

FULL PAPERS /LAVORI ORIGINALI

Automazione dell'urinocoltura in campioni da catetere vescicale: criticità applicative ed interpretative dell'uso in routine del laser-nefelometro

Marcello Meledandri, Annunziata Tamburro, Sara Serafina Paciotti, Milva Ballardini, Sabrina Girolami, Luciano Spagnesi, Maria Eva Evangelisti

U.O.C. Microbiologia e Virologia, Azienda Complesso Ospedaliero San Filippo Neri, Roma.

Key words: Bacteriuria, Pyuria, Urinary Catheter

Diagnostic Evaluation of Urine Specimens Collected from Catheter: Drawbacks in the Use of an Automated Nephelometric Instrumentation

SUMMARY

Automated urine culture methods have spread throughout Italian clinical laboratories in the last decade. Among available systems, Uro-Quick™ (a laser nephelometric instrument) evaluates the microbial growth in liquid medium, shortening the overall time of laboratory processing. The performances of the instrument have been estimated in patients with indwelling urinary catheter. Urine of patients with CAUTI (Catheter Associated Urinary Tract Infection), because of high dilution and anti-bacterial load, frequently produce working difficulties and misleading interpretation. In 2003-2004 urine specimens coming from patients of S.Filippo Neri Hospital, in Rome (Italy) were examined. Patients with closed-circuit urinary catheter, mainly hospitalized in ICUs, and requesting urine cultures for clinical reasons were enrolled. A total of 100 properly collected specimens, from different patients, were considered. For each, several clinical information (especially antibiotic therapy) were also collected. Urine specimens were examined as follows: 1) microbial count and evaluation of antibacterial load by means of Uro-Quick™; 2) microscope (HPF) observation for pyuria in the sediment; direct plate culturing of urine, with 10 µl calibrated loop. A bacteriuria was defined as the growth of 1-2 species, with a count $\geq 10^3$ CFU/mL; the same value, together with the finding of pyuria (at two degrees: >1 WBC, >5 WBC, respectively), was used for a presumptive definition of CAUTI. A considerable rate of specimens (62%) showed anti-bacterial load (while the reported antibiotic therapy was 54%). The instrumentation revealed a sensibility of 74% and specificity of 98% in finding bacteriuria. However, when negative specimens which had antibacterials were re-classified as positive (for possible presence of inhibited microorganisms), sensibility increased to 95%. On the contrary, considering the presence of >5 WBC in the sediment, sensibility and specificity declined, respectively, to 56% and 85%. In the last case, adjusting the instrumentation results with determination of antibacterial load revealed as an unreliable approach: while sensibility increased at 94%, specificity decreased at 24%. Briefly, Uro-Quick™ revealed good positive predictive value (+PV) in finding bacteriuria, but unsatisfactory negative predictive value (-PV). The system showed anyway low +PV and -PV versus the presumed infection: moreover, these performances were not improved by the simultaneous determination of antibacterial load in specimens. The results suggest the opportunity to set up a separated, not automated, workflow for urine collected from catheter.

INTRODUZIONE

Il catetere urinario rappresenta il fattore di rischio più importante d'infezione urinaria; la popolazione ospedalizzata acquisisce infezione delle vie urinarie in circa l'80% dei casi a seguito di cateterizzazione, e in circa il 4% a seguito di manovre strumentali (6, 8, 15). La definizione d'infezione nosocomiale delle vie urinarie associata a catetere (Catheter Associated Urinary Tract Infection - CAUTI), include sia una batteriuria sintomatica sia priva di sintomatologia a seguito dell'impianto del catetere come indicato dai CDC (2). L'incidenza di CAUTI è maggiore quanto più

aumenta la durata d'esposizione al catetere: nei pazienti con drenaggio aperto si manifesta batteriuria significativa entro 3-4 giorni dall'impianto e può arrivare a 85-100%. Nei pazienti con un sistema di drenaggio chiuso l'insorgere dell'infezione è meno probabile e la batteriuria è presente nel 3-10% dei casi il 1° giorno, nel 50% al 10° giorno; nel 100% dal 30° giorno (8, 15).

Di norma i campioni di urina da pazienti cateterizzati sono prelevati dal sistema di drenaggio utilizzando apposite valvole, in modo da mantenere inalterata la sterilità del sistema stesso. L'urina così prelevata non ha modo di concentrare in

vescica e presenta caratteristiche diverse rispetto al "classico" campione da mitto intermedio, raccolto dopo alcune ore di stasi in vescica (9); in caso di infezione, la carica batterica e la piuria possono mostrare valori più bassi dei *cut-off* canonici (16). In particolare, non è applicabile per la batteriuria il *cut-off* classico di Kass (4, 5, 12) di 10^5 CFU/mL. Uno studio prospettico, condotto da Tambyah e Maki su pazienti con catetere, ha rilevato che il 10.8% di questi individui sviluppavano CAUTI con una crescita batterica di 10^3 CFU/mL (13, 14). Il livello stesso della piuria, per identificare una CAUTI in pazienti cateterizzati da breve tempo, non è stato precisamente definito (14). Occorre, infine, considerare che i pazienti con catetere urinario sono frequentemente sottoposti a terapia antibiotica (nell'area intensiva, ad esempio, l'uso degli antibiotici è massiccio): la presenza di potere antibatterico residuo (PAR) nei campioni di urina introduce un'ulteriore difficoltà tecnica nell'identificazione dei casi di CAUTI.

Le strumentazioni automatiche per l'esecuzione degli esami colturali sono state introdotte in tempi relativamente recenti nei laboratori clinici italiani. Spesso questi sistemi sono utilizzati da centri diagnostici di medie e grandi dimensioni, appartenenti ad aziende ospedaliere o a strutture collegate ad ampi bacini d'utenza territoriale.

L'introduzione del laser-nefelometro Uro-Quick™ (Alifax Diagnostici, SpA, Padova) per l'esecuzione dell'urinocoltura ha costituito una singolare novità per diversi centri italiani di microbiologia clinica. La praticità e la rapidità dello strumento (3, 10) hanno semplificato una procedura di laboratorio già codificata, trasformandola in *routine*. Nella prassi lavorativa, questo ha significato - per alcuni utilizzatori, tra cui gli scriventi - l'adozione di un flusso di lavoro unificato per la maggior parte dei campioni urinari. Tale flusso prevede l'esecuzione preliminare della conta batterica e la determinazione del potere antibatterico residuo (PAR-test) in automazione.

L'opportunità di rivedere criticamente la lavorazione dei campioni urinari è sorta, presso il laboratorio dell'ospedale San Filippo Neri di Roma, negli ultimi anni. Le ragioni sono molteplici, ma in qualche modo riconducibili alle attività di sorveglianza (svolte in collaborazione con clinici, igienisti e personale d'assistenza) delle infezioni ospedaliere in area intensiva. Tali attività hanno stimolato la riflessione su una possibile sottostima delle CAUTI rispetto ai valori attesi sulla base d'indicazioni bibliografiche (1), per motivi legati anche (ma non solo) alla lavorazione del campione in automazione. In particolare, nel periodo 2002-03 - presso l'azienda ospedaliera in oggetto - si sarebbe registrato un tasso di CAUTI (in area

intensiva) costantemente inferiore a 3 episodi / 1000 gg di c.v. (7). Si è cercato, a questo punto, di verificare se il sistema Uro-Quick™, potesse essere correttamente impiegato per valutare le CAUTI; le prestazioni dello strumento sono state confrontate con i metodi tradizionali, cercando di misurare la capacità discriminante dello strumento stesso. Sono state, inoltre, esaminate le criticità legate al *timing* di raccolta del campione rispetto alla durata del catetere *in situ*, nonché alla conformità della richiesta di urinocoltura rispetto ad un possibile sospetto clinico. Tali fattori potrebbero, infatti, incidere significativamente nella stima del tasso di CAUTI in un reparto o in un'area clinica.

MATERIALI E METODI

Sono stati presi in considerazione i campioni clinici di pazienti sottoposti a cateterizzazione vescicale in regime di ricovero ordinario presso l'Azienda Complesso Ospedaliero San Filippo Neri di Roma. L'ospedale è una struttura non universitaria dotata di 891 posti letto, dotata di una consistente area critica (45 posti letto intensivi, 9 sub-intensivi) e caratterizzata da un'attività chirurgica con settori d'alta specializzazione. Nel 2002 la quota dei ricoveri chirurgici è stata pari a 37% del totale.

Il campionamento si è svolto in due fasi: durante la prima fase (20/11/2003 - 30/12/2003) sono stati raccolti 39 campioni consecutivi, secondo i criteri sotto elencati; durante la seconda fase (3/2/2004 - 26/5/2004) sono stati raccolti ulteriori 61 campioni non consecutivi. Nei due periodi sono stati valutati e lavorati secondo procedura *ad hoc* solo i campioni che rispondevano ai seguenti requisiti: corretta raccolta dall'apposito sito di prelievo ed invio nel contenitore sterile, in conformità alle indicazioni del manuale modalità di prelievo locale; completa compilazione della scheda di richiesta, con chiara indicazione della provenienza del campione (urine da catetere vescicale); indicazione dell'eventuale terapia antibiotica; provenienza (preferenziale) dall'area intensiva.

Il campionamento finale di 100 urine (per altrettanti pazienti) è corrisposto approssimativamente a 22-25% dell'intero *pool* inviato annualmente in laboratorio per questo tipo di materiale, per l'area intensiva. La richiesta di urinocolture dall'area critica e dalle aree subintensive è, infatti, modesta presso la nostra struttura.

La procedura di lavoro utilizzata prevedeva, schematicamente:

1. urinocoltura manuale: semina su piastre di agar con ansa da 10 μ l; per ogni campione: Columbia Blood Sheep con incubazione in atmosfera CO₂ 5%; Mac Conkey, Enterococcus

- selective, Sabouraud GC con incubazione in aerobiosi; per tutti i terreni, 18-24h, 37°C;
2. urinocoltura automatizzata: conteggio carica microbica + Par-test mediante Uro-Quick™: procedura a 180 minuti; successiva semina su piastre (come al punto 1) dei campioni con evidenza di crescita batterica (Uro-Quick™ è uno strumento che determina la carica microbica delle urine mediante il principio della laser-nefelometria con una sensibilità di 10³ CFU/ml in un tempo non superiore a 3.20 ore; lo strumento provvede alla termostazione e all'agitazione dei campioni; un raggio laser incide sui flaconcini, contenenti il terreno liquido; i microrganismi presenti determinano la deviazione del fascio luminoso che è rilevato da due *detector*; i segnali sono elaborati da un computer il quale traccia le curve di crescita e determina la carica iniziale; con la stessa procedura, su un secondo flaconcino, viene misurata la capacità inibente del campione - PAR-test - verso il ceppo ATCC1 2228 di *Staphylococcus epidermidis*);
 3. lettura sedimento urinario: microscopia a fresco del sedimento HPF(400x).

Per la valutazione si è adottata la seguente definizione di batteriuria: "sviluppo (entro 24h) di 1-2 specie con carica $\geq 10^3$ CFU/mL". La batteriuria è stata confrontata con due livelli di piuria utilizzabili nella definizione presuntiva di CAUTI: a) 1-5 leucociti / p.c.m; b) >5 leucociti / p.c.m.

I dati sono stati analizzati mediante tabelle 2x2 per la valutazione dell'efficacia diagnostica dello strumento in questione. Sono state quindi analizzate le relazioni tra piuria e specie microbiche isolate nei campioni, tra risultati analitici e *timing* di raccolta dei campioni stessi. Le elaborazioni statistiche sono state eseguite mediante software Excel™ Microsoft, Primer® (Mc Graw Hill), Smith's Statistical Package (G.Smith; Pomona College CA, USA).

RISULTATI

Sono stati valutati 100 campioni urinari da catetere, provenienti da pazienti diversi. La composizione del campione è stata di 60 maschi e 40 femmine (età media di 57 anni), con una caratteristica distribuzione bi-modale, corrispondente alla tipologia dei pazienti "critici" dell'ospedale S.F.Neri ("giovani" con traumi e anziani con preesistenti patologie cronico-degenerative). Il reparto di degenza apparteneva all'area intensiva per 82 pazienti (terapie intensive post-chirurgiche o rianimazione), all'area delle degenze chirurgiche per 6 pazienti, all'area medica per 12 pazienti.

La coltura automatizzata (mediante laser-nefelometro Uro-Quick™) ha permesso di rilevare 29 campioni positivi (pari a 29% del totale), con carica microbica variabile da 12000 cellule batteriche/mL a >1000000 cellule batteriche/mL. Con tale metodo, l'insieme dei campioni/pazienti positivi ha presentato una carica media di 796966 CFU/mL (95% CI: 680818-913112).

Analogamente, la coltura su piastra dei medesimi campioni (mediante ansa calibrata da 10µl) ha permesso di rilevare 38 campioni positivi (38% del totale), con carica microbica variabile da 1000 CFU/mL a >1000000 CFU/mL. In questo caso l'insieme dei positivi aveva una carica media di 754263 (95% CI: 634848-873678). Per il conteggio della carica media – con i due metodi – si è proceduto all'approssimazione delle cariche microbiche "fuori range" (da >1000000 CFU/mL a 1000000 CFU/mL). Le cariche medie dei positivi, rilevate con i due metodi, non hanno mostrato significative differenze (t-value: 0.510; p = 0.612).

L'analisi microscopica del sedimento urinario HPF ha rivelato che 69 campioni su 100 presentavano almeno 1 leucocita p.c.m. Di questi, 45 presentavano oltre 5 leucociti p.c.m. I risultati complessivi sono riportati in tabella 1.

Tabella 1. Leucociti presenti nei campioni (sedimento HPF)

LEUCOCITI P.C.M. (400X)	N. CAMPIONI
da 1 a 5	24
da 6 a 10	18
da 11 a 20	8
oltre 20	19
Leucociti assenti	31
Totale	100

L'esecuzione automatizzata del PAR-test ha permesso di stimare la quota di campioni in cui era presente antibiotico residuo. È stata riscontrata una rilevante quota – 62% - di campioni con attività antibatterica. Tale dato è stato confrontato con una antibiotico terapia "dichiarata" del 54%; la concordanza tra dati rilevati e dati dichiarati non è stata alta (Kappa = 0.43; 95% CI: 0.2357-0.6224). Si ricorda che, ai fini del presente lavoro, l'uso del PAR-test è servito, non tanto per stimare la pressione nell'uso degli antibatterici sui pazienti, quanto per individuare campioni presuntivamente positivi: in altre parole campioni apparentemente sterili ma carichi di antibiotico (n. = 8). Il numero dei positivi, aggiustato secondo questo criterio, è risultato essere quindi uguale a 37. L'uso dei suddetti sistemi, anche associati tra loro, per effettuare una diagnosi di laboratorio di CAUTI, ha fornito un'eterogenea classificazione dei possibili campioni positivi (figura I).

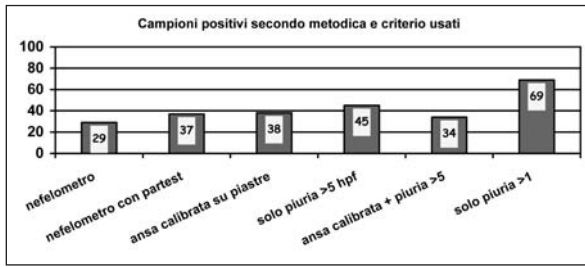


Figura 1. Frazione (%) dei campioni positivi in funzione del metodo (strumentale o manuale) e del criterio di positività adottato

Sinteticamente, seguono i risultati ottenuti, in termini di numero di positivi / totale dei 100 campioni:

- conta batterica in brodo mediante nefelometro Uro-Quick™ (senza PAR-test): 29%
- conta batterica in brodo mediante nefelometro Uro-Quick™ (con PAR-test): 37%
- conta batterica su piastra (ansa calibrata): 38%
- valutazione della sola piuria HPF (>5 leucociti/pcm): 45%
- conta batterica su piastra (ansa calibrata) + valutazione della piuria-HPF (>5): 34%
- valutazione della sola piuria HPF (>1 leucociti/pcm): 69%.

Sebbene non esista un criterio univoco per definire la positività dei campioni in caso di CAUTI, la conta su piastra e la valutazione della piuria sono servite come riferimento guida, per una parte consistente del lavoro. Tale scelta è stata operata, oltre che sulla base di indicazioni bibliografiche (14, 16), in virtù dello scarto modesto rilevato tra i positivi per batteriuria in piastra (n°38) e i campioni con >5 leucociti HPF (n°45): vedi figura 1. Su queste premesse, è stata eseguita la comparazione dei risultati del sistema automatico, per valutarne le prestazioni. A tal fine sono stati usati tre *gold standard*, rispettivamente per la valutazione della sola batteriuria (*gold standard* = batteriuria in piastra), della possibile infezione con piuria significativa (*gold standard* = batteriuria in piastra e >5 leucociti/pcm HPF), della possibile infezione con piuria minimale (*gold standard* > 1 leucociti/pcm HPF, indipendentemente rilevazione della crescita batterica). Sinteticamente, seguono i risultati (punti A, B, C, D, E, F).

Tabella 2. Capacità dello strumento di rilevare batteriuria

TEST IN PROVA:		STANDARD		totale
		POSITIVI	NEGATIVI	
conta batterica su laser nefelometro	POSITIVI	28	1	29
	NEGATIVI	10	61	71
	totale	38	62	100

A. Capacità del nefelometro di rilevare la batte-

riuria (indipendentemente dalla presenza di leucociti nel sedimento urinario): vedi tabella 2. Il sistema ha mostrato una sensibilità del 74% (95% CI: 0.597-0.877), una specificità del 98% (95% CI: 0.953-1.015), un valore predittivo positivo del 97% (95% CI: 0.899-1.032) e un valore predittivo negativo dell'86% (95% CI: 0.733-0.986) nel rilevare batteriuria.

Tabella 3. Capacità dello strumento - con funzione PAR test - di rilevare batteriuria

TEST IN PROVA:		STANDARD		totale
		POSITIVI	NEGATIVI	
conta batterica su laser nefelometro + PAR test	POSITIVI	36	1	37
	NEGATIVI	2	61	63
	totale	38	62	100

B. Capacità del nefelometro Uro-Quick™, con la funzione PAR-test attiva, di rilevare la batteriuria (indipendentemente dalla presenza di leucociti nel sedimento): vedi tabella 3. Quando i campioni negativi, con Par-test (+), sono stati deliberatamente classificati come positivi (per sospetta presenza di microrganismi inibiti), la sensibilità si è incrementata. Complessivamente si è osservato: sensibilità 95% (95% CI: 0.876-1.018), specificità 98% (95% CI: 0.953-1.015), valore predittivo positivo 97% (95% CI: 0.921-1.025), valore predittivo negativo 97% (95% CI: 0.912-1.025). Occorre sottolineare che la scelta è stata fatta poiché erano in gioco campioni provenienti da pazienti a rischio per CAUTI. Una simile classificazione sarebbe oltremodo forzata in una popolazione a basso rischio d'infezione (quale quella dei non cateterizzati, ad esempio). Le indicazioni del produttore di Uro-Quick™, ad ogni modo, sono sempre di fare una coltura di controllo sui campioni "negativi" con Par-test (+), indipendentemente dalla provenienza del campione stesso (mitto intermedio, catetere, etc.).

Tabella 4. Capacità dello strumento di rilevare una possibile infezione urinaria (piuria significativa)

TEST IN PROVA:		STANDARD		Totale
		POSITIVI	NEGATIVI	
conta batterica su laser nefelometro	POSITIVI	19	10	29
	NEGATIVI	15	56	71
	totale	34	66	100

C. Capacità del nefelometro Uro-Quick™ di rilevare una possibile infezione urinaria (>5 leucociti nel sedimento 400x): vedi tabella 4. Considerando la presenza di >5 leucociti nel sedimento (oltre alla crescita su piastra), è stato

osservato un decremento di sensibilità e specificità. Complessivamente si è osservato: sensibilità 56% (95% CI: 0.392-0.726), specificità 85% (95% CI: 0.762-0.935), valore predittivo positivo 66% (95% CI: 0.482-0.828), valore predittivo negativo 79% (95% CI: 0.64-0.937).

Tabella 5. Capacità dello strumento - con funzione PAR test - di rilevare una possibile infezione urinaria (piuria significativa)

		STANDARD		totale
		POSITIVI	NEGATIVI	
TEST IN PROVA:	POSITIVI	32	50	82
conta batterica su laser nefelometro + PAR test	NEGATIVI	2	16	18
	totale	34	66	100

D. Capacità del nefelometro Uro-Quick™, con la funzione PAR-test attiva, di rilevare una possibile infezione urinaria (>5 leucociti nel sedimento HPF): vedi tabella 5. L'aggiustamento dell'efficienza analitica, mediante l'uso simultaneo del Par-test, ha consentito di incrementare la sensibilità a 94%, a patto di usare il criterio di classificazione sopra menzionato: (Campioni senza crescita batterica) AND (Par-test positivo) = (campioni positivi). La specificità del test è stata tuttavia inaccettabile (24%). Complessivamente, si è osservato: sensibilità 94% (95% CI: 0.862-1.02), specificità 24% (95% CI: 0.139-0.346), valore predittivo positivo 39% (95% CI: 0.285-0.496), valore predittivo negativo 89% (95% CI: 0.821-0.957). È evidente, in tal caso, la scarsa utilità del Par-test come indicatore di presunta infezione nei campioni negativi. Resta accettabile il valore predittivo negativo (riferibile in buona parte ai soli campioni sterili, senza antibiotici residui).

Tabella 6. Capacità dello strumento di rilevare una possibile infezione urinaria (piuria minimale)

		STANDARD		totale
		POSITIVI	NEGATIVI	
TEST IN PROVA:	POSITIVI	23	6	29
conta batterica su laser nefelometro	NEGATIVI	46	25	71
	totale	69	31	100

E. Capacità del nefelometro Uro-Quick™ di rilevare una possibile infezione urinaria (>1 leucociti nel sedimento HPF, anche in assenza di crescita batterica su piastra): vedi tabella 6. Se si abbassa il livello di piuria e si considera questo solo parametro come indicatore di possibile infezione, si ottiene un raddoppio dei possibili campioni positivi. La scelta di tale standard "semplice" è motivabile da due considerazioni:

- 1) la piuria potrebbe essere trascurabile in caso di infezione avvenuta poco dopo la cateterizzazione;
- 2) la crescita su piastra potrebbe subire, sebbene in misura minore rispetto alla brodocoltura, delle inibizioni da antibiotico residuo. Nei confronti di tale standard estremo lo strumento automatico mostra prestazioni peggiori rispetto a quelle valutate al punto C. Complessivamente, si è osservato: sensibilità 33% (95% CI: 0.222-0.445), specificità 81% (95% CI: 0.667-0.946), valore predittivo positivo 79% (95% CI: 0.646-0.941), valore predittivo negativo 35% (95% CI: 0.178-0.526). Come appare anche dalla tabella 8, l'adozione di un *cut-off* minimo per la piuria renderebbe del tutto inaffidabile lo strumento automatico.

Tabella 7. Capacità dello strumento - con funzione PAR test - di rilevare una possibile infezione urinaria (piuria minimale)

		STANDARD		totale
		POSITIVI	NEGATIVI	
TEST IN PROVA:	POSITIVI	57	25	82
conta batterica su laser nefelometro + PAR test	NEGATIVI	12	6	18
	totale	69	31	100

F. Capacità del nefelometro Uro-Quick™, con la funzione PAR-test attiva, di rilevare una possibile infezione urinaria (>1 leucociti nel sedimento HPF, anche in assenza di crescita batterica su piastra): vedi tabella 7. Analogamente a quanto fatto in precedenza, l'introduzione del Par-test (con le medesime modalità interpretative) ha consentito un aumento relativo della sensibilità valutata al punto E, ma un ulteriore peggioramento della specificità. Complessivamente, si è osservato: sensibilità 83% (95% CI: 0.737-0.916), specificità 19% (95% CI: 0.054-0.333), valore predittivo positivo 70% (95% CI: 0.595-0.795), valore predittivo negativo 33% (95% CI: 0.231-0.435).

I microrganismi risultanti dalle colture in piastra o dalle subculture dei brodi Uro-Quick™ (tutte le specie rilevate nelle subculture dei brodi Uro-Quick™ positivi sono state, comunque, rilevate nelle colture dirette) fanno parte della tipica flora microbica isolata in questa tipologia di campioni. Si è trattato, in particolare, di Enterobacteriaceae (n.10 *E. coli*, n.3 KES, n.2 *P. mirabilis*), *Pseudomonas* (n.6), *Enterococcus* spp. (n.8), un discreto numero di *Candida* spp (n.11), più alcuni ceppi (n.3) probabilmente contaminanti (CoNS, difteroidi, *Haemophilus*). Nella figura II è rappresentato il peso relativo dei microrganismi isolati in questi campioni. Occorre precisare che i

germi elencati - globalmente 43 ceppi - erano presenti di popolazione unica, oppure nell'ambito di una popolazione bi-microbica.

I microrganismi isolati sono stati correlati alla presenza di leucociti nel sedimento urinario. Nella figura III i principali gruppi di microrganismi isolati (come isolamento numericamente prevalente o come isolamento secondario) sono stati correlati ad una presenza di >5 leucociti HPF. La presenza di >5 leucociti nel sedimento urinario sembra associata con l'isolamento di batteri Gram negativi, piuttosto che di Gram positivi (OR = 1.46; 95% CI: 0.271-7.821) o *Candida* spp (OR = 1.27; CI: 0.242-6.704). Questo fenomeno si evidenzia maggiormente (OR = 2.80; CI: 0.307-25.525) nel rapporto tra Gram negativi e Gram positivi, quando si considerano unicamente gli isolati microbici principali (prevalenti) nell'ambito delle cariche "miste" (figura IV). Al contrario, tale tendenza non è riscontrabile nel confronto tra Gram negativi e *Candida* spp (OR = 1.05; CI: 0.197-5.602), per la presenza di alcuni isolamenti "puri" di *Candida* in campioni con leucociti. Si rimanda alla sezione "Discussione" per le considerazioni in merito.

È stato valutato il tempo di ricovero dei pazienti (giorni di degenza) al momento della raccolta urine. Per i pazienti di area intensiva, infatti, il tempo di permanenza in reparto corrisponde, con buona approssimazione, al tempo di cateterizzazione vescicale. Il tasso di cateterizzazione in area critica è, infatti, pari a 97-99% (2002-2004: Direzione Sanitaria Presidio A.C.O. S.F.Neri, dati non pubblicati). Il tempo medio di degenza (al momento della raccolta) è risultato 5,7 giorni (SD 8.51), con una mediana pari a 2. I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi: 1) pazienti presenti in reparto da 0 a 2 giorni: 60%; pazienti presenti in reparto da 3 a 10 giorni: 21%; pazienti presenti in reparto da 11 a >30 giorni: 19% (figura V).

Per i tre gruppi si è considerato l'impatto (%) dei campioni con piuria significativa (>5 HPF) e con batteriuria rilevata mediante coltura tradizionale (ansa calibrata). È stato osservato un incremento della frazione di positivi (sia per la piuria, sia per la batteriuria) con il progredire della degenza, come risulta dalla figura VI. Nel dettaglio, si è registrato un progressivo (ma non significativo, in considerazione della scarsa numerosità del campione e del suo sbilanciamento sulla fascia "0-2 giorni") aumento della quota di pazienti con piuria: da 35.2% (95% CI: ±12.1) a 52.6% (95% CI: ±12.1), fino a, 58.8% (95% CI: ±22.2) per le degenze oltre gli 11 giorni. Analogamente, si è osservato un aumento - debolmente significativo (p = 0.035) - della quota dei pazienti con batteriuria: da 20.37% (95% CI: ±10.1) a 47.37%

(95% CI: ±21.4) nella fascia da "3 a 10 giorni di degenza".

La valutazione della leucocitosi ematica media dei pazienti al momento della raccolta di urine non ha mostrato significative differenze tra i coloro per cui è stata dimostrata una crescita batterica nel campione e coloro che sono risultati negativi. In particolare, si è osservato che usando il laser-nefelometro per valutare la crescita batterica: a) batteriuria presente -> 10227.9 WBC/μl; b) batteriuria assente -> 10534.4 WBC/μl (t-value della diff.: -0.249; p = 0.8026); usando l'ansa calibrata (su piastre) per valutare la crescita batterica: a) batteriuria presente -> 9772 WBC/μl; b) batteriuria assente -> 10890 WBC/μl (t-value della diff.: -1.214; p = 0.2291).

Limiti: non è stata valutata la temperatura corporea dei pazienti al momento della raccolta dei campioni; non è stato possibile raccogliere sistematicamente altri dati di laboratorio quali CRP sierica, VES, etc.

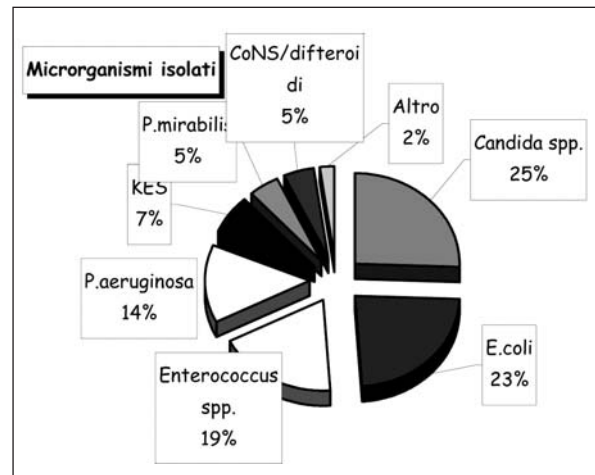


Figura II. Specie microbiche rilevate nei campioni (%)

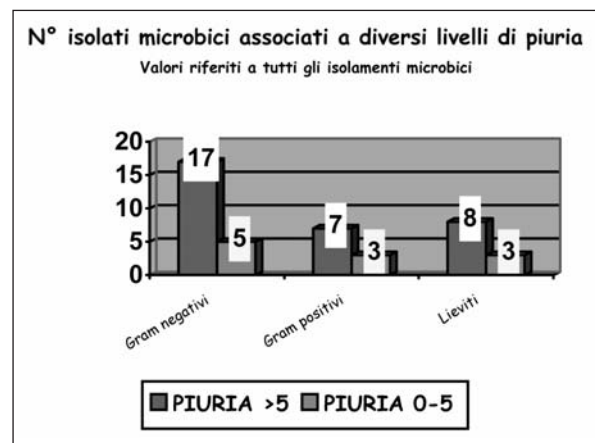


Figura III. Relazione tra specie microbiche isolate (tutti gli isolamenti effettuati) e piuria

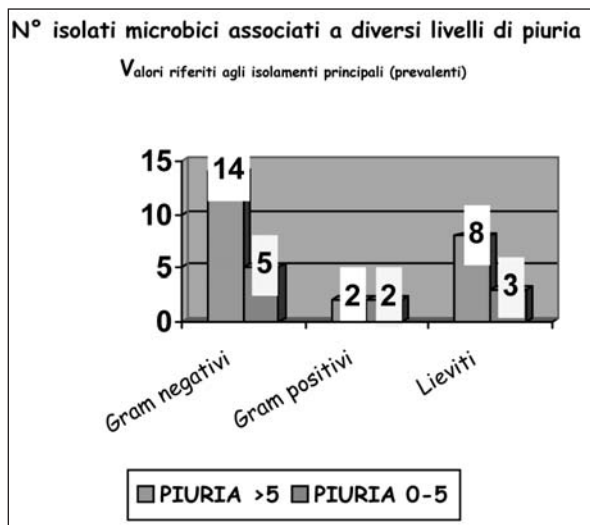


Figura IV. Relazione tra specie microbiche isolate (solo gli isolamenti prevalenti, in caso di cariche bi-microbiche) e piuria

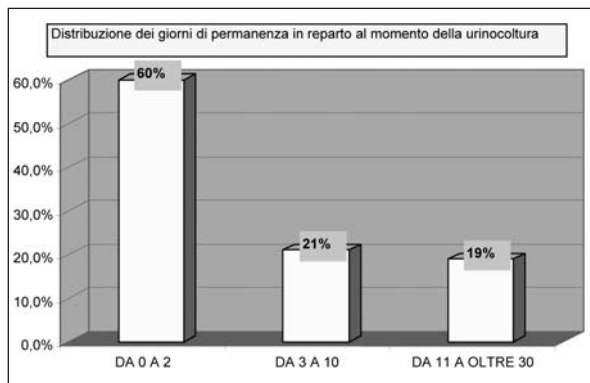


Figura V. Tempo di ospedalizzazione dei pazienti al momento di esecuzione dell'urinocoltura

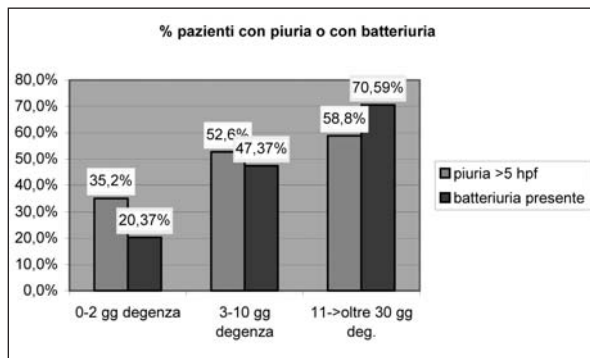


Figura VI. Quota dei pazienti con batteriuria/piuria in relazione alla ospedalizzazione

DISCUSSIONE

La prima considerazione da fare sui risultati sperimentali riguarda l'eccessiva presenza di antibiotici nei campioni, spesso chiamata in causa per spiegare la ridotta entità delle infezioni urinarie

presso le terapie intensive dell'Ospedale S.F.Neri. Nello specifico, in 54 casi su 100 l'uso di antibiotici, al momento del prelievo, è stato dichiarato. Lo strumento ha rilevato tracce di antibiotici nelle urine in 62 casi su 100. Tralasciando le considerazioni sulla concordanza mediocre tra il dato dichiarato di antibiotico terapia e quello misurato (ad esempio per interruzione della terapia, discontinuità nella somministrazione, farmacocinetica o semplice imprecisione nel compilare la scheda di richiesta), appare evidente il "carico farmacologico" di questi campioni. Il fenomeno è del tutto in linea con i dati di questa azienda ospedaliera del 2001-2003 (dati VEQ di laboratorio, non pubblicati): una quota di Par-test urinari positivi compresa tra 60% e 80% era stata rilevata in area intensiva, contro un valore oscillante tra 20% e 30% nelle aree medica e chirurgica.

La presenza di antibiotici ha condizionato l'esito dell'urinocoltura nello strumento automatico, ma non si può escludere che abbia impedito anche la rilevazione di alcuni positivi nella semina in piastra. Tale dubbio nasce dall'osservazione che nel gruppo dei pazienti che avevano soggiornato in reparto fino a 10 giorni (~80% del campione totale), sia stato più frequente il riscontro della piuria (>5 HPF) che quello della batteriuria. Inoltre, valutando le diverse metodiche, si evidenzia come la conta batterica fornisca risultati "positivi" costantemente più bassi della rilevazione della sola piuria (figura I). Nel caso estremo di uso dello standard ">1 HPF" (che corrisponde a ben 69 positivi su 100) si rivelerebbe completamente fallace sia il sistema automatico per urinocoltura, sia il metodo manuale su piastre. Tuttavia, la possibilità che la frazione di CAUTI nei pazienti studiati sia elevata quanto la quota di campioni con bassa leucocituria (>1 HPF: 69%) appare improbabile, a causa della breve permanenza in reparto di una quota consistente di questi pazienti al momento del prelievo: 60% dei pazienti con degenza 0-2 giorni. Indicazioni bibliografiche (6, 8, 15) suggeriscono, per questi pazienti, valori compresi tra ~11% e ~25%.

Dal punto di vista operativo si è convenuto di considerare come standard di riferimento la piuria >5 HPF e la batteriuria >10³ CFU/mL (ansa calibrata). Nel gruppo studiato, questi metodi forniscono frazioni di positività ragionevolmente sovrapponibili (45% e 38%, rispettivamente). Mediante la combinazione dei due metodi si è ottenuta una frazione di positivi pari a 34%, contro la quale è stato valutato lo strumento automatico usato in routine presso il nostro laboratorio (laser-nefelometro Uro-Quick™). Nel confronto, Uro-Quick™ ha mostrato un buon valore predittivo positivo (+PV=97%) nel rilevare batteriuria,

ma un insoddisfacente valore predittivo negativo (-PV=86%). L'uso integrato del Par-test ha consentito di migliorare le prestazioni nella determinazione della batteriuria (-PV=97%). Occorre chiarire che questa *performance* è possibile solo se si decide di considerare come positivi (e quindi di fare subculture su piastre) quei campioni che, pur non presentando crescita nei brodi Uro-Quick™, tuttavia rivelano la presenza di antibiotici residui (Par-test +). Questa procedura, non utilizzata nella prassi per la maggior parte dei campioni da "mitto intermedio", diviene obbligata in questo caso (anche se inevitabilmente appesantisce e rallenta il flusso di lavoro). In ogni caso, il sistema Uro-Quick™ ha presentato bassi +PV e -PV nei confronti della presunta infezione: rispettivamente, 66% e 79% senza Par-test; 39% e 89% associando il Par-test ed effettuando sub-colture secondo il criterio citato.

I principali isolamenti microbici delle uricolture positive sono stati: batteri Gram negativi (principalmente *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*), enterococchi e *Candida* spp. L'analisi di questi isolamenti in rapporto alla piuria indicherebbe un ruolo predominante dei batteri Gram negativi nel sostenere l'infezione. L'isolamento di Gram positivi sembra associato piuttosto a fenomeni di colonizzazione o contaminazione (14, 16). Il significato dei campioni con lieviti è incerto, se si prescinde dal rischio legato alla colonizzazione stessa. Anche in presenza di leucociti, *Candida* non è considerato uropatogeno (14); il suo ritrovamento potrebbe tuttavia essere concomitante a patogeni batterici non dimostrabili comunque (anche con le metodiche dirette in piastra) per la presenza di antibiotici residui. Questa considerazione - che richiama l'opportunità di trattare le urine prima di qualunque tipo di semina - valica tuttavia gli intenti del corrente lavoro.

Lo studio dei dati di ricovero (giorni di degenza) e di altri parametri analitici (leucocitosi ematica) ha consentito, nell'ambito di questa revisione dei metodi routine per urinocoltura, anche alcune osservazioni in merito alla congruità della richiesta. Come si è già visto, 60% dei pazienti di questo gruppo presentava permanenze in reparto molto brevi al momento del prelievo di urine. Il sospetto clinico di CAUTI, in teoria, non dovrebbe concentrarsi in questa fase, vieppiù considerando che esso non sembra essere avvalorato dall'aumento di leucociti nel sangue: la conta ematica media dei globuli bianchi è del tutto sovrapponibile nei pazienti con batteriuria e in quelli senza (purtroppo non è stato possibile disporre dei valori medi di temperatura corporea dei due gruppi). Paradossalmente, all'aumentare della degenza l'invio delle urinocolture diveniva sporadico. Il

colloquio con il personale d'area intensiva ha portato a conoscenza di una prassi assistenziale, forse giustificata da ragioni organizzative, che prevedeva l'invio in laboratorio dei campioni raccolti da pazienti con il dispositivo recentemente applicato. Tale procedura - ora abbandonata - è da considerarsi un'impropria coltura "di sorveglianza", piuttosto che un campione clinico vero e proprio. È ragionevole supporre, inoltre, che tale prassi abbia inciso nel determinare la sottostima epidemiologica delle CAUTI, presso il nostro ospedale.

Limitatamente agli aspetti di laboratorio, questa piccola sperimentazione ha fatto emergere l'importanza di non lavorare i campioni urinari di area critica (e in genere tutti i campioni da catetere) unicamente mediante strumento automatico. A questi campioni dovrebbe essere dedicato un flusso di lavoro ad hoc, separato da quello della maggior parte dei campioni da mitto intermedio; tale flusso dovrebbe prevedere la coltura manuale su più terreni, la valutazione accurata dei leucociti urinari, la conoscenza del timing della raccolta (rispetto alla data di inserzione del catetere). In futuro, questo flusso di lavoro dovrebbe essere completato da efficaci (e praticabili) tecniche di rimozione degli antibiotici residui.

BIBLIOGRAFIA

1. Eggimann P, Pittet D. Infection Control in the ICU. CHEST (Critical Care Reviews) / 120 / 6 / December, 2001: 2059-93.
2. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. In: Olmsted RN, ed.: APIC Infection Control and Applied Epidemiology: Principles and Practice. 1996: pp. A-1-A-20.
3. Iverson D, Fayette R, Johnson C, Shigei J, Petersen E, Pezzlo M. Detection of bacteriuria by a rapid, three hours automated screening method. Abstr C-39, ASM. Chicago, USA, 1999.
4. Kass EH. Asymptomatic infections of the urinary tract. Trans Assoc Am Physicians 1956.
5. Kass EH. Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract. Arch Intern Med 1957.
6. Kunin CM. Nosocomial urinary tract infection and the indwelling catheter: what is new and what is true? Chest 2001; 120(1): 10-2.
7. Magrini P, Cerquetani F, Marchianò V, et al. Risultati a 18 mesi di sorveglianza attiva delle infezioni ospedaliere nelle aree intensive dell'ospedale S. Filippo Neri. Abst A15, 1° C.N. SIMPIOS, Bergamo, 2004
8. Rosser CJ, Bare RL, Meredith JW. Urinary Tract Infections in the Critically Ill Patient with a Urinary Catheter The American Journal of Surgery. Volume 177 april 1999.
9. Simerville JA, Maxted WC, Pahira JJ. Urinalysis: A Comprehensive Review. American Family Physician March 15, 2005; 71(6).
10. Soro O, Schito GC, Raggi M. Performance of a new automated method for the detection of bacteriuria. Abst 1598, 7th ECCMID, Vienna, Austria, 1995.
11. Stamm WE, Hooton TM. Management of urinary

- tract infections in adults. *N Engl J Med* 1993; 329: 1328-34.
12. Stamm WE. Measurement of pyuria and its relation to bacteriuria. *Am J Med* 1983; 75 (sup.1b): 53-8.
 13. Tambyah PA, Maki DG. Catheter-associated urinary tract infection is rarely symptomatic: a prospective study of 1,497 catheterized patients. *Arch Intern Med* 2000.
 14. Tambyah PA, Maki DG. The relationship between pyuria and infection in patients with indwelling urinary catheters: a prospective study of 761 patients *Arch Intern Med* 2000.
 15. Warren JW. Catheter-associated urinary tract infection. *Infect Dis Clin N Am* 1997; 1: 823-827.
 16. Wilson ML, Gaido L. Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections in Adult Patients. *CID (Medical Microbiology)* 2004; 38 (15 April).

Marcello Meledandri

UOC Microbiologia e Virologia - Azienda
Complesso Ospedaliero San Filippo Neri
Via F. Martinotti 20 - 00135 Roma
Tel.: 06 3306 2650 Fax: 06 3306 2314
E-mail: m.meledandri@sanfilippoeneri.roma.it
mameled@tin.it