originale

Diagnostica delle peritoniti in pazienti sottoposti a dialisi peritoneale ambulatoriale continua

A. Iurlo, M. C. Medori, D. Crotti
Servizio di Microbiologia Clinica, Azienda Ospedaliera di Perugia, Ospedale "R. Silvestrini", Perugia

Riassunto: *Premesse*: verificare la bontà di un protocollo operativo delle peritoniti in pazienti in CAPD, al fine di ottenere una reale efficacia diagnostica.
Metodi: 181 campioni di pazienti in CAPD, nel corso del quinquiennio 1994-98, sono stati processati secondo un protocollo che comprendeva conteggio dei globuli bianchi, coltura in brodo per emocolture, semina diretta in piastre agarizzate (agar-sangue e agar-cioccolato).
Risultati: le positività sono state il 30.9%. Hanno prevalso i gram-positivi (69%), in particolare stafilococchi. Tra i gram-negativi (31%) hanno prevalso i glucosio non fermentanti. Il 71.4% dei campioni positivi hanno evidenziato un numero di globuli bianchi >500/µl, il 25.0% un numero compreso tra 100 e 500, il 3.6% un numero <100. La correlazione con i tempi di crescita soltanto da brodocoltura ci ha permesso di discriminare tra contaminazioni ed infezioni vere.
Conclusioni: si sottolinea l'opportunità di processare i soli campioni di liquido peritoneale con conteggi di globuli bianchi >100/µl; di valutare tempi e modalità di crescita, di discriminare tra contaminazioni probabili ed infezioni certe o verosimili.

Introduzione

La pratica della dialisi peritoneale ambulatoriale continua (CAPD) è sicuramente e da tempo un'alternativa alla emodialisi nei pazienti con insufficienza renale. L'applicazione di questa procedura è in continua evoluzione nonostante l'inevitabile rischio di possibili complicanze di natura infettiva, in particolare le peritoniti (1, 2).
Da tempo siamo attenti a tali problematiche, sì che in passato è stato da noi protocollato un iter operativo, standardizzato e riproducibile, in accordo anche con i colleghi nefrologi (3). Abbiamo allora voluto verificare, con tale presentazione, la bontà di siffatto protocollo operativo da alcuni anni da noi avviato (3), alla luce di alcune modifiche e semplificazioni apportate in un successivo momento (4), al fine di ottenere una maggiore efficacia diagnostica (5), finalizzata a garantire la più ampia individuazione eziologica di peritoniti, in tempi e con costi adeguati, in tale gruppo particolare di pazienti, cercando di discriminare tra infezione reale, o quantomeno verosimile, e probabile se non certa contaminazione (6, 7, 8, 9).

Materiali e Metodi

Dal 1994 al 1998 sono stati analizzati 181 campioni di liquido peritoneale prelevati nel tempo a 69 pazienti sottoposti a dialisi peritoneale ambulatoriale continua (CAPD), per il sospetto di una peritonite associata (dolori addominali e/o liquido peritoneale torbido).
I campioni venivano analizzati sulla base di un protocollo operativo, in precedenza concordato, e sulla base di precedenti esperienze su tale problematica specifica (3,4).
Nel caso di impossibilità di inviare i campioni immediatamente in Laboratorio, le brodocolture venivano conservate in termostato ed i campioni di liquido peritoneale nel frigorifero del reparto di Nefrologia, e solo successivamente inviati al Laboratorio Microbiologico (vedi Figura 1).
I liquidi peritoneali, inizialmente suddivisi macroscopicamente in limpidi e torbidi, sono stati poi ripartiti in base al numero dei globuli bianchi/µl. Il conteggio dei globuli bianchi è stato eseguito con Coulter STKS. Questo per evidenziare il rapporto tra numero di globuli bianchi ed esito delle indagini colturali, ovvero sia per mettere in risalto, in modo particolare, il legame esistente tra presenza di un numero elevato di globuli bianchi e positività colturale.
Come riportato in Figura 1, sono stati utilizzati brodi specifici quali quelli commercializzati per l'emocoltura e terreni agarizzati non selettivi comunemente utilizzati in laboratorio (agar sangue, agar cioccolato, agar Schaedler). Come brodo specifico è stato utilizzato il sistema Signal per emocolture (Oxoid).

Corrispondenza: dr Daniele Crotti, Servizio di Microbiologia Clinica, Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale "R. Silvestrini", via G. Dottori s.n.c., 06132 S. Sisto, Perugia • telefono e telefax 075 5782217

Figura 1. Protocollo operativo riproposto per la diagnostica delle peritoniti in pazienti sottoposti a CAPD.

Protocollo operativo

Invio liquido peritoneale in laboratorio:

A) limpido/conteggio GB < 500/µl:
   1- flacone come per emocoltura

B) limpido/conteggio GB ≥ 500/µl:
   1- come in 1- di A)
   2- al 3° giorno, se negativo, sottocolture alla cieca su:
      - agar sangue (aerobiosi) }
      - agar cioccolato (microaerofilia) } a 37°C x 3 gg.
      - agar Schaedler (anaerobiosi) }
   3- - al 6° giorno, se negativo, sottocoltura in:
      - IUTM (secondo le consuete indicazioni)

N.B.: il liquido peritoneale va conservato a 4° C x 6 gg

C) torbido/conteggio GB < 500/µl:
   1- come 1- di A)

D) torbido/conteggio GB ≥ 500/µl:
   1- come 1- di A)
   2- eseguire sedimentazione (3.000 g x 30 min):
      - colorazione sec. Gram:
      a) se negativa: come punto 2- e 3- di B)
      b) se positiva: comportarsi in base al caso singolo

Per le identificazioni batteriche sono state adottate le comuni procedure in uso nel Laboratorio, come suggerito nel Manuale operativo interno.

Risultati e discussione

Abbiamo osservato 56 campioni positivi, pari al 30.9% del totale dei campioni esaminati, appartenenti a 48 pazienti, per un totale di 36 peritoniti verosimilmente accertate.
Nelle tabelle I-V sono riportati in dettaglio i risultati ottenuti.
Come già in precedenza (1990-93)(4), abbiamo riscontrato una prevalenza di batteri gram-positivi (69% dei ceppi isolati) ed in particolare di stafilococchi (70% dei batteri gram-positivi isolati).
Tra i ceppi di batteri gram-negativi (31% del totale dei ceppi isolati) hanno prevalso i batteri glucosio non fermentanti (67% circa dei batteri gram-negativi isolati).
Non sono stati osservati, in questo lungo periodo, batteri anaerobi stretti, lieviti o muffe.
In due pazienti si è evidenziata un'associazione di ceppi: in un caso si trattava di *Klebsiella pneumoniae* ed *Escherichia coli*, nell'altro di *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.
In un paziente si sono osservate inoltre ripetute infezioni sostenute da microorganismi diversi.
La significatività della positivizzazione colturale è stata valutata in relazione ai tempi di crescita. La crescita dei microorganismi è stata considerata sempre significativa di infezione se avveniva entro 48 ore; per campioni con un numero di globuli bianchi /µl >500 il tempo di osservazione veniva esteso a 96 ore. La positivizzazione dei campioni dopo 96 ore era giudicata come il risultato di una verosimile contaminazione (al momento del prelievo). Il rapporto tra numero di globuli bianchi/µl ed esito colturale si è mostrato così facendo estremamente significativo (vedi tabella V). In 40 campioni positivi (71.4% dei campioni positivi) è stato rinvenuto, al conteggio, un numero di globuli bianchi/µl >500, mentre soltanto nel 25% dei campioni positivi (14 casi) i globuli bianchi/µl erano compresi tra 100 e 500, e nel 3.6% (2 casi) si sono rilevati inferiori a 100 (probabili contaminazioni).
I risultati ottenuti confermano quanto già da noi in precedenza era stato segnalato (4).
A nostro avviso viene evidenziata l'opportunità di processare microbiologicamente solamente i campioni di liquido peritoneale con un conteggio di globuli bianchi/µl superiore a 100, e di tralasciare quelli con un numero di globuli bianchi inferiore. Inoltre, o comunque, come osservabile in tabella V, un diagramma a scala quale quello proposto potrebbe sufficientemente bene adattarsi per una diagnosi presuntiva di peritonite: con conteggio di globuli bianchi tra 100 e 500 valutare solo le crescite dirette o da brodo entro le 48 ore (vera positività); con conteggi di globuli bianchi >500 prolungare a 72-96 ore l' osservazione ed in caso di crescita batterica dare un significato di verosimile positività per infezione.
Crescite di microorganismi dopo 72-96 ore con conteggi di globuli bianchi <100 o tra 100 e 500/µl (nella nostra presente casistica: un corinebatterio sicuramente saprofita cutaneo e cinque stafilococchi altresì di analogo significato), e crescite di microorganismi oltre le 96 ore con conteggio <100 (un caso, per noi, di *Staphylococcus epidermidis*) o tra 100 e 500 (nel nostro caso *Neisseria subflava* e *Gemella*

morbillorum, batteri tipicamente commensali) o anche > 500 (due *S. epidermidis* e un ceppo di *Streptococcus sp.*) devono indurre a ritenere tali microrganismi come espressione di contaminazioni cutanee al momento della raccolta del liquido peritoneale.

Conclusioni

E' confermata, dunque, l'opportunità di processare soltanto campioni di liquido peritoneale con un conteggio di globuli bianchi >100 /µl. Si è rivelato utile seminare piastre in I giornata con il sedimento del liquido peritoneale quando i campioni, torbidi, presentavano un conteggio di globuli bianchi >500/µl. La colorazione secondo Gram si è rivelata vantaggiosa solamente nei liquidi peritoneali torbidi, con un elevato contenuto di globuli bianchi, quando eseguita dal sedimento del liquido peritoneale medesimo, dopo prolungata centrifugazione.
E' peculiare della dialisi peritoneale continua (CAPD) la variabilità eziologica delle peritoniti nei pazienti ad essa sottoposti, esposti a frequenti complicanze locali di natura infettiva, che richiedono un monitoraggio continuo ed un vigile controllo. Si impone quindi la necessità di protocolli idonei e riproducibili al fine di ottimizzare i criteri operativi microbiologici e di garantire una diagnosi efficace.

Bibliografia

1. Von Graevenitz A, Amsterdam D. Microbiological aspects of peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. Clin Microb Rev 1992; 5: 36-48.
2. Crotti D, Medori MC, Caruso MR, Buoncristiani U. Diagnosi microbiologica dell'infezione dell'emergenza cutanea e del tunnel nei pazienti in CAPD. Giornale di tecniche Nefrologiche e Dialitiche 1998; 1: 41-7.
3. Crotti D, D'annibale ML, Del Sante M, Fonzo G, Vinti AM. Peritoniti in CAPD: diagnosi microbiologica. Microb Med 1993; 8: 202-3.
4. Crotti D, Medori MC, Carobi C, Gubbiotti GP. Aspetti diagnostici ed epidemiologici delle peritoniti in pazienti sottoposti a dialisi peritoneale ambulatoriale continua (CAPD). Giornale di tecniche Nefrologiche

Tabella I. Risultati complessivi

campioni / n° globuli bianchi/µl	LIQUIDO PERITONEALE LIMPIDO				LIQUIDO PERITONEALE TORBIDO				TOTALE CAMPIONI	
	POSITIVI		NEGATIVI		POSITIVI		NEGATIVI			
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
< 100	2	2,7	68	93,2	/	/	3	4,1	73	100%
100 - 500	9	16,1	37	66,1	5	8,9	5	8,9	56	100%
> 500	1	1,9	3	5,8	39	75	9	17,3	52	100%
Totale	12	6,6	108	59,7	44	24,3	17	9,4	181	100%

Tabella II. Risultati complessivi: eziologie. Relazione esistente con il numero di globuli bianchi/µl

	globuli bianchi/µl <100		globuli bianchi/µl 100 - 500		globuli bianchi/µl > 500		TOTALE	
EZIOLOGIE DA:	NUMERO	%	NUMERO	%	NUMERO	%	NUMERO	%
CEPPI GRAM POSITIVI	2	5	11	27,5	27*	67,5	40*	100
CEPPI GRAM NEGATIVI	/	/	3	16,7	15 ••*	83,3	18 ••*	100
TOTALE CEPPI ISOLATI	2	3,4	14	24,2	42 ••**	72,4	58 ••**	100

* = Associazione *Pseudomonas aeruginosa* + *Staphylococcus aureus*
• = Associazione *Klebsiella pneumoniae* + *Escherichia coli*

Tabella III. Risultati positivi: eziologie da gram positivi. Relazione esistente con il numero di globuli bianchi/µl

numero globuli bianchi/µl / Microrganismo	< 100	100 - 500	> 500	TOTALE NUMERO	TOTALE %
Staphylococcus aureus	/	2	6*	8	20
Staphylococcus epidermidis	2	4	12	18	45
Staphylococcus haemolyticus	/	2	/	2	5
STAFILOCOCCHI	2	8	18	28	70
Enterocuccus faecalis	/	/	3	3	7,5
Streptococcus agalactiae	/	/	1	1	2,5
Streptococcus mitis	/	/	1	1	2,5
Streptococcus sp	/	/	2	2	5
Gemella morbillorum	/	1	/	1	2,5
STREPTOCOCCHI	/	1	7	8	20
Corynebacterium sp.	/	1	2	3	7,5
Rhodococcus equi	/	1	/	1	2,5
CORINEFORMI	/	2	2	4	10
TOTALE	2	11	27*	40	100

* = Associazione *Staphylococcus aureus* + *Pseudomonas aeruginosa*

Tabella IV. Risultati positivi: eziologie da gram negativi. Relazione esistente con il numero di globuli bianchi/µl

numero globuli bianchi/µl / Microrganismo	< 100	100 - 500	> 500	TOTALE NUMERO	TOTALE %
Escherichia coli	/	/	2•	2•	11,1
Enterobacter cloacae	/	1	1	2	11,1
Klebsiella pneumoniae	/	/	1•	1•	5,55
Citrobacter freundii	/	/	1	1	5,55
ENTEROBATTERI	/	1	5	6	33,3
Pseudomonas aeruginosa	/	/	4*	4*	22,3
Pseudomonas putida	/	1	/	1	5,55
Pseudomonas alcaligenes	/	/	2	2	11,1
Stenotrophonomas maltophilia	/	/	2	2	11,1
Acinetobacter haemolyticus	/	/	1	1	5,55
Acinetobacter johnsonii	/	/	1	1	5,55
Neisseria subflava	/	/	/	1	5,55
GLUCOSIO NON FERMENTANTI	/	2	10	12	66,7
TOTALE	/	3	15*••	18*••	100

• = 1 associazione *Klebsiella pneumoniac* + *Escherichia coli*
* = 1 associazione *Pseudomonas acruginosa* +Staphylococcus aureus

Tabella V. Positivizzazione colturale: tempi di crescita

numero globuli bianchi/µl / Crescita	< 100	100 - 500	> 500
0 - 48 ore		2 *S. aureus* 2 *S. haemolyticus* 1 *R. equi* 1 *P. putida* 1 *E. cloacae*	6 *S. aureus** 6 *S. epidermidis* 2 *E. faecalis* 1 *S. agalactiae* 1 *S. mitis* 1 *Corynebacterium sp.* 1 *A. haemolyticus* 1 *A. johnsonii* 2 *E. coli* • 1 *E. cloacae* 1 *K. pneumoniae* • 1 *C. freundii* 3 *P. aeurginosa** 2 *P. alcaligenes* 2 *S. malthophilia*
72 - 96 ore	1 *S. epidermidis*	1 *Corynebacterium sp.* 4 *S. epidermidis*	4 *S. epidermidis* 1 *E. faecalis* 1 *Corynebacterium sp.* 1 *Streptococcus sp.* 1 *P. aeruginosa*
72 - 96 ore	1 *S. epidermidis*	1 *N. subflava* 1 *G. morbillorum*	2 *S. epidermidis* 1 *Streptococcus sp.*
TOTALE	2	14	42**••

* = 1 associazione *Pseudomonas acruginosa* +Staphylococcus aureus

• = 1 associazione *Klebsiella pneumoniac* + *Escherichia coli*

e Dialitiche 1997; 4: 7-11.

5. Doyle PW, Crichton EP, Mathias RG, Werb R. Clinical and microbiological evaluation of four colture methods for the diagnosis of peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. J Clin Microbiol 1989; 27:1206-9.
6. Von Graevenitz A, Pfyffer GE, Ickett MJ, Weaver RE, Wuest J. Isolation of an unclassified non-fermentative gram-negative rod from a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993; 12:568-70.
7. Wuest J, Lanzerdorfer LH, von Graevenitz A, Gloor HJ, Schmid B. Peritonitis caused by Actinomadura madurae in patient on CAPD. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9:700-1.
8. Gruner E, Pfyffer GE, von Graevenitz A. Characterization of Brevibacterium sp. from clinical specimens. J Clin Microbiol 1993; 31:1408-12.
9. Marzec A, Heron LG, Pritchard RC, et al. Paecilomyces variotii in peritoneal dialysate. J Clin