interpretation of the results. Diagnostic guidelines for urethritis, prostatitis, balanitis and infertile patients are described.

KEY WORDS

Guidelines, Male Genital Tact, Microbiological Diagnosis

INTRODUZIONE

Dall'inizio degli anni '70 la rilevanza delle malattie sessualmente trasmesse (MST) come causa di morbilità è andata aumentando in tale misura da indurre l'OMS a considerare il controllo delle MST una tra le dieci priorità di salute pubblica da realizzare entro il 2000.

Tale preoccupazione deriva dalle conseguenze che tali infezioni possono avere nei confronti della fertilità di coppia e dal rischio di contrarre l'infezione da HIV.

Anche nell'uomo, oltre la necessità di diagnosticare correttamente l'eziologia di affezioni a carico del sistema urogenitale sintomaticamente evidenti, diventa importante poter ricercare eventuali agenti patogeni che non esprimendo evidenti fenomeni patologici possono comunque essere fonte di trasmissione.

Le patologie che più frequentemente interessano l'apparato urogenitale maschile sono le uretriti, le balanopostiti, le prostatiti e le orchiepididimiti. Il loro decorso è per lo più sintomatico e la loro eziologia batterica non sempre risulta dimostrata.

Un problema a parte sono le indagini per infertilità e la preparazione alla fecondazione assistita, dove le ricerche microbiologiche spesso sono effettuate su pazienti asintomatici e dove tutti i germi isolati devono essere valutati attentamente circa la loro significatività.

I materiali su cui poter fare indagini microbiologiche dipendono dalla sede in cui si ritiene sia localizzata l'infezione e la loro idonea raccolta è presupposto fondamentale per una corretta diagnosi. Diventa altresì imperativo da parte del clinico formulare un preciso sospetto diagnostico e permettere quindi al microbiologo di guidare le indagini nel modo più idoneo.

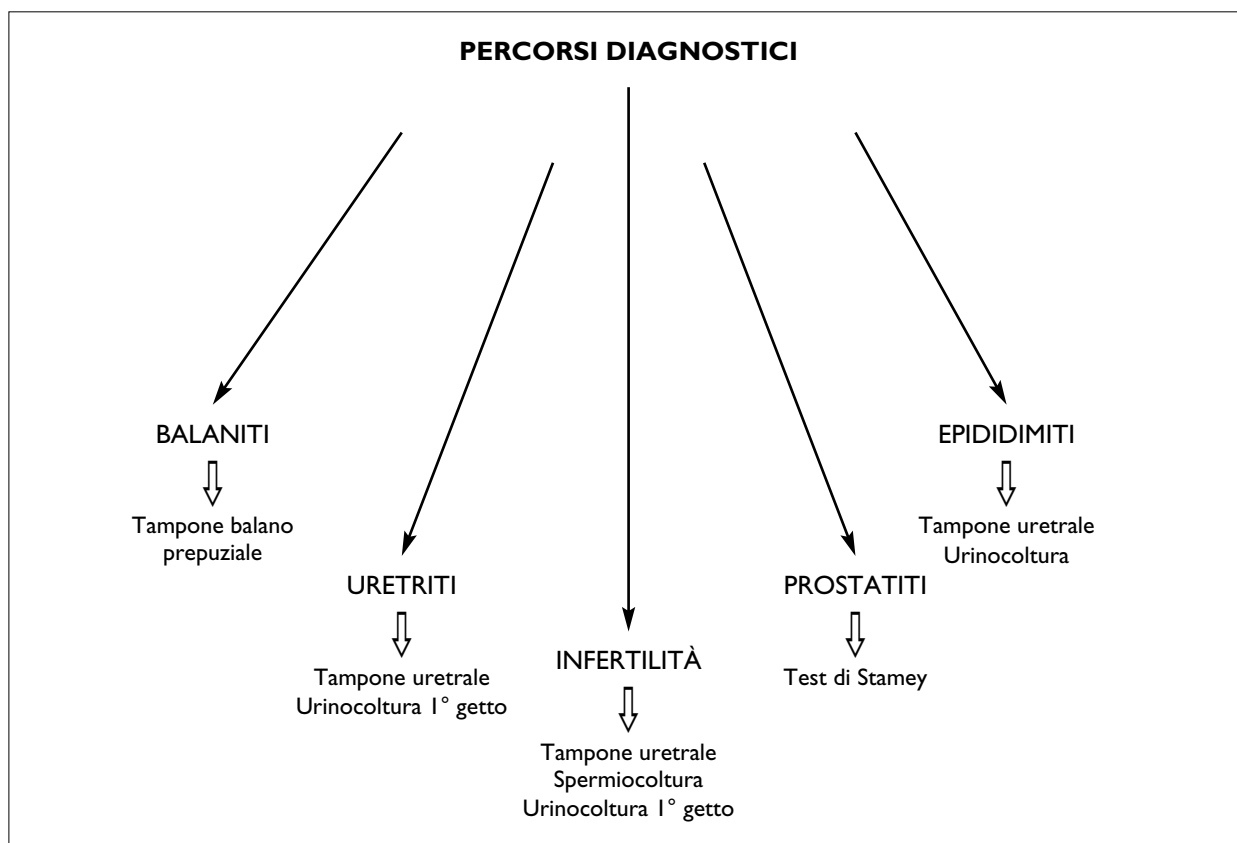


Figura I. Percorsi diagnostici.

I. TAMPONE URETRALE

I.1 Indicazioni per l'esecuzione

- Il tampone uretrale deve essere sempre eseguito in caso di secrezione purulenta o vischioso-filamentosa del meato uretrale con o senza sintomatologia dolorosa. Talvolta può essere presente solo sensazione di bruciore, soprattutto durante la minzione, senza nessuna secrezione.
- Il tampone dovrebbe essere eseguito anche nel caso in cui siano isolati nella partner microrganismi tipicamente responsabili di infezioni sessualmente trasmesse.
- Il tampone uretrale potrebbe essere utile anche nella ricerca dell'eziologia di una orchio-epididimite. **Non è indicato nella diagnosi delle prostatiti.**
- Altro motivo all'indagine sono gli screening per infertilità, dove solitamente il soggetto è assolutamente asintomatico.

I.2 Agenti eziologici

Nel caso di una sospetta uretrite uno degli agenti eziologici maggiormente coinvolti nel maschio sessualmente attivo è sicuramente *Chlamydia trachomatis* (23 – 55% delle uretriti non gonococciche). An-

che *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* giocano un ruolo nel determinismo di tali affezioni mentre per *Mycoplasma genitalium* i dati inerenti il suo coinvolgimento non sono ancora certi: la sua ricerca di routine potrebbe quindi non essere giustificata anche perché è effettuabile solo ricorrendo a tecniche di biologia molecolare.

Neisseria gonorrhoeae è un'altra importante causa di uretrite, anche se la sua prevalenza oramai mostra un trend in diminuzione nei paesi occidentali. *Trichomonas vaginalis* risulta solo raramente causa di uretriti e dovrebbe essere preso in considerazione soprattutto in caso di persistenza di sintomatologia.

Altri germi, più tipicamente responsabili di infezioni delle vie urinarie, o osservati al Gram con aumento di polimorfonucleati e associati a sintomatologia (*Haemophilus* spp, *Streptococcus* spp, etc...) possono essere ricercati, ma la loro significatività deve essere attentamente valutata prima di emettere un referto.

In caso di orchio-epididimite (infezione ascendente) i patogeni più frequenti sono *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* sotto i 35 anni, al di sopra di tale età più spesso sono chiamati in causa i comuni patogeni responsabili di infezioni del tratto urinario.

Tabella I. Terreni di coltura, microrganismi, temperatura, tempo di incubazione

TERRENO	MICROORGANISMI	ATMOSFERA DI INCUBAZIONE	TEMPERATURA DI INCUBAZIONE	TEMPO DI INCUBAZIONE
Agar Sabouraud	Miceti	Aerobiosi	37°C	48 h
Agar Sangue	Batteri aerobi	Aerobiosi	37°C	24 h
Agar <i>Gardnerella</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	5% CO ₂	37°C	48 h
Agar Thayer Martin	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5% CO ₂	37°C	48 h

1.3 Modalità di prelievo

I pazienti devono essere istruiti su alcune norme da rispettare e in particolare:

- astenersi dai rapporti sessuali nelle 24 ore precedenti l'esame,
- aver cessato qualsiasi trattamento chemio-antibiotico da almeno una settimana,
- non aver urinato nelle ultime 3 ore.

Nei casi in cui non sia evidente una secrezione è importante eseguire il tampone al mattino prima della minzione

Il prelievo deve essere effettuato con tamponi di piccolo calibro in nylon o Dacron e deve essere preceduto dalla detersione con soluzione fisiologica del glande e del meato uretrale esterno. Si procede premendo alla base del pene per cercare di raccogliere eventuale secrezione, in seguito si introduce il tampone per circa 2 cm all'interno del canale uretrale, ruotandolo per circa 10 secondi. Devono essere utilizzati tamponi diversi per ciascun tipo di esame, eseguendo i prelievi nel seguente ordine: esame microscopico, ricerca *Chlamydia trachomatis*, ricerca di Micoplasmi urogenitali, esami colturali.

1.4 Modalità di conservazione e di trasporto

- Per la ricerca di *Chlamydia trachomatis* i campioni devono essere raccolti con i sistemi messi a disposizione con le diverse metodiche e conservati seguendo le istruzioni corrispondenti.
- Per la coltura di *Mycoplasma/Ureaplasma* il tampone con il materiale raccolto deve essere stemperato nell'apposita provetta contenente il terreno di trasporto che può essere conservata a temperatura ambiente per 8 ore o a 2-8°C per 36 ore.
- Per l'esame colturale (batteri aerobi e miceti) il tampone, introdotto nell'apposito terreno di trasporto, deve essere inviato al laboratorio o conservato a temperatura ambiente fino ad un massimo di 24 ore.
- Per la coltura di *Neisseria gonorrhoeae* è consigliabile seminare il tampone subito dopo il prelievo su piastra di Agar Thayer Martin tenuta a temperatura ambiente (o meglio preriscaldata a 37°C), ed incubata immediatamente. In alternativa il tampone deve essere inviato al più presto in Laboratorio in apposito terreno di trasporto privo di glice-

rofosfato. Nel terreno di Stuart-Amies i gonococchi sopravvivono per 12 ore a temperatura ambiente. Una volta seminato, il terreno deve essere incubato a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5% per 48 h.

- Per la ricerca di *Trichomonas vaginalis* il tampone con l'essudato raccolto deve essere stemperato al più presto nell'apposito terreno di trasporto/coltura, preriscaldata a 37°C per 15', che deve essere inviato prontamente in laboratorio.

1.5 Esame microscopico

- Il vetrino per l'esame microscopico dopo colorazione va allestito facendo ruotare il tampone e lasciando asciugare il materiale all'aria. Il vetrino, asciugato e inserito nell'apposito contenitore di trasporto, può essere conservato a temperatura ambiente fino al momento della consegna in laboratorio. È opportuno che l'allestimento del vetrino venga effettuato al momento del prelievo e non dal tampone inviato in laboratorio. Il vetrino viene sottoposto a colorazione di Gram e osservato a 400x e a 1000x. La presenza di leucociti, di miceti e di specie microbiche, distinte su base morfologica e tintoriale al Gram, deve essere rilevata in modo semiquantitativo (+, ++, +++).

L'osservazione dei tipici diplococchi Gram negativi intracellulari è fortemente indicativo per gonorrea; tutti i casi presunti devono comunque essere confermati dalla coltura.

- È opportuno eseguire l'esame microscopico a fresco per la ricerca di *Trichomonas vaginalis* qualora non fosse possibile l'esame colturale. In tal caso il secreto deve essere raccolto con tampone e posto in una provetta contenente 1 ml di soluzione fisiologica mantenuta a 37°C. Il vetrino a fresco deve essere osservato subito al fine di evitare l'inibizione della mobilità di *Trichomonas* che, unitamente alla morfologia, rappresenta una delle caratteristiche specifiche di identificazione.

1.6 Esame colturale

1.6.a L'indagine microbiologica colturale su tampone uretrale è indirizzata alla ricerca di:

- *Miceti*
- *Microrganismi aerobi*
- *Neisseria gonorrhoeae*

- *Gardnerella vaginalis*
- *Micoplasmata uro-genitali*

Per la coltura di miceti, microrganismi aerobi, *Neisseria gonorrhoeae* e *Gardnerella vaginalis* il materiale viene seminato e incubato come riassunto nella tabella 1.

1.6.b Eventuali altri microrganismi osservati al Gram con aumento di polimorfonucleati e associati a sintomatologia (*Haemophilus* spp, *Streptococcus* spp etc.) andrebbero ricercati. **I microrganismi anaerobi non vanno ricercati di routine.**

1.6.c I sistemi di coltura per la ricerca di *Ureaplasma urealyticum* e di *Mycoplasma hominis* consistono in un terreno di trasporto/coltura in cui viene stemperato il tampone del prelievo. Tre gocce di questo terreno vengono seminate sul terreno solido A7 che sarà incubato a 37°C per 48-72 ore in anaerobiosi o in microaerofilia. Le provette contenenti il restante terreno possono essere conservate ancora qualche giorno in frigorifero o congelate a -80°C, in caso dovesse essere allestito un antibiogramma.

Un ulteriore metodo colturale prevede l'utilizzo di una galleria le cui cupole, contenenti i substrati di identificazione e gli antibiotici di profilo liofilizzati, vengono reidratate con il terreno di trasporto/coltura inoculato col campione da esaminare, ricoperte con olio di paraffina, per assicurare l'anaerobiosi, ed incubate a 37°C per 24 ore. Il passaggio in terreno liquido è giustificato dal fatto che le colture allestite in questo modo danno risultati migliori rispetto a quelle seminate direttamente su terreno solido (diluizione di eventuali inibitori, rottura dei complessi immuni, ecc.).

A queste tecniche si deve aggiungere la possibilità di un'indagine mediante PCR soprattutto indirizzata all'evidenziazione di quei micoplasmata genitali difficilmente coltivabili come *Mycoplasma genitalium* e *Mycoplasma fermentans*.

1.6.d Per la ricerca di *Trichomonas vaginalis* l'esame colturale rappresenta il "gold standard" per sensibilità e specificità.

L'essudato, raccolto con tampone sterile, deve essere seminato, immediatamente dopo il prelievo, in 5 ml di terreno specifico, CPLM *Trichomonas* broth con aggiunta di Streptomina (1000 µg/ml), Penicillina (1000 U/ml), Cloramfenicolo (50 µg/ml) e siero sterile di cavallo (50ml/l), preriscaldato a 37°C. L'incubazione va effettuata a 37°C per 5 giorni con un'osservazione microscopica a fresco giornaliera a partire dal secondo giorno d'incubazione.

1.7 Identificazione e antibiogramma

1.7.1 Qualsiasi *microrganismo aerobio* Gram positivo o Gram negativo presente in coltura pura deve essere identificato e saggiato per la resistenza agli antibiotici. Non si procede ulteriormente se la

coltura evidenzia tre o più batteri, in quanto questa flora polimicrobica potrebbe essere indice di contaminazione.

1.7.2 *Neisseria gonorrhoeae* – Dopo 24-48 ore di incubazione cresce su Agar Thayer-Martin formando colonie piccole, traslucide, di colore grigio-bianco, citocromo-ossidasi positive. La colorazione di Gram dimostra caratteristici diplococchi Gram-negativi. Queste caratteristiche permettono un'identificazione presuntiva di *N. gonorrhoeae*, ma sono sempre necessari test identificativi di conferma. È indispensabile eseguire, accanto all'antibiogramma, la ricerca della produzione di β-lattamasi.

1.7.3 *Gardnerella vaginalis* – Cresce sui terreni addizionati di sangue umano formando piccole colonie circondate da un alone di β emolisi ben evidente, catalasi negative. L'identificazione è basata sulle caratteristiche morfologico/tintoriali (coccobacilli Gram variabili). Come test di conferma è sufficiente la prova dell'idrolisi dell'ippurato, che si esegue nel seguente modo:

- 1) distribuire in una provetta 0.4 ml di acqua distillata sterile e aggiungere un dischetto di carta bibula imbevuto di ippurato di sodio,
- 2) stemperare un'abbondante ansata della coltura batterica in esame e agitare fino a formare una sospensione omogenea,
- 3) incubare la provetta in termostato o in bagnomaria a 37°C per 2 ore,
- 4) aggiungere, dopo incubazione, 0.2 ml di ninidrina (soluzione al 3.5% in acetone/butanolo) e agitare delicatamente,
- 5) reincubare la provetta per 15 minuti e leggere la reazione colorimetrica.

La reazione positiva che indica la produzione di ippurici è data dalla comparsa nella soluzione di un colore porpora-blu.

1.7.4 *Miceti* – Si deve procedere alla loro identificazione almeno con speciazione di *Candida albicans*. Un metodo estremamente semplice per riconoscere *Candida albicans* è il "germ-tube test" o test di filamentazione:

- 1) alcune colonie (5-6) cresciute su Sabouraud agar vengono stemperate in una provetta contenente 1 ml di siero,
- 2) dopo incubazione per 4 h a 37°C si procede all'osservazione microscopica: la presenza di "germ-tube" (piccoli filamenti protendenti dalla superficie della blastospora) consente la definizione di specie di *C. albicans*.

Per l'identificazione delle altre specie si può ricorrere all'utilizzo di terreni cromogeni, che permettono una rapida distinzione tra le specie di più comune riscontro in base al colore delle colonie, o a test di assi-

milazione degli zuccheri e di resistenza all'actidione. Attualmente sono disponibili in commercio sistemi miniaturizzati composti da microgallerie in cui sono presenti, in forma disidratata, i substrati da saggiare.

L'antimicogramma viene effettuato solo eccezionalmente se si è in presenza di infezioni ricorrenti particolarmente difficili da eradicare.

1.7.5 *Mycoplasma urogenitali* – La loro identificazione si basa sulle proprietà metaboliche (capacità di idrolizzare l'urea o l'arginina e di fermentare il glucosio) e sulla morfologia delle colonie.

Le dimensioni e l'aspetto delle colonie sul terreno solido A7 sono estremamente variabili. Sulla stessa piastra se ne possono trovare con diametro da 10 a 500 μ (devono essere osservate al microscopio), con aspetto omogeneo o irregolare. Esse vanno ricercate sui bordi delle cellule ed alla periferia della goccia di inoculo.

Nelle colonie di *Mycoplasma hominis* (M.h.) possiamo individuare due parti: una parte centrale otticamente più densa, che è il vero centro germinativo della colonia, dall'aspetto più o meno granuloso circondata da un anello periferico traslucido che conferisce l'aspetto tipico ad "uovo fritto". Questa parte si forma più tardi e può essere molto ridotta se il numero di colonie è particolarmente elevato. *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) forma delle colonie molto più piccole in cui questa zona chiara è rudimentale per cui è visibile solo la parte centrale più scura; si direbbe di vedere solo il "tuorlo dell'uovo". Il terreno solido A7 contiene oltre all'urea anche solfato di manganese perciò in seguito alla liberazione di ammoniaca, per idrolisi dell'urea, si forma dell'ossido di manganese che conferisce un colore marrone scuro-nero alle colonie rendendole facilmente identificabili, "a riccio di mare".

Il sistema di coltura in galleria utilizzato per i Micoplasmi permette la conta, identificazione e la determinazione della resistenza agli antibiotici. Il sistema si basa sulla capacità di U.u. e M.h. di metabolizzare rispettivamente l'urea e l'arginina. La loro crescita nel terreno liquido è visualizzata dal viraggio di un indicatore (rosso fenolo) da giallo-arancio a rosa-fucsia che esprime l'alcalinizzazione del brodo di coltura.

I campioni che contengono un numero molto elevato di U.u. e M.h. possono provocare il viraggio di tutti i pozzetti della galleria. Si raccomanda allora di procedere ad una diluizione del campione; in questi casi, per l'interpretazione della conta batterica bisognerà tener conto della diluizione effettuata.

La conta batterica (UCC /ml) è basata su un principio di cinetica enzimatica per cui la velocità di idrolisi dell'urea o dell'arginina da parte di U.u. o M.h. è proporzionale alla quantità di microrganismi contenuti nel campione. Degli antibiotici inseriti nel sistema tre (Lincomicina, Trimetoprim-sulfametossolo ed Eritromicina) hanno la funzione di identifica-

zione mentre gli altri tre (Doxiciclina, Roxitromicina e Ofloxacina) possono dare indicazioni sulle eventuali resistenze.

L'apparire di ceppi resistenti alle cicline ed ai macrolidi, soprattutto in casi di mancata eradicazione, rende l'antibiogramma indicativo. Questo può essere realizzato solo con terreni liquidi in gallerie tipo ATB o in micropiastre. La reazione utilizzata è una inibizione metabolica: quando il germe è sensibile all'antibiotico presente nel pozzetto, il suo metabolismo è inibito ed il terreno, che contiene come indicatore rosso fenolo, resta del colore di partenza. Se il germe è resistente cresce ed il terreno vira al rosso.

1.7.6 Ricerca di *Chlamydia trachomatis*.

La **coltura cellulare**, tradizionalmente considerata metodo di riferimento, è attualmente eseguita solo in pochissimi centri.

Le tecniche attualmente più diffuse sono quelle in Immunofluorescenza diretta o in Immunoenzimatica, l'Ibridazione mediante sonde e le metodiche di amplificazione genomica (PCR, LCR, SDA e TMA).

a) I **metodi in immunofluorescenza** utilizzano anticorpi monoclonali, rivolti verso le proteine del MOMPS e contro LPS di *Chlamydia trachomatis*, che permettono di mettere in evidenza i corpi elementari extra-cellulari (perfettamente rotondeggianti, di 300 nm e dalla brillante fluorescenza verde mela). Il prelievo viene strisciato su un vetrino per fluorescenza e dopo fissazione con acetone, messo a contatto con l'anticorpo monoclonale. Dopo incubazione a temperatura ambiente per 30', si procede con l'osservazione al microscopio a fluorescenza.

Questa tecnica ha il vantaggio di permettere una diagnosi rapida, anche se necessita di personale specializzato in grado di discriminare gli eventuali artefatti del preparato, ed è l'unica che permette di valutare l'idoneità del preparato. Infatti, in assenza di cellule epiteliali la negatività del reperto non deve essere presa in considerazione.

L'utilizzo dei due anticorpi monoclonali riduce la possibilità di falsi positivi dovuti alla cross-reattività con la proteina A di *Staphylococcus* spp. La sua sensibilità è abbastanza elevata se si considera il cut off positivo/negativo di 2 corpi elementari.

b) I **metodi immunoenzimatici** hanno il vantaggio di consentire una diagnosi in poche ore e di avere una sensibilità paragonabile a quella delle colture cellulari, senza i rischi legati ad eventuali contaminazioni delle stesse. Questi metodi hanno dimostrato sufficiente sensibilità e buona specificità per i tamponi uretrali, tuttavia il loro impiego sulle urine è stato limitato dalla scarsa sensibilità soprattutto sulle urine di soggetti asintomatici nelle quali è spesso presente un basso numero di microrganismi.

c) Le **tecniche di biologia molecolare** utilizzano

sonde di acidi nucleici per l'identificazione del microrganismo attraverso reazioni di ibridizzazione. Questi metodi altamente sensibili (85-100%) e specifici (98-100%), permettono di individuare anche un basso numero di copie di DNA batterico. Paragonata a questi metodi, la coltura cellulare ha una sensibilità del 70-85% ed i metodi enzimatici del 60-80%.

I vantaggi di questi metodi sono costituiti soprattutto dall'elevata sensibilità e specificità nonché dalla possibilità di poter eseguire il test su di un campione di urine che rappresenta un metodo non invasivo rispetto al tampone uretrale.

Gli svantaggi sono legati all'impossibilità di differenziare i microrganismi vivi da quelli morti e dalla relativa complessità.

I limiti che questi metodi evidenziavano, dovuti al costo elevato, alla relativa complessità tecnologica ed alla suscettibilità ai fenomeni di contaminazione con risultati falsamente positivi sono stati risolti dalla loro standardizzazione e dall'introduzione in commercio di test con costo decisamente contenuto e con una manualità notevolmente semplificata.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Questa metodica si basa sulla capacità degli acidi nucleici denaturati a singola catena di appaiarsi in modo specifico con sequenze complementari di DNA sintetiche (primers) che innescano e dirigono la sintesi di una catena complementare per mezzo di una DNA polimerasi. Ad ogni ciclo di PCR raddoppia il numero di molecole di DNA bersaglio che potranno poi essere rivelate con metodi tradizionali.

Ligase Chain Reaction (LCR)

Il bersaglio della LCR è localizzato all'interno del DNA plasmidico di *Chlamydia trachomatis* e rappresenta una sequenza breve, altamente conservata in tutti i sierotipi.

La LCR può essere usata per la diagnosi delle infezioni da *Chlamydia trachomatis* in tamponi uretrali o su campioni di urine aprendo, quindi, possibilità di screening non invasivo su popolazioni selezionate. I prelievi devono essere eseguiti con il kit fornito dalla ditta produttrice. I campioni possono essere conservati per 4 giorni a temperatura ambiente prima di essere analizzati o a -20°C per 60 giorni.

Strand Displacement Amplification (SDA)

Ciò che differenzia questa metodica dalle altre è la possibilità di effettuare il ciclo di amplificazione in condizioni isoterme (52 °C), unitamente alla possibilità di rilevare in tempo reale l'avvenuta amplificazione.

La DNA polimerasi può svolgere in simultanea due operazioni: da un lato la sintesi del nuovo DNA attraverso la copiatura dello stampo, dall'altro sposta

il filamento DNA complementare sintetizzato nel ciclo precedente (SDA = strand displacement amplification).

Transcription Mediated Amplification (TMA-Gen Probe)

La metodica TMA utilizza l'RNA ribosomiale (RNAr) come bersaglio, l'Hybridization Protection Assay (HPA) per la rivelazione ed il TMA per l'amplificazione.

L'utilizzo dell'RNAr come bersaglio rende il test molto sensibile in quanto l'RNAr è presente in migliaia di copie nelle cellule batteriche. La sensibilità è ulteriormente aumentata grazie al metodo HPA che sfrutta l'elevata sensibilità della chemiluminescenza. L'amplificazione TMA è isoterme, realizzabile in un qualsiasi incubatore, sufficientemente sensibile da rivelare una singola copia di DNA o di RNA bersaglio in un campione clinico e con una cinetica molto rapida.

I principali vantaggi di questo metodo possono essere così individuati:

- maggiore sensibilità utilizzando, come bersaglio, l'abbondante RNAr;
- amplificazione esponenziale ad un'unica temperatura;
- tutte le fasi del test avvengono in un'unica provetta e senza procedimenti di lavaggio. Questo minimizza ulteriormente il rischio di contaminazione e di falsi positivi.

2. SPERMIOCOLTURA

2.1 Indicazioni per l'esecuzione

L'esame di per sé non sembra rientrare nella diagnostica delle infezioni sessualmente trasmesse propriamente dette. Peraltro agli ambulatori MTS accedono anche pazienti con tali problematiche per cui riteniamo che sia doveroso dare delle indicazioni anche per tale richiesta.

L'esame non è indicato per la diagnosi di prostatite batterica, né per la diagnosi di orchio-epididimite.

L'esame culturale del liquido seminale riconosce una sua utilità in corso degli screening per l'infertilità e come esame di preparazione alla fecondazione assistita. Nell'ottica dello screening dell'infertilità, la ricerca deve essere estesa a tutti i microrganismi che potenzialmente possano creare alterazioni del liquido seminale.

2.2 Agenti eziologici

Oltre ai comuni patogeni delle infezioni sessualmente trasmesse come *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma/Ureaplasma*, *Trichomonas vaginalis* Gardnerella *vaginalis*, numerosi lavori hanno correlato la pre-

Tabella 2. Terreni di coltura, microrganismi, temperatura, tempo di incubazione

TERRENO	MICROORGANISMI	ATMOSFERA DI INCUBAZIONE	TEMPERATURA DI INCUBAZIONE	TEMPO DI INCUBAZIONE
Agar Sabouraud	Miceti	Aerobiosi	37°C	48 h
Agar Sangue	Batteri aerobi	Aerobiosi	37°C	24 h
Agar <i>Gardnerella</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	5% CO ₂	37°C	48 h
Agar Cioccolato	Altri	5% CO ₂	37°C	48 h

senza dei più svariati microrganismi (*Enterobacteriaceae*, Enterococchi, Stafilococchi, *Pseudomonas* spp, *Haemophilus* spp, Anaerobi e *Candida* spp) con l'aumento della viscosità del liquido seminale e la variazione di motilità degli spermatozoi ed altri parametri dell'ejaculato.

2.3 Modalità di prelievo

I pazienti devono essere istruiti su alcune norme da rispettare e in particolare:

- astenersi dai rapporti sessuali nei 3-4 giorni precedenti l'esame,
- aver cessato qualsiasi trattamento chemio-antibiotico da almeno una settimana.

È altrettanto importante, inoltre, che i pazienti vengano adeguatamente informati sulla corretta modalità di prelievo del campione, al fine di garantire la sterilità del materiale. Per evitare la contaminazione da parte della normale flora batterica cutanea, il prelievo deve essere preceduto da un'accurata pulizia dei genitali esterni e delle mani. L'utilizzo di un antibatterico per la pelle, composto da clorexidina al 4% e/o di povidone-iodio al 10%, dopo un lavaggio normale, aumenta la significatività dell'agente batterico isolato.

La raccolta del liquido seminale deve avvenire mediante masturbazione e tutto l'ejaculato deve essere raccolto nell'apposito contenitore sterile.

Per la ricerca di *Chlamydia trachomatis*, non potendo essere effettuata su liquido seminale, è necessario procedere alla raccolta del **primo getto di urina** in un apposito contenitore sterile. Si precisa che il paziente non deve aver urinato da almeno 3 ore e che il campione di urina deve essere raccolto prima di quello di liquido seminale. È opportuno eseguire le diverse ricerche microbiologiche contemporaneamente sia sul primo getto urinario sia sullo sperma al fine di poter meglio differenziare un'infezione delle vie urinarie da una delle vie seminali.

Avere a disposizione il primo getto urinario permette inoltre di poter effettuare anche la ricerca di *Trichomonas vaginalis* e di *Neisseria gonorrhoeae* (previa centrifugazione) difficilmente isolabili dallo sperma data la presenza di sostanze inibenti.

Il materiale da analizzare deve pervenire in laboratorio entro un'ora dalla raccolta e, se ciò non fosse possibile, si procede alla raccolta dei campioni nei locali messi a disposizione dal laboratorio.

2.4 Esame colturale

L'indagine microbiologica colturale su liquido spermatico è indirizzata alla ricerca di:

- *Miceti*
- *Microrganismi aerobi*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Micoplasmi*

Per la coltura di miceti, microrganismi aerobi e *Gardnerella vaginalis* 1 ml di sperma viene diluito 1:10 con soluzione fisiologica sterile e centrifugato a 1500 giri per 15'. Dopo aver eliminato il surnatante si semina il sedimento utilizzando anse calibrate da 10 µl. Tale trattamento aumenta la sensibilità dell'esame colturale, perché concentra nel pellet cellulare i batteri ed elimina il plasma seminale che potrebbe esercitare un effetto inibitorio sulla crescita batterica. I terreni di coltura utilizzati, le condizioni e i tempi di incubazione sono riassunti nella tabella 2.

I terreni di coltura utilizzati per la ricerca di *Ureaplasma urealyticum* e di *Mycoplasma hominis* sono gli stessi descritti a proposito dei tamponi uretrali.

2.5 Identificazione e antibiogramma

Valgono, in linea di massima, le stesse indicazioni fornite riguardo ai tamponi uretrali.

Qualsiasi *microrganismo aerobio* Gram positivo o Gram negativo presente in conta maggiore di 10³ UFC/ml deve essere identificato e saggiato per la resistenza antibiotica. Non si procede ulteriormente se la coltura evidenzia tre o più batteri, in quanto questa flora polimicrobica potrebbe essere indice di contaminazione.

Per quanto riguarda l'isolamento dei Micoplasmi urogenitali, l'incubazione deve essere protratta per 72 h al fine di mettere in evidenza anche cariche minime di questi microrganismi

2.6 Ricerca di *Chlamydia trachomatis*

La ricerca di viene effettuata sul primo getto di urina, raccolta al mattino o almeno dopo tre ore dall'ultima minzione, e preventivamente diluita e trattata secondo le indicazioni fornite dalle ditte produttrici dei test diagnostici.

3. TEST DI MEARES-STAMEY

La sintomatologia prostatica più frequente è la prostatodinia, accompagnata o meno da disturbi della minzione. I sintomi a carico della vie seminali possono comprendere dolore e tensione testicolare. In entrambi i casi può essere presente emospemia.

Le **prostatiti acute** sono quasi sempre riconducibili ad una infezione batterica ed i patogeni coinvolti sono i tipici microrganismi del tratto urinario: **il test di Stamey non è assolutamente da eseguire per l'accertamento di tale patologia.**

Le **prostatiti batteriche croniche**, caratterizzate dal riscontro di patogeni in numero significativo in assenza di concomitante infezione delle vie urinarie sono sostenute principalmente da *E. coli* e altre *Enterobacteriaceae* ed Enterococchi. Il ruolo di altri microrganismi Gram positivi è ancora controverso.

Esistono forme di **prostatite non batterica** (costituiscono la più comune sindrome prostatica), in cui esistono segni di infiammazione prostatica, ma dove non è possibile evidenziare nessuna eziologia batterica. In queste forme è stata chiamata in causa ora *Chlamydia trachomatis*, ora i Micoplasmi urogenitali senza però avere mai avuto dei riscontri precisi sulla loro eziologia.

I pazienti infertili sono per lo più asintomatici, ma possono presentare anomalie del liquido seminale di varia natura.

Il test di Stamey è in grado di definire, tramite una raccolta frazionata, la localizzazione prostatica di una infezione della sfera genitale maschile.

Il test tradizionale prevede che sia raccolta l'urina prima e dopo massaggio prostatico e venga fatta una valutazione quantitativa della crescita batterica per definire la provenienza dei germi isolati.

Si segnala la presenza in letteratura di alcune varianti.

3.1 Modalità di prelievo

- Il paziente deve avere la vescica piena, non deve aver eiaculato da 2 giorni e non essere in terapia antibiotica da 1 mese,
- non devono essere presenti segni di prostatite acuta né di sospetta patologia neoplastica,
- far raccogliere i primi 10 ml di urina (VB1) e successivamente altri 10 ml di urina (VB2),
- eseguire un prolungato massaggio prostatico ad entrambi i lobi della ghiandola,
- raccogliere la secrezione prostatica cercando di favorirne la fuoriuscita dal meato uretrale premendo dalla base del pene fino al glande (EPS),
- raccogliere, a questo punto, 10 ml di urina (VB3) dicendo al paziente di svuotare successivamente la vescica.

3.2 Esame microscopico

Una goccia di EPS viene sottoposta a colorazione di Giemsa: la presenza di oltre 10 leucociti per campo microscopico (400x) e/o la presenza di aggregati leucocitari è indicativo per diagnosi di prostatite.

Una carica batterica nell' EPS e VB3 superiore almeno 10 volte quella del VB1 e VB2 fa presupporre una provenienza prostatica dei germi isolati.

Una carica più elevata nel VB2 rispetto al VB3 fa presupporre una batteriuria che dovrà essere trattata con farmaci tipo la nitrofurantoina che non penetra a livello prostatico e ripetere il test.

3.3 Esame colturale

I campioni raccolti devono essere seminati nel più breve tempo possibile su terreni selettivi e non, previa diluizione 1:100 in fisiologica sterile ed inoculando per spatolamento 100 µl.

Per la ricerca di miceti, microrganismi aerobi, *Gardnerella vaginalis* e Micoplasmi urogenitali valgono le stesse indicazioni fornite riguardo la spermicoltura.

3.4 Identificazione, antibiogramma e ricerca *Chlamydia trachomatis*

Valgono le stesse indicazioni fornite riguardo la spermicoltura.

4. URINOCOLTURA

Ai fini della diagnostica delle infezioni a trasmissione sessuale nell'uomo l'esame colturale delle urine può essere utile qualora non sia possibile raccogliere altri materiali per scarsa collaborazione del paziente o altre problematiche.

La coltura del mitto intermedio e del primo mitto può essere di aiuto nei pazienti con orchiepididimite soprattutto nei soggetti sopra i 35 anni dove l'eziologia deve essere ricercata soprattutto tra i patogeni comuni delle vie urinarie. Nelle prostatiti acute, dove il massaggio prostatico è altamente controindicato e dove la causa più frequente sono patogeni delle vie urinarie, la coltura del mitto intermedio è raccomandata.

5. TAMPONE DA SOLCO BALANO-PREPUZIALE

5.1 Indicazioni per l'esecuzione

Le **balaniti** sono definite come stati infiammatori della mucosa del glande che può interessare anche il prepuzio (**balanopostiti**). La loro frequenza relativamente elevata può essere spiegata dalla stessa anatomia, trattandosi di zona cutanea sottoposta a sfregamento e macerazione.

5.2 Agenti eziologici

L'eziologia delle balaniti è estremamente varia e le cause infettive rivestono un ruolo di primo piano soprattutto nelle forme acute. I microrganismi più frequentemente chiamati in causa sono:

- *Candida albicans*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Streptococchi gr. A e B*
- *Staphylococcus aureus*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Anaerobi (raramente)*
- *Herpes simplex (HSV)*
- *Papillomavirus (HPV)*

In caso di lesioni purulente, la balanite potrebbe essere secondaria ad un'infezione uretrale che rischia di passare inosservata; queste balaniti sono spesso localizzate a livello del meato. Il prelievo può mettere in evidenza *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* o altri microrganismi quali Micoplasmi urogenitali o *Chlamydia trachomatis*. La balanite associata a *Chlamydia* ha spesso una tendenza emorragica.

Se sono presenti lesioni ulcerative devono essere prese in considerazione indagini sierologiche per la sifilide.

5.3 Modalità di prelievo

Il prelievo deve essere effettuato con tamponi in nylon o Dacron dal solco balano-prepurziale. Devono essere utilizzati tamponi diversi per ciascun tipo di esame.

Il paziente non deve aver effettuato terapia antibiotica o antimicotica topica o sistemica da almeno 3-4 giorni.

5.4 Modalità di conservazione e di trasporto

Vale quanto descritto a proposito del tampone uretrale.

5.5 Esame colturale

Per la coltura di miceti, microrganismi aerobi, *Neisseria gonorrhoeae* e *Gardnerella vaginalis* il materiale viene seminato e incubato come riassunto nella tabella 1.

I terreni di coltura utilizzati per la ricerca di *Ureaplasma urealyticum* e di *Mycoplasma hominis* sono gli stessi descritti a proposito dei tamponi uretrali.

5.6 Identificazione e antibiogramma

Valgono, in linea di massima, le stesse indicazioni fornite riguardo ai tamponi uretrali.

Per la ricerca di HSV e di HPV si rimanda alle procedure diagnostiche delle infezioni virali.

Per una più completa gestione microbiologica degli accertamenti è fondamentale la compilazione di una scheda di richiesta che accompagni i materiali da esaminare e di una refertazione dettagliata (Figura II).

6. SUGGERIMENTI PER LA REFERTAZIONE DEGLI ESAMI

6.1 La refertazione dovrebbe essere la più semplice e chiara possibile e soprattutto uniformata affinché i dati prodotti possano essere confrontabili con altri laboratori ed entrare in un circuito informatico che permetta una elaborazione a livello, possibilmente, nazionale.

6.2 La refertazione dovrà riportare la valutazione della componente flogistica (presenza di polimorfonucleati) espressa in + e il risultato della ricerca di *Neisseria gonorrhoeae*, di *Chlamydia trachomatis* e di *Mycoplasma spp*, *U.urealyticum*.

6.3 Deve essere specificato il metodo con cui la ricerca è stata effettuata.

6.4 È possibile prevedere in calce al referto un breve commento esplicativo.

6.5 In caso di positività per *Neisseria gonorrhoeae* va refertato l'antibiogramma e il risultato del test della β -lattamasi.

6.6 In caso di positività per *Mycoplasma spp*, *U. urealyticum* va refertato l'antibiogramma.

6.7 La refertazione di altri possibili patogeni deve essere fatta solo in caso di una loro significatività patognomonica. Qualora risultasse significativo l'isolamento di un altro germe potenzialmente patogeno è opportuno refertare il relativo antibiogramma.

BIBLIOGRAFIA

1. 1998 Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Diseases MMWR 47 (RR-1); 1-118.
2. Aynaoud O, Bijaoui G, Casanova JM, Poveda JD. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* among men consulting in urology. Comparative study between cell culture and sperm PCR J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 1996; 25 (5): 479-84.
3. Berger R, Kessler D, Holmer KK. Etiology and manifestations of epididymitis in youngmen: correlations with sexual orientation. J Infect Dis 1987; 155: 1341-3.
4. Brunner H, Weidner W, Schiefer HG. Studies of the role of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma Hominis* in prostatitis. J Infect Dis 1993;147: 807-7.
5. Burstein GR; Zenilman JM. Nongonococcal urethritis - a new paradigm. Clin Infect Dis 1999 Jan; 28 Suppl 1: S66-73.
6. Doble A, Thomas BJ, Walker MM, et al. The role of *Chlamydia trachomatis* in chronic abacterial prostatitis: a study using ultrasound guided biopsy. J Urol 1989;141: 332-3.
7. Egan KJ, Krieger JL. Chronic abacterial prostatitis a urological chronic pain syndrome? Pain 1997; 69: 213-8.
8. Hoosen AA, O'Farrell N, Van den Ende J. Microbiology of acute epididymitis in a developing country. Genitoruim Med 1993;69: 361-3.
9. Horner PJ, Gilroy CB, Thomas BJ, et al. Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis. Lancet 1993; 342: 82-5.
10. Jensen JS, Orsum R, Dohn B, et al. *Mycoplasma genitalium*: a cause of male urethritis? Genitourin Med 1993; 69: 265-9.
11. Keane FE, Thomas BJ, Whitaker L, Renton A, Taylor-Robinson D. An association between non-gonococcal urethritis and bacterial vaginosis and the implications for patients and their sexual partners. Genitourin Med 1997 Oct; 73 (5): 373-7.
12. Kim FY, Goldstein M. Antibacterial skin preparation decreases the incidence of false-positive semen culture results. J Urol 1999 Mar; 161 (3): 819-21.
13. Kreiger JN, Jenny C, Verdon M, et al. Clinical manifestation of trichomoniasis in men. Ann Intern Med 1993; 118: 844-9.
14. Krieger JN. New sexually transmitted diseases treatment guidelines. J Urol 1995; 154: 209-13.
15. Labau E, Henry S, Bennet P, Massip P, Chabanon G. Direct diagnosis of *Chlamydia trachomatis* genital infections: culture or PCR? Pathol Biol (Paris) 1998 Dec; 46 (10): 813-8.
16. Luzzi G. The prostatitis syndromes. Int J STD AIDS 1996; 7: 471-8.
17. Merino G, Carranza-Lira S, Murrieta S, Rodriguez L, Cuevas E, Moran C. Bacterial infection and semen characteristics in infertile men. Arch Androl 1995 Jul-Aug; 35 (1): 43-7.
18. Milla-Rodriguez F, Orsola de los Santos A, Veyreda-Matjia JM, et al. Menagement of acute prostatitis: experience with 84 patients (Spanish), Arch Esp de Urol 1995; 48: 129-36.
19. Nederlandse Vereniging voor Dermatologie en Venereologie. Diagnostiek en Therapie Richtlijnen 1997: 30-3.
20. Nickel JC. The pre and post massage test (PPMT): a simple screen for prostatitis. Tech Urol 1997, 3: 38-43.
21. Nickel JC, Nyberg LM, Hennenfent M. Research guidelines for chronic prostatitis: consensus report from the first National Institutes of Health International Prostatitis Collaborative Network. Urology. 1999 Aug; 54 (2): 229-33.
22. Nickel JC, Alexander R, Anderson R, et al. Prostatitis unplugged? Prostatic massage revisited. Tech Urol. 1999 Mar; 5 (1): 1-7.
23. Ohkawa M, Yamaguchi K, Tokunaga S, et al. *Ureaplasma urealyticum* in the urogenital tract of patients with chronic prostatitis or related symptomatology. Br J Urol 1993; 72: 918-21.
24. Sherrad J, Barlow D. Gonorrhoea in man: clinical and diagnostic aspects. Genitourin Med 1996; 72: 422-6.
25. Singh G, Blackwell A. Morbidity in male partners of women who have *Chlamydia* infection before termination of pregnancy. Lancet 1994; 344: 1438.
26. Stary A. Urethritis. Diagnosis of nongonococcal urethritis. Dermatol Clin 1998 Oct; 16 (4): 723-6, XI.
27. Taylor-Robinson D. The history of non-gonococcal urethritis. Sex Transm Dis 1996; 23: 86-91.
28. Taylor-Robinson D, Furr PM. Genital mycoplasma infections. Wien Klin Wochenschr 1997 Aug 8; 109 (14-15): 578-83.
29. UK National Guidelines on Sexually Transmitted Infections and Closely Related Conditions August 1999 volume 75 supplement 1.
30. Vohra S, Badlani G. Balanitis and balanoposthitis. Urol Clin North Am 1992 Feb; 19 (1): 143-7.
31. Waugh MA. Balanitis. Dermatol Clin 1998 Oct; 16 (4): 757-62, XII.
32. Willen M, Holst E, Myhre EB, Olsson AM. The bacterial flora of the genitourinary tract in healthy fertile men. Scand J Urol Nephrol 1996 Oct; 30 (5): 387-93.
33. Zelin JM, Robinson AJ, Ridgway GL, Allason-Jones E, Williams P. *Chlamydial urethritis* in heterosexual men attending a genitourinary medicine clinic: prevalence, symptoms, condom usage and partner change Int J STD AIDS 1995 Jan-Feb; 6 (1): 27-30.

Roberto Pozzoli
 Laboratorio di Microbiologia
 Ospedale Maggiore Niguarda "Ca' Granda"
 P.zza Ospedale 3
 20162 Milano
 Tel. 02 6444 2667; Fax 02 6444 2916

Intestazione del Laboratorio

ESAME MICROBIOLOGICO GENITOURINARIO MASCHILE

Cognome _____ Provenienza _____
Nome _____ Data _____
Data di nascita _____ Ora prelievo _____
Nazionalità _____ Codice sanitario _____

Motivazione all'indagine

Infertilità No Sì
Controllo No Sì
Sintomatologia in atto No Sì
Se sì No Sì
Disuria No Sì
Pollachiuria No Sì
Urgenza alla minzione No Sì
Secrezione No Sì a) scarsa b) abbondante
c) purulenta d) trasparente

Altro _____

Terapia antibiotica No Sì Quale: _____ Durata: _____
Ultima somministrazione _____

Partner sintomatico per _____

Numero partner nell'ultimo anno _____

M.S.T. in passato No Sì Quali: _____
Uso abituale del condom No Sì

ESAMI MICROBIOLOGICI RICHIESTI

TAMPONE URETRALE : **LIQUIDO SEMINALE :** **URINA (primo mitto) :**
 Esame microscopico Esame microscopico Ricerca *Chlamydia trachomatis*
 Esame colturale per *N.gonorrhoea* Ricerca *Mycoplasma/Ureaplasma* Ricerca *Trichomonas vaginalis*
 Ricerca *Chlamydia trachomatis* Ricerca *Gardnerella vaginalis* Ricerca altri microrganismi patogeni,
 Ricerca *Mycoplasma/Ureaplasma* Ricerca altri microrganismi patogeni compresi miceti lieviti
 Ricerca *Trichomonas vaginalis*
 Ricerca *Gardnerella vaginalis*
 Ricerca altri microrganismi patogeni,
compresi miceti lieviti

TEST DI MEARES-STAMEY

TAMPONE SOLCO BALANO-PREPUZIALE :

Diabete No Sì
Terapia antibiotica-antimicotica locale No Sì Quale: _____ Durata: _____
Ultima somministrazione _____

Ricerca *Trichomonas vaginalis*
 Ricerca *Gardnerella vaginalis*
 Ricerca altri microrganismi patogeni, compresi anaerobi e miceti lieviti.
 Ricerca *Herpes simplex*
 Ricerca *Papillomavirus*

Firma _____

Figura II. Esempio di richiesta che accompagna il materiale da esaminare