

INFEZIONI URINARIE DEL CANE E DEL GATTO: VALUTAZIONE DI UN NUOVO TEST ENZIMATICO RAPIDO

A.M. FARCA, O. ABATE, C. BELLINO

Dipartimento di Patologia Animale - Settore di Clinica Medica - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Torino

Riassunto

Gli Autori valutano l'applicabilità in Medicina Veterinaria di un test per la diagnosi precoce di Infezioni del Tratto Urinario (ITU), attualmente usato in Medicina Umana. Il test si basa sull'evidenziazione dell'enzima catalasi presente in molte specie batteriche, nei leucociti, negli eritrociti e nelle cellule renali. Su 156 campioni urinari di cani e di gatti sono stati eseguiti il test della catalasi e l'esame batteriologico quantitativo; su un numero inferiore di casi sono stati valutati anche l'esame microscopico del sedimento e l'esterasi leucocitaria. Sono stati calcolati la sensibilità, la specificità e il coefficiente K dei metodi considerati, ponendoli a confronto con i risultati dell'esame colturale dell'urina. I dati ottenuti indicano che il test della catalasi può rappresentare una reale alternativa all'esame batteriologico per la diagnosi presuntiva di ITU negli animali da compagnia: un risultato positivo richiede ulteriori esami colturali, mentre un risultato negativo può non richiedere altri e più costosi esami microbiologici.

Summary

The Authors estimate the applicability in Veterinary Medicine of a rapid test for the presumptive diagnosis of UTI, actually used in human patients. The test is based on the detection of the enzyme catalase that is present in most of bacteria, leukocytes, erythrocytes and kidney cells. The catalase test and quantitative urine culture were done on 156 samples of dogs and cats. Microscopic analysis and leukocytes esterase were done on lower number of samples. The sensitivity, specificity and K agreement for the methods were calculated against the urine culture (reference test). The results suggest catalase test could be a reliable alternative to urine culture of companion animal patients with suspected UTI: a positive result using this technique requires further microbiology evaluations, whereas a negative result could prevent the need for other expensive urine cultures.

INTRODUZIONE

Le infezioni batteriche del tratto urinario si verificano più frequentemente nel cane che nel gatto¹. Si ritiene che colpiscano il 14% dei cani almeno una volta nella vita^{2,3} e il 10% dei soggetti ricoverati nelle cliniche veterinarie^{2,4}; mentre nei gatti soltanto l'1-3% delle infiammazioni delle vie urinarie sono causate da infezione^{1,5,6,7,8}. I germi più frequentemente coinvolti sono rappresentati da *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. ed *Enterobacter* spp.^{1,2,5,7}. Circa l'80% dei cani ed un'alta percentuale di gatti non mostrano segni clinici patognomici di ITU^{2,5}, ma la patologia può provocare complica-

zioni anche gravi. Conseguentemente una diagnosi precoce ed un trattamento tempestivo risultano essenziali per la prevenzione delle complicanze.

Per l'identificazione di ITU gli esami batteriologici sono i test migliori, ma sono costosi e la loro esecuzione richiede almeno 24 ore⁹. Le tecniche routinarie di screening, quali il test della esterasi leucocitaria e l'analisi microscopica del sedimento, sebbene facili e veloci da eseguire, non danno sempre risultati soddisfacenti in Medicina sia Veterinaria sia Umana^{10,11,12,13,14} poiché non posseggono contemporaneamente tutti i requisiti richiesti, vale a dire un'eccellente sensibilità, una ragionevole specificità, un buon rapporto costo/efficacia, facilità e rapidità di esecuzione.

Attualmente in Medicina Umana è impiegato un test enzimatico rapido (Uriscreen, Savyon Diagnostic Ltd, Ashod, Israel) che mette in evidenza l'attività della catalasi, un enzima presente in molte specie batteriche patogene per l'apparato urinario, nei leucociti, negli eritrociti e nelle cellule renali^{9,14,15,16,17,18}. L'evidenziazione della catalasi in

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 10/12/2002 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 6/6/2003”.

campioni urinari mediante Uriscreen può quindi indicare una batteriuria significativa, oppure piuria o ematuria.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'applicabilità in Medicina Veterinaria del test della catalasi (Uriscreen) per la diagnosi precoce di ITU nel cane e nel gatto, comparandolo con altri due test rapidi (l'esterasi leucocitaria su striscia reattiva e l'osservazione microscopica del sedimento urinario) e con l'esame batteriologico dell'urina.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 156 campioni di urina provenienti da 129 cani (82,7%) e 27 gatti (17,3%). L'urina è stata raccolta mediante cistocentesi da 126 soggetti (105 cani e 21 gatti), cateterismo da 17 soggetti (13 cani e 4 gatti) e minzione spontanea da 13 soggetti (11 cani e 2 gatti), conservata in contenitori sterili ed esaminata entro 1 ora oppure entro 4 ore ma, in quest'ultimo caso, veniva refrigerata a 4 °C. Su tutti i campioni di urina esaminati sono stati effettuati l'esame colturale quantitativo ed il test della catalasi. Su 147 campioni (121 cani e 26 gatti) è stato effettuato l'esame microscopico del sedimento per evidenziare la piuria. Su 122 campioni di urina di cane è stato effettuato l'esame con strisce reattive per la determinazione della esterasi leucocitaria. L'esame batteriologico quantitativo è stato eseguito per primo ed utilizzato come test di riferimento per la diagnosi di ITU. Il test della catalasi e quello della esterasi leucocitaria sono stati eseguiti da un unico operatore per evitare possibili variabili. L'esame microscopico del sedimento è stato effettuato mediante le procedure standard adottate nel laboratorio di Clinica Medica del Dipartimento di Patologia Animale di Grugliasco (TO).

ANALISI DI LABORATORIO

Test della catalasi (Uriscreen)

È stato utilizzato un kit del commercio (URISCREEN, Savyon Diagnostic Ltd, Ashod, Israel) (Fig. 1) impiegato in Medicina Umana. Secondo i suggerimenti della casa produttrice, 1,5-2 ml di urina (Fig. 2) sono stati posti in una provetta contenente il reagente in polvere (Fig. 3); sono state aggiunte 4 gocce di perossido di idrogeno (Fig. 4), agitando delicatamente per 5 secondi. Si sono considerati positivi (Figg. 5b, 5c) i campioni che hanno sviluppato schiuma sufficiente a formare un anello o uno strato completo sulla superficie del liquido, entro 1-2 minuti dall'aggiunta di acqua ossigenata al 10%: questa reazione è indicativa di attività della catalasi. Il test è considerato negativo (Fig. 5a) in assenza di schiuma o quando l'anello si presenta incompleto dopo 2 minuti.

Strisce reattive

È stato effettuato l'esame con strisce reattive Combur test (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) per la determinazione della esterasi leucocitaria, considerando positivo il viraggio al porpora entro 2 minuti dal contatto della goccia di urina non centrifugata con la striscia.



FIGURA 1 - Test della catalasi. Materiale necessario per l'esecuzione.



FIGURA 2 - Test della catalasi: 1ª fase.



FIGURA 3 - Test della catalasi: 2ª fase.

Esame microscopico del sedimento

Il campione di urina è stato miscelato adeguatamente ed una quantità standard (6 ml) è stata trasferita in un'apposita provetta conica e centrifugata a 1500 rpm per 5'; il surnatante è stato decantato e, nella provetta, ne è stata trattenuta una quantità standard (0,5 ml circa) in cui è stato risospeso il sedimento. Una goccia del sedimento ricostituito è stata trasferita su un vetrino portaoggetti, ricostituito con un vetrino coprioggetto ed esaminata al microscopio ottico. Successivamente per una migliore identifica-



FIGURA 4 - Test della catalasi: 3^a fase.

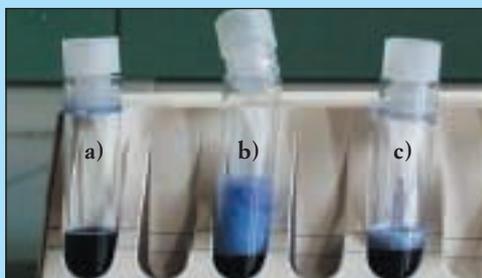


FIGURA 5 - Test della catalasi. Risultati: a) negativo; b, c) positivi.

zione degli elementi cellulari il sedimento è stato esaminato dopo colorazione con Kova-Stain. È stata effettuata una stima semiquantitativa dei leucociti contando le cellule presenti in almeno 10 campi microscopici ad alto ingrandimento (40x) e calcolando la media. Sono stati considerati positivi i campioni che presentavano più di 5 leucociti per campo microscopico ad alto ingrandimento¹⁹.

Esame colturale quantitativo

Per l'effettuazione dell'esame colturale delle urine è stato utilizzato l'UROTUBE (cetrimide) (Becton Dickinson Microbiology Systems Europe, France), un supporto a tre terreni (CLED, MacConkey, cetrimide) per la determina-

zione della carica batterica urinaria e l'identificazione di enterobatteriacee e *Pseudomonas* spp. Il supporto è stato immerso nel campione di urina per 30 sec. e posto ad incubare in termostato a 37 °C per 24 ore. Sono stati considerati positivi valori di 10⁵ UFC/ml per le urine raccolte con cateterismo e minzione spontanea e di 10³ UFC/ml per le urine ottenute mediante cistocentesi².

Analisi statistica

I risultati ottenuti con i tre metodi di screening sono stati sottoposti ad analisi statistica e confrontati con quelli dell'esame batteriologico delle urine (gruppo di riferimento). Sono stati calcolati la sensibilità, la specificità e l'accuratezza. La concordanza con l'urocoltura è stata valutata mediante il calcolo del coefficiente K.

La valutazione di un test può essere effettuata sulla base di due caratteristiche: la capacità di classificare correttamente come positivi i soggetti malati (sensibilità) e la capacità di classificare correttamente come negativi i soggetti sani (specificità). Un'alta specificità diminuisce la necessità di ulteriori indagini poiché il riscontro di un alto numero di campioni classificati come negativi dal test sono veri negativi, mentre la sensibilità incide sul rapporto costo/efficacia poiché ogni risultato positivo del test richiede di essere ulteriormente confermato.

RISULTATI

Dei 156 campioni di urina sottoposti ad esame batteriologico 126 (80,8%) sono risultati negativi e 30 (19,2%) positivi.

Gli esami colturali qualitativi allestiti con le urine di cane hanno permesso di evidenziare in 13 campioni la presenza di *Escherichia coli*, in 10 *Staphylococcus* spp., in 2 *Enterococcus faecalis*, in 3 *Enterobacter* spp. e in 2 *Pseudomonas* spp.; nei 4 gatti positivi sono stati riscontrati *Escherichia coli* (3) e *Pseudomonas* spp. (1).

Comparando i risultati ottenuti dai tre test rapidi con quelli dell'esame batteriologico (Tab. 1) si riscontra un maggior numero (31) di falsi positivi ottenuto con il test della catalasi rispetto all'esterasi leucocitaria (8) e all'analisi del sedimento (8), ma non si evidenziano dei falsi negativi, a differenza degli altri due test di screening adottati (2 e 5 rispettivamente).

Tabella 1
Risultati ottenuti con esame batteriologico, Uriscreeen, strisce reattive e analisi microscopica del sedimento

Test	Uriscreeen	Urotube	Strisce	Urotube	Sedimento	Urotube
Positivi	30 (19,2%)	30	23 (18,8%)	25	22 (15%)	27
Falsi positivi	31 (20,0%)	–	8 (6,6%)	–	8 (5,4%)	–
Negativi	95 (60,8%)	126	89 (72,9%)	97	112 (76,2%)	120
Falsi negativi	0	–	2 (1,7%)	–	5 (3,4%)	–
Totale	156	156	122	122	147	147

Tabella 2
Valori di sensibilità, specificità, accuratezza, e coefficiente K di Uriscreeen, strisce reattive e analisi microscopica del sedimento

Test	Sensibilità (%)	Specificità (%)	Accuratezza (%)	Concordanza K
Uriscreeen	100	75	80	0,54
Strisce reattive	81	93	91	0,76
Sedimento	92	91	91	0,76

I risultati dell'analisi statistica (Tab. 2) indicano che il test della catalasi ha mostrato valori di sensibilità del 100%, superiore al corrispondente valore relativo alle strisce reattive (81%) e all'analisi del sedimento (92%); specificità del 75%, accuratezza dell'80%, inferiori agli altri test e coefficiente K=0,54, inferiore alle strisce reattive (0,71) e all'esame del sedimento (0,76).

DISCUSSIONE

Un test di screening per la diagnosi di ITU per essere clinicamente utile deve essere semplice, rapido, di basso costo e soprattutto accurato. Il test della catalasi da noi valutato soddisfa pienamente i criteri di semplicità, rapidità e costo. I risultati da noi ottenuti confrontando i tre metodi di screening rapidi, indicano che l'Uriscreeen è il più sensibile ma il meno specifico ed accurato: di conseguenza, anche se tale test rileva tutti i campioni positivi per la presenza di ITU, il riscontro di un maggior numero di risultati falsi positivi (Tab. 1), secondo noi attribuibili alla presenza di ematuria in almeno 6 casi, suggerisce la necessità di una conferma da parte dell'esame batteriologico. Ciò starebbe a significare che per una diagnosi di positività per ITU nel cane e nel gatto l'Uriscreeen non è superiore all'analisi del sedimento o alle strisce reattive. Tuttavia l'assenza di risultati falsi negativi (Tab. 1) indicherebbe che tale test può escludere facilmente e velocemente la presenza di ITU, essendo quindi utile per eseguire la diagnosi e anche per valutare l'efficacia e la durata del trattamento terapeutico. La possibilità di escludere facilmente, rapidamente e con assoluta certezza la presenza di ITU è di estrema importanza per il clinico durante la visita del paziente, ed inoltre il riscontro in laboratorio di un risultato negativo del test della catalasi elimina la necessità di eseguire gli esami batteriologici specifici, più costosi ed elaborati.

CONCLUSIONE

L'Uriscreeen è un test rapido, semplice e relativamente economico per rilevare la presenza di piuria e batteriuria. La nostra valutazione del test, pur se effettuato su un numero non molto elevato di campioni, è in accordo con quanto osservato in Medicina Umana⁹ e, in conclusione,

riteniamo che l'Uriscreeen possa essere validamente applicato nella clinica dei piccoli animali precedendo l'urocoltura nei casi positivi, ed escludendola in quelli negativi.

Parole chiave

Cane, gatto, apparato urinario, infezioni, ITU, diagnosi, test enzimatico.

Key words

Dog, cat, urinary tract, infections, UTI, diagnosis, enzymatic test.

Bibliografia

1. Grauer G.F.: Urinary tract infections. In: Allen D.J., Kruth S.A., Garvey M.S.: Small Animal Medicine. Ed by J.B. Lippincot Company, Philadelphia, pp. 625-634, 1991.
2. Osborne C.A.: Tre stadi per trattare efficacemente le infezioni batteriche del tratto urinario: diagnosi, diagnosi e ancora diagnosi. *Veterinaria*, 11(5):29-37, 1997.
3. Ling G.V.: Therapeutic strategies involving antimicrobial treatment of the canine urinary tract. *JAVMA*, 185:1162-1164, 1984.
4. Ling G.V.: Urinary tract infections: In: Prescott J.F., Baggot J.D.: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Ed 2 Ames, Iowa State University Press, pp 349-370, 1993.
5. Ling G.V.: Infezioni batteriche dell'apparato urinario. In: Ettinger S.J., Feldman E.C.: Trattato di Clinica Medica Veterinaria. Antonio Delfino Editore, pp. 1678-1686, 2002.
6. Barsanti J.A., Finco D.R., Shotts E.B. et al.: Feline urologic syndrome: Further investigation into aetiology. *JAAHA*, 18:391-395, 1982.
7. Osborne C.A., Kruger J.M., Lulich J.P., Polzin D.J.: Disordini delle vie urinarie inferiori del gatto: In: Osborne C.A., Finco D.R.: Nefrologia e Urologia del Cane e del Gatto. UTET, Torino, pp. 653-707, 1999.
8. Lees G.E.: Bacterial urinary tract infections. *Vet. Clin. North Am. Sm. Anim. Pract.*, 26(2):297-304, 1996.
9. Millar L., Debuque L., Leialoha C. et al.: Rapid Enzymatic Urine Screening Test to Detect Bacteriuria in Pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, 95(4):601-604, 2000.
10. Zelicovic I., Adelman R.D., Nancarrow P.A.: Urinary tract infections in children - an update. *West J. Med.*, 157:554-561, 1992.
11. Hoberman A., Wald E.R.: Urinary tract infections in young febrile children. *Pediatr. Infect. Dis.*, 16:11-17, 1997.
12. Lohr J.A., Potilla M.G., Geuder T.G. et al.: Making a presumptive diagnosis of urinary tract infection by using urinalysis performed in an on-site laboratory. *J. Pediatr.*, 122:22-25, 1993.
13. Lockart G.R., Lewander W.J., Cimini D.M. et al.: Use of urinary Gram-stain for detection of urinary tract infection in infants. *Ann. Emerg. Med.*, 25:31-35, 1995.
14. Waisman Y., Zerem E., Amir L., Mimouni M.: The Validity of the Uriscreeen Test for Early Detection of Urinary Tract Infection in Children. *Pediatrics*, 104(4):41-44, 1999.
15. Pezzlo M.T., Amsterdam D., Anhalt J.P. et al.: Detection of Bacteriuria and Pyuria by URISCREEN, a Rapid Enzymatic screening Test. *J. Clin. Microbiol.*, 30(3):680-684, 1992.
16. Nauschuetz W.F., Harrison L.S., Trevino S.B. et al.: Two Rapide Urine Screens for Detection of Bacteriuria: An Evaluation. *Curr. Microbiol.*, 26:43-45, 1993.
17. Carrol K.C., Hale D.C., Von Boerum D.H. et al.: Laboratory Evaluation of Urinary Tract Infections in an Ambulatory Clinic. *Am. J. Clin. Pathol.*, 101(1):100-103, 1994.
18. Hagay Z., Levy R., Miskin A. et al.: Uriscreeen, a Rapid Enzymatic Urine Screening Test: Useful Predictor of Significant Bacteriuria in Pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, 87(3):410-413, 1996.
19. Osborne C.A., Stevens J.B., Lulich J.P. et al.: Valutazione clinica dell'analisi delle urine: In: Osborne C.A., Finco D.R.: Nefrologia e Urologia del Cane e del Gatto. UTET, Torino, pp. 141-206, 1999.