



INFEZIONI DEL TORRENTE CIRCOLATORIO

Gruppo di Lavoro Infezioni Paziente Critico

(GLIPaC; Coordinatore Carla Fontana, componenti: Fabio Arena, Marta Argentieri, Paola Bernaschi, Giacomo Fortina, Vesselina Kroumova, Esther Manso, Pier Giorgio Montanera, Pierluigi Nicoletti, Mario Rasso, Gian Maria Rossolini)

Introduzione

La sepsi è un'infezione grave caratterizzata da un'elevata mortalità (stimata cinque volte superiore rispetto a quella attribuita all'ictus e dieci volte superiore a quella dell'infarto), ma, soprattutto, è divenuta molto frequente: nel mondo, ogni due secondi un paziente muore a causa di questa sindrome che colpisce 26 milioni di persone ogni anno. Nell'Unione Europea l'incidenza è elevata: 90 casi ogni 100.000 abitanti e la sua frequenza è in aumento, probabilmente a causa dell'invecchiamento progressivo della popolazione ed a causa della tipologia di pazienti presenti nei nosocomi caratterizzati da patologie complesse e complicate da comorbidità.

Il problema è così sentito che lo scorso 13 settembre 2014 è stato ripetuto il "World Sepsis Day" con lo slogan "Stop Sepsis Saves Lives" con il proposito di aumentare la consapevolezza della popolazione, e stimolare il miglioramento della gestione dei pazienti settici. Il proposito è ambizioso e include la riduzione dell'incidenza del 20% entro il 2020 ([available at www.world-sepsis-day.org](http://www.world-sepsis-day.org)).

Affrontare il fenomeno "sepsi" rappresenta uno degli esempi più eloquenti di lotta integrata che necessita la partecipazione attiva di varie figure del sistema sanitario a partire dall'Intensivista, includendo necessariamente tra queste anche il Microbiologo Clinico. La conoscenza della sepsi passa attraverso l'individuazione di un percorso diagnostico virtuoso che possa contenere o ridurre gli effetti dannosi. In questo percorso parte attiva è svolta dal microbiologo e dagli strumenti diagnostici che ha a sua disposizione, ma anche nel modo in cui integrandoli riesce a ridurre i tempi di refertazione impattando sulle successive scelte terapeutiche del clinico e quindi sull'*outcome*.

L'emocoltura è il *gold standard* nella diagnosi microbiologica della sepsi e/o di febbre di origine ignota. Rappresenta, nella sua gestione "ragionata", un importante contributo del microbiologo nella gestione del fenomeno sepsi in tutte le sue manifestazioni (incluse: le endocarditi, le infezioni correlate a cateteri endovascolari -Catheter Related Blood Stream Infection CRBSI, le febbri di origine ignota, ovvero le sepsi secondarie ad infezioni localizzate come la polmonite, l'artrite settica, le infezioni gravi di cute e tessuti molli e le infezioni endoaddominali complicate).

Primo punto essenziale da considerare è che la presenza di microrganismi nel sangue può avere carattere transitorio (presenza di microrganismi per un breve periodo) ad esempio a seguito di estrazioni dentarie, cateterizzazione urinaria, manovre strumentali invasive; intermittente (o "transitoria ricorrente") associata ad infezioni localizzate e continua, tipica delle infezioni endovascolari, quali l'endocardite, la tromboflebite settica, le infezioni associate alla presenza di dispositivi endovascolari quali i cateteri venosi centrali CVC.

L'isolamento di batteri o funghi dal sangue ha un importante valore diagnostico (conferma del sospetto clinico), prognostico e per la terapia (mirata sulla base dell'identità del microrganismo e

dell'antibiogramma) e la letteratura internazionale è ormai concorde nell'attribuirgli lo stesso valore di un esito microbiologico di un campione di *liquor*.

I tempi dell'emocoltura tradizionale sono, tuttavia, ancora lunghi e spesso poco compatibili con le necessità del clinico di un intervento terapeutico tempestivo. Una buona organizzazione del laboratorio, insieme ad alcuni accorgimenti di ordine tecnico-metodologico possono, tuttavia, contribuire a ridurre i tempi di esecuzione e di trasmissione di risultati al clinico, ancorché preliminari (come l'esame microscopico su flacone positivo e/o i test "diretti", antibiogramma clinico ecc...).

Indagini effettuate nel nostro Paese hanno evidenziato una difformità di comportamenti nelle abitudini prescrittive, nelle modalità di prelievo, nelle procedure diagnostiche microbiologiche, nell'interpretazione dei risultati nonché nella tempistica relativa alla reale fruibilità dell'esito microbiologico da parte del clinico (Goglio & Nicoletti, 2004).

Pare quindi utile proporre un "percorso diagnostico", fondato *sull'Evidence Based Medicine* e sulle più recenti ed autorevoli linee guida internazionali.

Scopo del documento

Questo documento descrive le procedure e le indagini per la diagnosi microbiologica (emocoltura) delle infezioni del torrente circolatorio (Blood Stream Infections: BSI) sostenute da batteri (esclusi i micobatteri) e da funghi, definendo un percorso ottimale che inizia con la formulazione di un sospetto clinico e la decisione di effettuare l'esame, passando attraverso un corretto e ben definito approccio metodologico di laboratorio, per concludersi con la fase interpretativa dei risultati, essenziale ad orientare le decisioni terapeutiche fondate sui risultati dell'emocoltura. Sono inoltre considerati gli indicatori di qualità di processo, la cui analisi è fondamentale per la comprensione e la valutazione del flusso di lavoro legato all'emocoltura.

Emocoltura perché, quando e come

Perché

Rappresenta il miglior strumento per la diagnosi di sepsi in tutte le sue manifestazioni. I costi dell'esame sono ampiamente giustificati dalle informazioni che si possono ricavare: conferma del sospetto diagnostico, identificazione della eziologia microbica ed indicazioni utili per la terapia antibiotica mirata.

Quando

Il prelievo dovrebbe essere effettuato in qualunque momento dell'episodio febbrile, il più precocemente possibile e possibilmente prima dell'inizio della terapia empirica o prima di una sua nuova somministrazione (quando la quantità di antibiotico nel sangue è minima) ([Baron et al., 2013](#); [Dellinger et al., 2013](#)). Solo alcuni lavori hanno cercato di valutare il corretto *timing* per il prelievo. I dati della letteratura mostrano che dopo l'ingresso dei batteri nel circolo vi è una fase di latenza di circa un'ora prima che compaia il brivido e/o la febbre.

Sebbene sia consuetudine raccogliere i campioni ad intervalli di 30-60', la cosa è del tutto arbitraria ([Li et al., 1994](#)), invece, soprattutto se è necessario iniziare una terapia antibiotica empirica, i prelievi devono essere ravvicinati ([Strand et al., 1988](#); [Thompson et al., 1991](#)). Inoltre, non ci sono variazioni significative nel tasso di positività se e quando i prelievi vengono effettuati al picco febbrile, infatti alcuni pazienti possono essere ipotermici anche nella fase batteriemia o essere incapaci di attivare una risposta di tipo febbrile all'infezione.

La febbre da sola quindi non è un utile indicatore, mentre devono essere considerati altri parametri: ipotensione, numero dei globuli bianchi, la presenza/assenza di brivido, marcatori biologici (PCR, PCT

ecc...). È quindi, importante più che stabilire il corretto *timing* di prelievo assicurarsi che il prelievo sia effettuato in maniera adeguata (in termini di volume di sangue prelevato, di numero di prelievi eseguiti e di corretta procedura di prelievo) (Jaimes *et al.*, 2004)

Nella pratica comune i prelievi dovrebbero essere effettuati simultaneamente (o distanziati di 5-15' l'uno dall'altro) alla comparsa della febbre o comunque in caso di sospetto clinico di sepsi e possibilmente prima dell'inizio della terapia.

Nei casi di endocardite acuta valgono le stesse considerazioni (la ripetizione può essere utile per monitorare il successo terapeutico). Nelle endocarditi subacute sono consigliati tre *set* di emocolture in 30-60' ed in caso di negatività altri 3 *set* dopo 24h. (CLSI M47A; Jaimes *et al.*, 2004; Bennet *et al.*, 1994, Riedel *et al.*, 2008).

Come

Per assicurare una maggiore sensibilità è bene effettuare 2 – 3 prelievi (tenendo in considerazione che ciascun prelievo deve essere composto da un flacone per aerobi ed uno per anaerobi) quindi un totale di 4-6 flaconi.

I 3 prelievi sono raccomandati in quanto:

- incrementano la sensibilità dell'esame (probabilità di isolare il patogeno in caso di sepsi). Tale probabilità è, infatti, del: 65-80% con un prelievo, 80-88% con due prelievi, 96-99% con tre prelievi (Riedel *et al.*, 2008; Washington, 1975).
- facilitano l'interpretazione dei risultati (soprattutto nei pazienti ricoverati nelle terapie intensive) nel caso di isolamento di germi di dubbio significato clinico nella attribuzione di un significato clinico ad un germe considerato comunemente contaminante).

È fortemente sconsigliato effettuare un solo prelievo nell'adulto: il volume di sangue analizzato è insufficiente e potrebbe essere causa di risultati falsamente negativi ed in caso di positività non sempre consente di discriminare se si tratta di un patogeno o di un contaminante.

La singola emocoltura come coltura di sorveglianza (pazienti ICU e Ematologici) viene spesso erroneamente usata per predire la sepsi, nella realtà è di scarso valore ed incide negativamente sui costi.

Non ci sono indicazioni ad effettuare più di tre prelievi: la sensibilità dell'esame aumenta solo di un modesto 7%, aumentano invece i costi ed i rischi di anemizzazione iatrogena del malato.

Le modalità di prelievo, conservazione e invio dei flaconi devono essere codificate in procedure scritte da trasmettere a tutti i reparti e da esplicitare nella carta dei servizi del laboratorio.

I prelievi devono essere effettuati in rapida successione, a distanza di 5-10'.

Nell'endocardite, in cui si ha una batteriemia continua, è preferibile, nelle forme subacute, prelevare a distanza di 30-60' (per documentare la batteriemia continua). Trascorse le prime 24h se i primi due-tre *set* risultano negativi, ripetere la campionatura.

Nel sospetto di infezione correlata a CVC, procedere come più oltre indicato.

Non vi sono evidenze significative che il prelievo di sangue **arterioso** aumenti la sensibilità del metodo rispetto al classico prelievo venoso, al contrario aumentano i rischi di isolamento dei contaminanti (Väisänen *et al.*, 1985; Baron *et al.*, 2013)

Il prelievo da **CVC** è sconsigliato per la facilità di contaminazione. Si effettua solo nel sospetto di infezione del catetere (e in tal caso deve essere associato al contemporaneo prelievo da vena periferica), con le modalità riportate più avanti.

I flaconi da usare

Per ogni prelievo inoculare di norma due flaconi (1 per la ricerca di aerobi e 1 per anaerobi). Il prelievo anche in flaconi per anaerobi consente la crescita di batteri anaerobi stretti; inoltre, studi recenti hanno dimostrato come questi flaconi siano più performanti anche nel recupero di stafilococchi, enterococchi ed enterobatteri (Grohs *et al.*, 2007). Per i pazienti pediatrici sono disponibili flaconi appositi (per germi aerobi) che prevedono l'immissione di ridotte quantità di sangue.

Quanto sangue prelevare

Rappresenta la variabile più importante. Diversi studi condotti sia con sistemi automatici sia in manuale dimostrano la relazione diretta che esiste fra il volume di sangue prelevato e la resa diagnostica di un'emocoltura. Si consiglia di immettere 8 ml (non superare mai i 10 ml). Complessivamente devono essere prelevati 20-30 ml, suddivisi nei diversi flaconi. Raccogliendo da 2 a 30 ml si ha un incremento proporzionale della percentuale di positività (es. passando da 2 a 20 ml di sangue prelevato si passa da percentuali del 30 al 50% di positività). Mentre l'incremento che si ottiene elevando il prelievo a 40 ml (vs 30 ml) è di un modesto 7% e quindi non ritenuto utile.

Nei flaconi pediatrici immettere 1-4 ml (anche in relazione al peso del bambino; non più dell'4.5% dell'intero volume ematico) (Baron *et al.*, 2013; Cockerill *et al.*, 2004).

Attenzioni/precauzioni da seguire nel prelievo

La massima attenzione da parte dei clinici/personale infermieristico deve essere riposta nelle fasi di prelievo, in modo da ridurre al minimo la probabilità di contaminazione. Il tasso di contaminazione atteso è di circa il 3% (Baron *et al.*, 2013). È importante che il laboratorio ponga in essere gli opportuni indicatori che consentano di verificare che questa soglia non sia superata (semmai ridotta) ed attivi altresì le opportune strategie di intervento se nota un incremento del tasso di contaminazione. Detto questo, alcuni punti sono essenziali e vanno sottolineati:

1 Il tappo dei flaconi non è sterile e quindi deve essere disinfettato con lo stesso prodotto usato per l'antisepsi della cute, lasciando agire per lo stesso tempo, e ovviamente subito prima del prelievo.

2 I guanti devono sempre essere indossati a protezione dell'operatore.

Non sono necessari guanti sterili, a meno che non sia necessario palpare due volte la cute disinfettata per l'individuazione della vena. Eventualmente disinfettare i guanti con clorexidina.

3 È mandatorio disinfettare la cute prima del prelievo seguendo le indicazioni riportate di seguito:

- pulire l'area cutanea identificata, per 7-8 cm di diametro, con una garza (anche non sterile) imbevuta di alcol isopropilico 70%, procedendo dal centro alla periferia, e lasciar asciugare, (meglio se con sfregamento vigoroso; non sono necessari i movimenti concentrici)
- disinfettare la cute lasciando in sede un impacco con clorexidina 2% in soluzione alcolica per almeno 30"; in alternativa usare tintura di iodio, sempre per 30"; evitare l'uso di iodio-povidone (richiede tempi d'azione superiori al 1' e 30").
- lasciare asciugare l'antisettico, senza rimuoverne l'eccesso con garza. Se si usa la tintura di iodio, pulire la cute dopo il prelievo

La clorexidina non può essere usata nei bambini di età inferiore ai due mesi (anche se alcuni studi recenti ne suppongono l'uso a concentrazione pari allo 0.5% anziché 2%. I dati sono ancora preliminari. In alternativa è possibile usare iodio-povidone (Betadine®) che dovrà però essere lasciato in sito per almeno 2'.

Il prelievo

Procedere come di seguito indicato.

Prelievo con siringa: ago singolo (AS) (questa modalità facilita il controllo della quantità di sangue immessa nei flaconi):

- a. strofinare le mani con soluzione alcolica o eseguire il lavaggio sociale,
- b. procedere alla disinfezione della cute e del tappo del flacone, come sopra descritto,
- c. indossare i guanti,
- d. introdurre l'ago in vena, prelevare 20-30 ml e distribuirli nella misura di 3-8 ml/flacone e comunque egualmente distribuiti nei flaconi aerobi/anaerobi, usando l'accortezza d'inoculare prima il flacone per anaerobi e poi quello per aerobi (questo al fine di evitare che l'ossigeno risalga attraverso l'ago e diffonda nel sangue prelevato).
- e. tenere i flaconi in posizione verticale per controllare la quantità di sangue,
- f. eliminare con attenzione gli aghi (rischio di puntura, soprattutto con la farfalla) negli appositi contenitori

Con set di prelievo a doppio ago (DA) (farfalla) per la raccolta del sangue direttamente nei flaconi (es. vacutainer®) questo dispositivo di prelievo è generalmente preferito perché riduce i rischi di puntura accidentale per l'operatore, anche se non riduce quello di una possibile contaminazione nel prelievo, infatti la percentuale di contaminazione con il dispositivo a DA è del 3.7% contro il 2% dell'ago singolo:

strofinare le mani con soluzione alcolica o eseguire il lavaggio sociale,

- a.-c. procedere come sopra riportato
- d. inserire l'ago in vena e collegare il set di prelievo prima nel flacone per aerobi, poi nel flacone per anaerobi
- e. tenere i flaconi in posizione verticale per controllare la quantità di sangue immesso ed evitare un possibile reflusso del brodo o un volume eccessivo d'inoculazione. Usare l'accortezza di inoculare prima il flacone di aerobi e poi quello per anaerobi. La successione "flacone aerobio o anaerobio" è diversa nelle due modalità ed è finalizzata ad evitare l'immissione di aria nel flacone per anaerobi (i batteri anaerobi muoiono in presenza di ossigeno), in questo caso si deve lasciare fluire eventuale aria residua presente nel tubicino all'interno del flacone aerobio, prima d'inoculare quello per anaerobi.
- f. staccare il flacone dal connettore prima di togliere l'ago dalla vena.
- g. eliminare con attenzione il set di prelievo (rischio di puntura, soprattutto con la farfalla).

È preferibile il prelievo con siringa: facilita il prelievo di una corretta quantità di sangue ed evita un possibile reflusso del brodo in vena.

Non esistono in commercio flaconi sottovuoto capaci di raccogliere una quantità definita di sangue; quindi la quantità immessa deve essere controllata dall'operatore.

Se il prelievo venoso è effettuato anche per raccogliere sangue per altre determinazioni, i flaconi per emocoltura devono essere inoculati per primi al fine di evitare contaminazioni.

È opportuno cambiare ago prima di inoculare il sangue nei flaconi?

Non è opportuno, tantomeno necessario, cambiare ago nel passaggio da un flacone all'altro per scongiurare il maggior rischio di punture accidentali (Ntusi *et al.*, 2010).

I prelievi da un ago-cannula

Si possono effettuare prelievi con ago cannula solo se posizionata al momento ed allo scopo di eseguire emocolture (ad es per la difficoltà a reperire il successivo accesso venoso). Non utilizzare un ago-cannula

già in uso.

Il prelievo nel paziente con CVC, in cui si sospetti (o non si possa escludere) una sepsi catetere-correlata?

In questo caso è indispensabile effettuare il prelievo:

- a. da vena periferica e dal/i catetere/i, contemporaneamente, dopo aver disinfettato il raccordo con soluzione alcolica, se compatibile con il materiale del CVC, senza scartare la prima quantità di sangue prelevato perché è quella con la più alta concentrazione di microbi. Il prelievo quando possibile dovrebbe essere effettuato scegliendo un accesso venoso posto dal lato opposto di dove è posizionato il CVC (es: CVC lato destro, accesso venoso a sinistra)
- b. Immettere rigorosamente la stessa quantità di sangue in ciascun flacone, ciò consentirà l'interpretazione dei risultati sulla base dei tempi di crescita.
- c. da vena periferica, (set: aerobi + anaerobi), prelevato come di consueto

Identificazione dei flaconi

Secondo le modalità in uso nell'Azienda di riferimento. La Microbiologia deve essere in grado di riconoscere i diversi flaconi (sede e momento del prelievo).

Conservazione dei flaconi, se invio differito nel tempo

I flaconi dovrebbero essere inviati al laboratorio di microbiologia nel più breve tempo possibile. Alloggiare quanto prima un flacone, infatti, significa mettere i batteri/funghi nelle condizioni ottimali di crescita e questo si traduce in una contrazione del tempo di positivizzazione. Tuttavia, in casi particolari, è possibile mantenere i flaconi a temperatura ambiente (anche se vi può essere una certa variabilità dovuta al tipo di flacone in uso) fino ad un massimo di 16-18h. Esiste in letteratura un unico riferimento in cui gli autori suggeriscono la termostatazione a 37°C in attesa di alloggiamento nel sistema automatico per le emocolture ([van der Velden et al., 2011](#)).

Tuttavia, la lunga permanenza all'esterno dei sistemi di incubazione automatica dedicati può causare una mancata positivizzazione strumentale del flacone quando successivamente alloggiato in quanto la crescita microbica potrebbe aver già raggiunto il plateau fuori dal sistema e non essere più rilevabile dai sistemi di "detection" dei sistemi automatizzati, ovvero ci potrebbe essere sofferenza microbica con la conseguente mancata crescita dei microrganismi.

I flaconi per emocoltura non devono essere mai refrigerati a 4°C.

Ripetizione del prelievo nei giorni successivi al primo

Non ci sono indicazioni per il prelievo nei giorni successivi per il *follow up*, perché quest'ultimo si basa sui dati clinici. In ogni caso il prelievo non andrebbe mai ripetuto prima di tre giorni dall'inizio della terapia mirata ([Baron et al., 2013](#)).

Ci sono due eccezioni:

- l'endocardite (la persistenza dell'infezione può richiedere una modifica della terapia)
- le sepsi da *S. aureus* in cui il prelievo dopo 2 e 4 giorni può fornire utili indicazioni di complicanze infettive insorte per via ematogena (es. endocardite o osteomielite) o per estensione dell'infezione in altre sedi (tromboflebite settica, ascessi) ([Liu et al., 2011](#)).

Scelta dei brodi per emocoltura

Sono disponibili in commercio numerosi tipi di brodo, tutti con accettabili performance. La formulazione di base più diffusa è l'idrolisato di caseina di soia, a seguire il BHI, Columbia base, Brucella Broth. Contengono in genere anticoagulanti (es. SPS), in grado di neutralizzare l'effetto del lisozima, inibire la fagocitosi, inattivare gli aminoglicosidi, ed inibire in parte la cascata del complemento ([CLSI document M47-A](#);

[Cumitech 1C, 2006](#)).

Alcuni produttori forniscono, soprattutto per le formulazioni a base di soia, dei supplementi per facilitare la crescita dei germi “difficili” (quali: NAD e Emina per neisserie ed emofili).

Non esistono evidenze che supportino l’uso di terreni specifici e/o di flaconi dedicati alla coltura dei miceti ([Wilson et al., 1993](#); [Fuller et al., 2001](#); [Abelson, 2005](#); [Kosmin et al, 2009](#);). L’uso di terreni contenenti inibitori degli antibiotici (es. resine o carbone) è dibattuto: rispetto ai corrispondenti brodi senza inibitori sembrano supportare meglio la crescita di stafilococchi (inclusi i contaminanti) e i miceti ([CLSI document M47-A](#); [Cumitech 1C, 2006](#)).

Modalità e tempi di incubazione

Con i sistemi automatici attualmente in uso, i flaconi vengono incubati a 35°C per 5 giorni (7 giorni i metodi manuali). Il 95-97% dei microrganismi cresce entro tre-quattro giorni d’incubazione, questo vale anche per i germi tradizionalmente ritenuti difficili: *Brucella*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter*, o HACEK.

È raccomandata l’ispezione visiva al ricevimento dei flaconi pre-incubati per evidenziare una eventuale crescita microbica (soprattutto per i sistemi manuali e/o per quelli colorimetrici).

Non è necessario (diversamente a quanto in uso negli ultimi anni) prolungare l’incubazione nel sospetto di endocardite o di brucellosi, piuttosto è preferibile scegliere un metodo di coltura alternativo ad esempio il metodo di lisi e centrifugazione ([CLSI document M47-A](#); [Cumitech 1C, 2006](#)).

Rilievo della positività

I sistemi automatici provvedono alla lettura ogni 10-24’, segnalando eventuali flaconi positivi. Non è necessario procedere a sottocolture cieche.

Il microbiologo deve rilevare dallo strumento le positività in continuo nell’arco della giornata. Non è accettabile la rimozione a *batch* di campioni positivi, ma al contrario i flaconi positivi devono essere prontamente rimossi all’atto della segnalazione strumentale.

In caso di positività dell’emocoltura si procede, nel più breve tempo possibile, a:

- Esecuzione della colorazione di Gram (in caso di negatività può essere utile la colorazione con arancio di acridina o un Gram usando come colorante di contrasto la carbofucsina) o più semplicemente con blue di metilene per evidenziare i batteri che hanno eventualmente perso le affinità tintoriali. I risultati vengono trasmessi immediatamente al medico curante, per telefono e/o via fax e/o altra modalità rapida (telematica). Segnalando al contempo date e ora di positività.
- Il referto riporta la positività dell’emocoltura e i caratteri morfologico-tintoriali dei microrganismi distinguendoli in: Stafilococchi e Streptococchi, Diplococchi Gram-positivi (enterococchi), Cocchi Gram-negativi, Bacilli Gram-negativi, preferire alla definizione generica “difteroidi” con quella più specifica di “Bacilli Gram-positivi o Bacilli Gram-positivi pleomorfi”

Sub-coltura delle Emocolture Positive

Tutte le emocolture positive devono essere sottoposte a sub-coltura su un *set* appropriato di terreni di coltura es.: Trypticase Soy Agar + 5% sangue di montone o Agar Cioccolato (terreni in grado di assicurare la crescita dei germi anche più esigenti) è anche molto diffuso nella pratica comune l’utilizzo di terreni cromogeni che possano fin da subito orientare nell’identificazione microbica. Le sub-colture dovrebbero essere incubate in aerobiosi ed anaerobiosi e agar cioccolato in CO₂. Sta a ciascuna Microbiologia decidere se seminare anche altri terreni per una più rapida identificazione dopo 24 ore di incubazione (es. agar lattosato per Gram-negativi o terreno selettivo differenziale per Stafilococchi o terreni cromogeni) o sulla base del risultato dell’esame microscopico.

Emocolture positive strumentalmente, positive/negative al Gram, ma negative alla sub-coltura

Rappresentano una quota esigua di tutte le emocolture, ma meritano in ogni caso attenzione in quanto in genere i patogeni che si recuperano sono germi esigenti o germi la cui difficoltà di crescita è già nota ed ampiamente descritta. In questi casi la prima cosa da fare è:
 verificare la curva di crescita microbica

1) se la curva depone per una reale crescita microbica (curva esponenziale) si deve procedere seguendo a scelta (e secondo le disponibilità del laboratorio) o anche combinando i seguenti punti:

- a) arricchimento in brodo e relativa subcoltura in terreni a media selettività ovvero recuperando il pellet batterico post arricchimento e procedere ad identificazione mediante tecnologia MALDI-TOF e/o biologia molecolare ovvero se sufficiente utilizzare i sistemi di identificazione tradizionali
- b) tecniche di biologia molecolare
- c) coltura su terreni specifici addizionali rispetto alla pratica comune

2) se la curva di crescita risulta monotona (da attività dovuta ai leucociti del paziente) verificare la conta delle cellule della linea bianca del paziente ed il volume d'inoculo del flacone (spesso un volume eccessivo d'inoculazione può essere causa di false positività) per sostenere o meno la seconda ipotesi. Se la conta elevata e/o siamo in presenza di un volume eccessivo d'inoculo ed il Gram ha dato esito negativo, si può concludere per un falso positivo dovuto alla attività leucocitaria ([Fontana et al., 2009](#); [Kroumova et al., 2010-2012](#), [UK S.O.P.Microbiology 2014](#))

Tests di identificazione diretti (dalla esecuzione di coagulasi alla identificazione molecolare).

Negli ultimi anni è stata particolarmente ricca la letteratura che propone di abbinare alle tecniche di coltura tradizionale tecniche innovative, rapide ed altamente specifiche che consentono una notevole riduzione dei tempi di refertazione. La riduzione del Turn Around Time (TAT) è divenuta una costante nella diagnosi di sepsi perché riduce la durata di un'eventuale terapia inappropriata ed i tempi della terapia empirica ad ampio spettro, impattando in modo significativo sull'*outcome* del paziente e sulla spesa correlata al consumo di antibiotici. I caratteri riassuntivi sono indicati in tabella 1.

Tabella 1

Test diretti	Richiede strumentazione dedicata	Vantaggi	Limiti	Costi
Coagulasi	No	Semplicità	Bassa standardizzazione	Bassi
FISH	Si (a seconda del tipo di metodologia)	Rapidità, sensibilità e specificità	Richiede Personale esperto	Medio alti
MALDI TOF	Si	Semplicità, rapidità elevato numero di specie identificabili sia batteriche che fungine	Limiti sui campioni polimicrobici (massimo fino a due specie)	Costo test irrisorio, costo strumentazione elevato
Metodi	Si	Rapidità e semplicità	Numero di specie	Elevati

molecolari da flacone positivo		elevata sensibilità e specificità (possibilità di identificare più specie contemporaneamente e alcuni markers di resistenza)	limitate	
Metodi molecolari da sangue	Si	Rapidità buona sensibilità, significato clinico del positivo non sempre chiaro	Procedure in genere lunghe e complesse	Elevati

Test diretti tradizionali

I test diretti anticipano anche di 24 ore o più i risultati definitivi. Diversi autori segnalano la possibilità di identificare i microrganismi con pannelli manuali, strumenti automatici, singoli test biochimici o metodi di biologia molecolare. Considerato il diverso significato clinico di *S. aureus* e Stafilococchi coagulasi negativi può essere utile effettuare una coagulasi rapida in provetta con lettura a 2 ore: il test è affidabile e poco costoso. I due test più eseguiti sono quello della coagulasi e della ossidasi, secondo le indicazioni di seguito riportate in letteratura che vale la pena di specificare (Kroumova *et al.*, 2012):

- VANTAGGI: i) semplicità di esecuzione; ii) costi limitati ed alla portata di molti laboratori; iii) rapidità di esecuzione.
- LIMITI: scarsa standardizzazione e difficile applicazione per numeri elevati di campioni.

FISH

Affianco alla microbiologia tradizionale ha trovato spazio negli ultimi anni l'uso di tecnologia FISH (Fluorescent in Situ Hybridization) anch'essa utilizzata per identificare, a positività strumentale del flacone, il patogeno coinvolto. I sistemi a disposizione sono semplici di facile applicabilità, ma presentano alcune criticità: dall'esperienza richiesta all'operatore nella lettura di preparati fluorescenti al limitato numero di specie microbiche identificabili e talora anche dai costi non del tutto competitivi. Esistono fondamentalmente due versioni: la FISH tradizionale (che comporta la fase, abbastanza laboriosa, di lavaggio del preparato per allontanamento dell'eccesso di sonde) e bbFISH (beacon based Fluorescent in Situ Hybridization) che sfruttando al contrario la tecnologia delle sonde *beacon* non è penalizzata dalla fase dei lavaggi del preparato. Le sonde *beacon* sono, infatti, studiate e disegnate in modo tale che se non appaite con il DNA *target* presente nel campione si richiudono su se stesse fornendo un preparato più pulito (si riduce il *background* fluorescente) (Harris and Hata, 2013; Sakarikou *et al.*, 2014; Leitner *et al.*, 2013). Quale che sia il tipo di sonde usate nella tecnologia FISH, questa si è dimostrata un approccio particolarmente vincente, soprattutto nei centri che funzionano da *spoke* di *Hub* situati anche a notevole distanza, consentendo di accorciare (e quindi di riguadagnare il tempo utilizzato per il trasferimento del campione da un centro all'altro) i tempi di identificazione del patogeno.

- VANTAGGI: i) rapidità di ottenimento dei risultati; ii) alte sensibilità e specificità.
- LIMITI: alcuni particolari kit hanno procedure non sempre rapide e pratiche da eseguire. Richiede un occhio esperto nella lettura della fluorescenza, il costo non è trascurabile.

SPETTROMETRIA DI MASSA: MALDI-TOF

Al pari della FISH, ma con una più capillare presenza nei laboratori di microbiologia è l'utilizzo della

tecnologia MALDI-TOF per l'identificazione rapida di patogeni direttamente da flacone positivo di emocoltura.

Esistono dati solidi che dimostrano che la introduzione della identificazione rapida con MALDI-TOF da emocoltura porti significativi benefici in termini di riduzione della mortalità nei pazienti con sepsi (Huang *et al.*, 2013).

I *pellets* vengono preparati dalle brodo colture positive attraverso passaggi di lisi, filtrazione e centrifugazione, per i quali esistono diverse metodologie (Loonen *et al.*, 2012; Martiny *et al.*, 2012; Meex *et al.*, 2012; Lagacé-Wiens *et al.*, 2012; Fothergill *et al.*, 2013; Clercet *et al.*, 2013) e dispositivi commerciali utilizzabili (Martinez *et al.*, 2014). Esistono tuttavia alternative, ugualmente valide, come Centrifugazione e Semina su piastra (CS), Arricchimento in brodo e Centrifugazione (AC), Semina Diretta su piastra (SD) (Sarti *et al.*, 2014).

Molti laboratori, negli ultimi anni, hanno implementato flussi di lavoro che prevedono la semina del brodo di emocoltura positivo su terreni agarizzati, una fase d'incubazione ridotta (in genere 6-8 ore) e, infine, l'identificazione tramite MALDI-TOF. Questo permette di fornire l'identificazione con circa 12 ore di anticipo, a basso costo e con un impatto minimo sulla organizzazione del laboratorio.

I campioni sono poi analizzati nello spettrofotometro e gli spettri di massa acquisiti sono comparati con una *library* di riferimento utilizzando un software dedicato. In accordo con i criteri proposti dalla casa produttrice ed in base al valore di uno score, si ottiene una identificazione affidabile a livello di specie nel 66-87% (Vlek *et al.*, 2012). Gli spettri sono calibrati usando le proteine ribosomiali di un ceppo di controllo di *Escherichia coli*.

Il grande vantaggio di questo tipo di approccio sta nella possibilità, praticamente illimitata, di identificare batteri e miceti con costi contenuti (ad esclusione del costo strumentale) attraverso una metodica estremamente semplice. Allo stato attuale, la limitazione è data dall'impossibilità di identificare i patogeni su campioni polimicrobici. Infatti, nel caso di infezioni sostenute da più microrganismi, ne viene identificato soltanto uno di quelli che tradizionali crescono in piastra dopo la subcultura. Esistono anche riferimenti italiani relativi a studi multicentrici che descrivono l'utilizzo di tale metodica nella routine quotidiana e che, pur documentandone l'efficacia, non ne nascondono le criticità (Sarti *et al.*, 2014)

Relativamente ai meccanismi di resistenza vi sono alcuni studi preliminari che possono risultare interessanti (Romero-Gómez *et al.*, 2013; Hoyos-Mallecot *et al.*, 2013).

- VANTAGGI: i) facilità di esecuzione; ii) alta specificità e ampio spettro di specie riconosciute (con possibilità di espansione); iii) minimo impatto sulla organizzazione del laboratorio; iv) basso costo (se si esclude la strumentazione).
- LIMITI: impossibilità di identificare i patogeni su campioni polimicrobici.

METODI DI BIOLOGIA MOLECOLARE DA FLACONE POSITIVO

Le tecniche molecolari che prevedono la ricerca di DNA batterico, per loro natura, si prestano particolarmente alla diagnosi rapida direttamente da campione clinico. Negli ultimi anni sono fiorite sul mercato numerose alternative che accoppiano alla possibilità di identificare i principali patogeni responsabili di sepsi, direttamente da brodo di emocoltura positivo, la capacità di ricercare alcuni determinanti genetici di resistenza agli antimicrobici. Nel complesso si tratta di *test* molto semplici da eseguire che, al momento, consentono l'analisi di un solo campione alla volta. Questo può rappresentare un limite nella loro applicazione in laboratori di grandi dimensioni.

Una tecnologia di recente introduzione, estremamente promettente sia per la sua sensibilità e specificità ma soprattutto per la sua facilità d'uso, è quella nota come Film array platform. Si tratta di una multiplex PCR abbinata ad una lettura automatizzata i cui risultati sono fruibili in 1h. Si tratta di dispositivi pronti all'uso

(film array pouch) che contengono nel loro interno tutti i reagenti necessari per la estrazione degli acidi nucleici, la purificazione, l'amplificazione e l'ibridizzazione (in triplicato per ogni sonda) verso diversi *target* sia batteri che lieviti: 8 Gram-positivi, 11 Gram-negativi, 4 lieviti e tra marcatori di resistenza (Altun *et al.*, 2013). Il sistema per la sua semplicità d'uso (all'operatore è richiesta la sola reidratazione dei reagenti e l'aggiunta del campione) si configura a tutti gli effetti come un "*point of care test*" il cui utilizzo potrebbe essere immaginato anche in regimi d'urgenza. Altrettanto noti i metodi basati sull'utilizzo del microarray, in questo caso in genere si tratta di sistemi a "*two-thre step work-up*", in cui in genere l'estrazione è di tipo "*bead-based*", non prevedono amplificazione ma il DNA estratto dal campione è ibridizzato su piattaforme automatizzate con DNA *target* ossia sonde a cattura (anche in questo caso presenti in triplicato sull'array) immobilizzate su microarray (che possono essere di vetro o in gel). L'ibridizzazione DNA campione/*target* viene di solito rilevata mediante una *detection probe* (nanoparticle-coniugate). Questa tipologia di metodi presentano una sensibilità fino a 1000 volte maggiore rispetto alla classiche sonde fluorescenti (Blake *et al.*, 2013). Quale che sia la tecnologia impiegata il grande vantaggio di questi sistemi è la notevole contrazione del TAT (30-60 min) e soprattutto la possibilità di trattare anche emocolture polimicrobiche. Esistono anche altre metodiche simili ed altre sono in introduzione ed in rapida evoluzione, che offrono un ventaglio ancor più ampio ventaglio di specie microbiche identificate e la "detection" di molteplici meccanismi di resistenza

- VANTAGGI: i) semplicità di esecuzione; ii) elevata specificità; iii) notevole sensibilità (in teoria sono necessarie poche molecole di DNA batterico per avere una positività); iv) capacità di poter ricercare anche geni correlati alla resistenza agli antibiotici v) identificazione in colture polimicrobiche.
- LIMITI: fasi di disegno del *test*, è necessario selezionare un numero finito di specie/geni di resistenza che saranno i *target* del *test* e quindi specie non incluse tra i *target* non verranno mai identificate. Inoltre, attualmente, il costo di un analisi non è trascurabile e può essere fuori dalla portata di alcuni laboratori.

METODI MOLECOLARE DIRETTI DA CAMPIONE DI SANGUE

Si tratta di approcci molecolari che partono direttamente dal sangue intero, ossia non richiedono il passaggio della positività dell'emocoltura. Nonostante siano disponibili già da alcuni anni, questi *test* non hanno avuto un'ampia diffusione nei laboratori. Partendo direttamente da campione soffrono di una serie di criticità, quali: sensibilità analitica, maggiore laboriosità (sono necessari dei passaggi di estrazione del DNA e successive amplificazioni) che li rendono applicabili solo nei centri ove sia presente personale ben addestrato alla tecniche di biologia molecolare, reale significato clinico delle positività (ossia il DNA del/i microrganismo/i identificati ha un reale legame con la clinica, o si tratta di DNA residuo, ossia germi non vitali, presente nel torrente circolatorio del paziente?). Mancano, inoltre, studi prospettici che leghino il risultato di questi saggi con le relative eventuali decisioni cliniche e soprattutto con l'outcome del paziente. Pertanto, ad oggi, è ancora molto difficile stabilire come integrare l'uso di queste tecniche con il percorso diagnostico tradizionale. Alcuni autori suggeriscono di utilizzarle (affiancandole alla emocoltura tradizionale) sono nei pazienti con una over-espressione CD 64 sui neutrofili, ma anche questo è un saggio non effettuato di *routine* e disponibile in tutti i centri (Skvarc *et al.*, 2013).

Attualmente i sistemi in commercio si basano principalmente sulla tecnologia della *multiplex Real time PCR* che identificando mediamente dai 25 ai 40 patogeni (tra quelli più frequentemente riscontrati come causa di sepsi); altri si basano su una *broad range PCR* (18S e 16S rDNA) che consente l'identificazione di più di 345 specie batteriche e fungine (Skvarc *et al.*, 2013). Alcuni spunti di riflessione rilevanti, che emergono da studi comparativi sono: generalmente questi sistemi mostrano una maggiore sensibilità, se confrontati alla cultura tradizionale, e questo è particolarmente vero nei pazienti in terapia antimicrobica. Il TAT è

sensibilmente inferiore rispetto ai percorsi diagnostici convenzionali. Tuttavia, altrettanto significativa è la percentuale di patogeni clinicamente rilevanti non identificati dal sistema (il tasso medio di falsi negativi oscilla dall'8% al 24% ma in alcuni casi si arriva al 50%). Emerge, altresì, una maggiore sensibilità del sistema negli studi condotti su popolazione pediatrica (a causa, probabilmente, di una maggiore carica microbica dei patogeni coinvolti). Date le sue limitazioni in generale la posizione di più autori è di utilizzare questi sistemi in affiancamento alla coltura tradizionale (Skvarc *et al.*, 2013). Alcuni sistemi, inoltre dopo una iniziale amplificazione prevedono una fase di sequenziamento, pertanto richiedono tempi più lunghi (TAT medio 8-10h) e personale estremamente formato. A suo vantaggio di quest'ultimi la notevole sensibilità e specificità del metodo che in alcuni casi è perfino superiore a quella dei metodi colturali tradizionali (Skvarc *et al.*, 2013). Inoltre, in molti casi l'analisi delle sequenze può essere problematica (esistono un siti dedicati), ed in questi casi è necessario ricorrere ad altri siti web dedicati ove sono disponibili software di elaborazione ed interpretazione più raffinati, come il RipSeq (iSentio AS, Paradis, Norway) ma ovviamente i tempi si allungano e soprattutto i costi si innalzano (l'accesso a questi siti non è libero) (Skvarc *et al.*, 2013; Kommedal *et al.*, 2011).

- VANTAGGI: i) rapidità di ottenimento dei risultati.
- LIMITI: correlazione con outcome clinico non definita, costi elevati e procedure complesse

Prospettive future

Un approccio innovativo, che potrà in futuro apportare novità nel panorama descritto è il sequenziamento massivo del genoma batterico. L'applicazione di questa tecnica al sangue in corso di sepsi o al brodo di emocoltura positivo potrebbe fornire informazioni dettagliate e rapide sia con approccio "targeted" che "whole genome". Si tratta tuttavia di tecniche di recentissima introduzione in microbiologia il cui ruolo rimane ancora da esplorare.

Un particolare accenno alle emocolture polimicrobiche

Un criticità che emerge da quasi tutti i metodi non convenzionali è la possibilità di identificare tutti i patogeni coinvolti nelle sepsi polimicrobiche. In questo caso la scelta è piuttosto obbligata verso l'approccio molecolare (ammesso che il ventaglio di patogeni coinvolti sia presente fra quelli identificabili dai vari sistemi). Esiste, tuttavia, la possibilità di identificare i patogeni mediante sequenziamento e interpretazione degli elettroferogrammi misti utilizzando il sito RipSeq (iSentio AS, Paradis, Norway) (Kommedal *et al.*, 2011). Non è facile, in questo caso, dare informazioni circa il TAT del metodo in quanto fortemente influenzato dalla manualità dell'operatore e dalla strumentazione a disposizione per il sequenziamento medesimo.

Antibiogramma diretto o "clinico"

Il vantaggio dell'esecuzione dell'antibiogramma diretto da emocoltura risiede nella sensibile contrazione dei tempi di refertazione che si riducono anche di 24 rispetto alle procedure tradizionali. La maggiore criticità viene, tuttavia, evidenziata nella standardizzazione dell'inoculo batterico (EUCAST web site). EUCAST nel suo documento non ne incoraggia l'utilizzo soprattutto sui sistemi automatizzati per i quali non vi siano precise indicazioni da parte del produttore e comunque suggerisce di eseguire in ogni caso l'antibiogramma tradizionale su isolato. Tuttavia, nell'ottica della accorciamento dei tempi di refertazione ed al fine di fornire quanto prima indicazioni utili per il clinico e sempre in comune accordo con quest'ultimo si può ricorrere all'utilizzo di una serie di procedure/metodi che abbiano la valenza di un "antibiogramma clinico" da affiancare a quello tradizionale, i cui risultati possono essere predittivi delle MIC ottenute con il metodo di riferimento.

L'antibiogramma diretto può essere effettuato con agar-diffusione, ma anche con sistemi automatici e semi-automatici. In genere si parte dal prelievo di una aliquota di brodo della brodo cultura positiva che viene centrifugato ed il *pellet* batterico viene utilizzato per preparare l'inoculo *standard* (Fang-Lan *et al.*, 2011; Chapin *et al.*, 2003; Waites *et al.*, 1998). Esiste anche la possibilità di eseguire, sempre da flacone positivo, un "antibiogramma clinico" che ha il solo significato (solo per molecole selezionate, ad esempio quelle usate in terapia empirica), di "predire" nella singola combinazione germe-antibiotico l'efficacia o meno della molecole testata (Kroumova *et al.*, 2010; Rondinelli *et al.*, 2010; Barocci *et al.*, 2010).

Identificazione ed antibiogrammi definitivi

Sulle colonie isolate deve sempre essere effettuata l'Identificazione a livello di specie e l'antibiogramma definitivo con misura della MIC.

Conservazione dei ceppi.

È bene conservare i ceppi:

- conservando le piastre (meglio se sigillate) in frigorifero per una–due settimane (o i flaconi di emocoltura positivi).
- Preferire, quando possibile, la conservazione a lungo, mediante congelamento a -20° o -80°C o altre modalità, degli isolati.

Le piastre con tutti gli isolati da emocoltura positiva devono essere disponibili ed è bene conservarle per 1-2 settimane in frigorifero, meglio se sigillate. In alternativa si possono mantenere direttamente i flaconi con le brodo colture. Quando possibile, è preferibile congelare gli isolati a -20°C o -80°C o con altre modalità.

Risultati microbiologici di dubbia interpretazione

1) **Differenziare un contaminante da un reale patogeno** in alcuni casi può rappresentare una vera sfida. Si stima che la quota "non evitabile" di falsi positivi sia attorno al 3% (prevalentemente costituita da stafilococchi coagulasi-negativi (CONs), *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, streptococchi viridanti, *Aerococcus* ecc. In questi casi, soprattutto quando si isola un CONs in un paziente con CV, è impossibile sulla base di una sola emocoltura (un solo prelievo) confermare la contaminazione o sospettare batteriemia catetere correlata.

2) **Segnale di positività con striscio positivo al Gram e sottocoltura negativa.** Sono stati osservati con specie di *Abiotrophia* spp (variante nutrizionale degli streptococchi), *S. pneumoniae* che hanno subito un certo grado di autolisi, e microrganismi esigenti che non sono in grado di svilupparsi sui terreni di coltura usati di routine. Si deve considerare l'utilizzo di terreni addizionali o arricchiti, incubazioni prolungate o atmosfere alternative per la crescita, considerando la loro morfologia al microscopio e le indicazioni cliniche. È anche descritto l'utilizzo di sistemi sofisticati basati sul pre-arricchimento e la valutazione della crescita microbica con tecnologia del *light-scattering* che hanno dimostrato essere di valido sostegno (Fontana *et al.*, 2009, Kroumova *et al.*, 2010-2012).

3) **Segnale di positività, Gram e sottocoltura negativi.** Verificare la curva di crescita dei sistemi automatici per escludere la possibilità di una sub-coltura falsamente negativa prima di ritenere il segnale falsamente positivo. I motivi della falsa positività sono spesso di tipo multifattoriale, ma prevalentemente imputabile all'attività metabolica delle cellule della linea bianca del paziente (soprattutto se il flacone risulta sovra inoculato).

4) **Segnale negativo con Gram e sottocoltura positiva.** Alcuni microrganismi possono essere presenti nei

brodi, ma manifestare segnali di crescita minimi o assenti. Questa evenienza può presentarsi, ad esempio, nel caso di *Brucella* spp, *Francisella* spp, *Campylobacter* spp o *Legionella* spp, *Cryptococcus* e *Candida glabrata*. Al sospetto clinico di una batteriemia/fungemia imputabile a questi microrganismi può essere utile ricorrere fin dall'inizio a tecniche di coltura alternative, ad esempio il sistema di lisi e centrifugazione.

Biosicurezza

I microrganismi cresciuti nei flaconi di emocolture e/o nelle sottocolture possono causare infezioni al personale di laboratorio a seguito di punture accidentali, o per contatto con la cute e le mucose, per aerosol.

È importante ricordare, anche se non entriamo nel merito degli aspetti organizzativi, strutturali, della necessità di disporre di strumentazione adeguata e di cappe a flusso laminare, nonché di dispositivi di protezione individuale, previsti dalle ex L626 ora testo unico DL 81/2008.

Va sottolineato che le emocolture possono essere processate solo nelle microbiologie che possano assicurare la protezione della salute dei lavoratori e personale adeguatamente formato.

Referto ed interpretazione dei risultati

I risultati dell'emocoltura, positiva o negativa, possono avere un impatto importante nella cura del malato (*critical values*). Devono quindi essere comunicati al clinico tempestivamente, man mano si rendono disponibili, tenendo traccia della produzione/invio.

I meccanismi di comunicazione sono ovviamente legati all'organizzazione della microbiologia. Ciò nonostante si possono fornire alcune indicazioni.

Stato del campione

Grazie all'ausilio ed al sostegno dei sistemi informativi di prescrizione oltre che di consultazione dei referti il clinico *dovrebbe* poter sapere in ogni momento se:

- è stata prescritta l'esecuzione dell'emocoltura
- il prelievo è stato eseguito
- il campione è pervenuto alla microbiologia (se si con quale tempistica, delta fra ora di prelievo e ora *check in*)
- sono state richieste indagini particolari
- c'è stata crescita di batteri/funghi
- sono disponibili risultati preliminari o definitivi

Referti preliminari

- Al primo riscontro di positività, dovrebbero essere tempestivamente comunicati al clinico i risultati del Gram.
- Le modalità di comunicazione, verbali e/o per scritto, devono essere concordate con i clinici per assicurare una comunicazione rapida ed accurata e per garantire la sicura ricezione da parte del clinico (la tracciabilità degli eventi deve essere conforme alla norma UNI EN ISO 9001)
- Referti preliminari (identificazione o antibiogrammi diretti) devono essere trasmessi per via cartacea o elettronica (in entrambi i casi il referto preliminare deve poter essere facilmente identificato come preliminare rispetto al definitivo).
- Il referto finale deve riportare l'identificazione e l'antibiogramma definitivo dell'/degli isolato/i. Deve indicare chiaramente eventuali dati discordanti con i risultati preliminari, specificando che i dati finali rappresentano il dato corretto.

Contaminanti

I microrganismi isolati da emocoltura possono non avere un ruolo eziologico, ma di contaminazione. La contaminazione, anche nelle migliori casistiche, non scende al di sotto del 3% (Baron *et al.*, 2013).

La microbiologia può contribuire a ridurre la contaminazione delle emocolture, diffondendo indicazioni sulle corrette modalità di raccolta (prassi già molto diffusa negli Ospedali italiani), promuovendone l'applicazione e verificandone il rispetto.

Microrganismi contaminanti (quali: *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp, *Propionibacterium* spp, Stafilococchi coagulasi negativi, *Aerococcus* spp, *Micrococcus* spp) possono però in particolari situazioni assumere il ruolo di veri patogeni.

La microbiologia dovrebbe:

- Dotarsi di un algoritmo interpretativo per riconoscere i contaminanti e valutare periodicamente i tassi di contaminazione.
- Ridurre al minimo l'identificazione dei contaminanti
- Non effettuare l'antibiogramma sui contaminanti oppure effettuarlo senza però riportare i risultati nel referto in modo da poterlo avere disponibile in caso di isolamento ripetuto dello stesso germe da altri set di emocoltura Conservare per alcuni giorni i ceppi così da consentire ulteriori approfondimenti in caso di successivi isolamenti dello stesso germe.
- Eseguire invece sempre identificazione di specie ed antibiogramma in caso di isolamenti multipli da uno stesso paziente
- Riportare una nota a commento del risultato sottolineando il possibile / probabile significato di contaminazione del microrganismo isolato.
- Diffondere annualmente, insieme ai dati sui patogeni, i tassi di contaminazione, suddivisi per reparto di provenienza.

Endocardite

L'endocardite infettiva (EI) rappresenta l'infezione delle valvole cardiache e/o di altre aree dell'endocardio. Si manifesta di solito in soggetti con pre-esistenti lesioni cardiache, protesi valvolari, difetti congeniti, esiti di malattia reumatica o malattie valvolari degenerative dell'anziano. Sulla superficie endocardica danneggiata si deposita un coagulo di fibrina e piastrine che viene colonizzato da microrganismi penetrati nel torrente circolatorio, formando in tal modo delle vegetazioni infette. Sulla superficie, ma anche nella parte profonda della vegetazione, possono essere presenti microrganismi vitali, condizione che rende difficile il trattamento con antimicrobici. La diagnosi si basa sui criteri diagnostici di Duke, in cui gioca un ruolo importante la positività dell'emocoltura.

Nel sospetto di endocardite causata da *S.aureus*, le emocolture devono essere eseguite il più presto possibile per evitare, data la virulenza del microrganismo, ritardi nel trattamento. Le endocarditi da *S.aureus* si possono sviluppare in corso di sepsi anche su valvole normali e possono essere una temibile causa di infezione ospedaliera.

Nei casi di endocardite subacuta si raccomanda il prelievo di 3 set, distanziati di almeno 30-60'. In caso di negatività può essere utile ripetere il prelievo (2 set) nella giornata successiva ed effettuare sottocolture almeno in agar cioccolato, incubando in CO₂ per 48-72 ore.

In caso di persistente negatività considerare:

- La falsa negatività legata a precedente terapia antibiotica
- l'eziologia da microrganismi non coltivabili o difficilmente coltivabili (es. *Tropherymawhipplei*, *Rickettsia* spp, *Bartonella* spp) o con specifiche esigenze culturali (es. *Abiotrophia* spp, *Granulicatella* spp)
- diagnosi con procedure alternative (tecniche di concentrazione: Isolator, sierodiagnosi o tecniche molecolari)

Batteriemie catetere correlate

L'inserzione di cannule e di cateteri intravascolari (CVC), che assicurano un accesso permanente al torrente circolatorio, costituisce uno strumento sempre più utilizzato nella cura dei pazienti (per la somministrazione di liquidi o farmaci, per il monitoraggio emodinamico e l'emodialisi, ecc.).

Una possibile e temibile complicanza dei CVC è rappresentata dal possibile instaurarsi di una infezione (*catheter-related bloodstream infection*), dovuta a microrganismi che si annidano in biofilm adesi alla parete dei cateteri (colonizzazione della cannula o *hub*) o che colonizzazione prima causando infezione poi la sede di inserzione della cannula (o *exit site*).

Nonostante la loro frequenza, le infezioni catetere correlate sono di difficile diagnosi.

Clinicamente si possono avere quadri molto suggestivi (infiammazione dell'*exit site* e febbre), ma anche quadri sfumati con assenza di infiammazione locale e segni clinici aspecifici suggestivi di sepsi.

Il microbiologo può contribuire alla diagnosi, senza rimuovere il CVC, (diagnosi conservativa) effettuando indagini su prelievi della cute peri-catetere o sul *brush* endoluminale e successiva colorazione con arancio di acridina, anche se su questa ultima procedura numerosi autori sostengono che il rischio di disseminazione a distanza dei germi che hanno colonizzato il CVC *post brushing* è molto elevato.

La diagnosi d'infezione catetere correlata può basarsi anche sull'uso di emocolture comparative eseguendo il prelievo contemporaneamente da CVC e da vena periferica. Ovvero dopo la rimozione del catetere (diagnosi non conservativa), eseguendo indagini colturali della punta (non oggetto di questo documento) (Tabella 2).

Tabella 2

Risultati delle emocolture		Interpretazione
Isolamento di uno stesso ceppo da CVC e vena periferica	Carica o tempi di crescita significativi	Fortemente suggestivo di infezione CVC correlata, in assenza di altre fonti di infezione
	Carica o tempi di crescita non significativi	Suggestivo per /possibile infezione CVC correlata, in assenza di altre fonti di infezione
Positiva solo da CVC		Inconclusivo per infezione CVC correlata. Possibile colonizzazione del catetere o contaminazione durante la raccolta
Positiva solo da vena periferica		Inconclusivo per infezione CVC correlata. Suggestivo però in caso di isolamento di <i>S. aureus</i> o <i>Candida spp</i> , in assenza di altre fonti di infezione
Negativa da CVC e da vena periferica		Infezione catetere correlata: improbabile

Due i metodi diagnostici:

- la coltura quantitativa (lisi - centrifugazione). E' forse il metodo di riferimento, ma poco utilizzato in Italia.
- la coltura con strumenti automatici, confrontando i TD (Time to Detection) da CVC e vena periferica è uno degli strumenti più agevoli a patto che i prelievi siano effettuati contemporaneamente e giungano in tempi brevi al laboratorio.

Si pone diagnosi microbiologica di infezione CVC-correlata quando si ha l'isolamento di uno stesso microrganismo (stesso fenotipo ed antibiogramma) da entrambi i prelievi, e il campione prelevato da CVC, rispetto a quello prelevato da vena periferica,

- ha carica più elevata (> di 5 volte) nella coltura quantitativa o

- una crescita più rapida (120' nell'adulto, 150' nel bambino).

L'interpretazione dei risultati non è semplice e mira a distinguere l'infezione catetere correlata dalla contaminazione cutanea, dalla colonizzazione del catetere, da infezione in altra sede (Blot *et al.*, 1999; Mermel *et al.*, 2009).

Quando, a fronte di un forte sospetto clinico, si decida di rimuovere il catetere è importante inviare la sempre la punta del catetere alla microbiologia per indagini colturali (non oggetto di questo documento).

E' il caso di ricordare che il 75-85% dei cateteri sono rimossi senza necessità a seguito della comparsa di febbre (Bouza *et al.*, 2002).

Infezioni fungine

Sono ben documentate in pazienti politraumatizzati, con ulcerazioni gastrointestinali, con accessi vascolari, negli immunodepressi, soprattutto se sottoposti a terapia antibiotica ad ampio spettro e per lunghi periodi.

Infezioni da funghi filamentosi non sono infrequenti in pazienti affetti da AIDS, malattie ematologiche maligne, trapianto di midollo o di organi solidi.

I funghi crescono in genere entro i cinque giorni di incubazione, con alcune eccezioni: tra i lieviti *C. glabrata* e *C. neoformans*, tra i funghi filamantosi *Fusarium* spp, *Scedosporium* spp, *Scopulariopsis*, *Exophiala* e, benché rari in Italia, i funghi dimorfi. Tutti i funghi crescono tranquillamente nei flaconi per aerobi, e la letteratura è concorde nel ritenere superfluo l'uso di flaconi dedicati per miceti (costo non giustificato dagli ipotetici vantaggi che derivano dal loro utilizzo (CLSI M47-A, 2007; & Cumitech 1C Blood 2006)

Devono essere quindi previste e concordate con i clinici modalità di indagine diverse dai sistemi automatici. Il sangue sarà raccolto in terreni bifasici (in aerobiosi, agitando nelle prime 24 ore) o in provette per lisi-centrifugazione, incubando a 27-30°C e 35-37°C fino a 4 settimane.

Batteri "difficili"

Comprendono organismi di raro riscontro, responsabili però di infezioni anche gravi.

- **Abiotrophia** e **Granulicatella**. Già noti come varianti nutrizionali di Streptococchi sono importanti responsabili di endocarditi. Possono non crescere sui comuni terreni al sangue (crescono invece su agar cioccolato)
- **Bartonella**. Può crescere nell'emocoltura, ma lentamente. La diagnosi più frequente si ottiene con i sistemi sierologici in alternativa si ricorre ai sistemi molecolari. Tuttavia la emocoltura può essere tentata ricorrendo all'utilizzo dell'isolator e usando come terreni di coltura Columbia blood agar base, cioccolato, o il BCYE incubando a 35°C in 5-7% di CO₂ e mantenendo le colture per 14-21 gg
- **Brucella**. Cresce bene nelle emocolture. Sospettarla sempre a fronte di piccoli coccobacilli Gram-negativi, poco colorati, al Gram. Attenzione ai rischi di infezione per gli operatori! Bactec e Bact/ALERT si sono dimostrati in grado di evidenziare la crescita dovuta alla attività metabolica di questo microorganismo in un tempo medio di 4 giorni. Una quota minima cresce in 9 giorni (3/97 emocolture osservate). Pertanto un tempo di osservazione di 10 giorni in linea teorica consente il reperimento del 100% dei positivi. *La percentuale di recupero del microorganismo è legata al volume di sangue prelevato con un numero di set di prelievi idoneo (2-3) si analizza un volume di sangue tale da rendere sufficienti i classici 5 giorni d'incubazione.*
- **Campylobacter**. Le specie più comuni quali *C.jejuni*, *C.lari* e *C.fetus* vengono evidenziate dai sistemi automatici nei classici 5 giorni. Le subcolture richiedono terreni come Columbia blood agar base o selettivi per *Campylobacter* incubati nelle opportune condizioni di microaerofilia per almeno 3 giorni.
- **Helicobacter** viene isolato con maggiore frequenza in episodi di batteriemia soprattutto in pazienti

immunocompromessi anche per questo microrganismi che si colora al Gram con difficoltà (meglio usare la fucsina) è bene usare terreni con formulazioni specifica, garantire oltre alla microaerofilia l'opportuna percentuale di umidità (70-80%) e mantenere le colture in osservazione per almeno 7 giorni

- **Francisella.** *Francisella tularensis* cresce nelle emocolture. Difficile riconoscerla nello striscio di Gram. Cresce su agar cioccolato, non sempre su agar sangue. Attenzione ai rischi di infezione per gli operatori!
- **Gruppo HACEK.** Responsabili di endocarditi ed altre infezioni. Crescono generalmente entro cinque giorni di incubazione. A fronte di un forte sospetto di endocardite può essere utile prolungare l'incubazione o effettuare sottocolture terminali (più che prolungare i tempi dell'emocoltura ricorrere alle tecniche di lisi-centrifugazione).
- **Legionella.** Può crescere nell'emocoltura in infezioni dopo trapianto o nei rari casi di endocardite (non invece nelle più frequenti infezioni polmonari). **Legionella:** si mantiene vitale nei media contenuti nelle bottiglie impiegate dai sistemi automatizzati, ma non si replica. Per il suo isolamento sono necessari terreni specifici come BCYE brodo o si può ricorrere all'isolator con sub coltura su BCYE mantenuto in atmosfera umida e per almeno 5 giorni. Tuttavia anche con l'isolator esistono delle criticità, la carica batterica presente nel sangue diminuisce in maniera significativa già dopo soli 30 min dal prelievo fino ad arrivare ad un possibilità di recupero del microrganismo di solo il 10% dopo 15h. E' consigliato l'invio di un campione di urine per il test in microimmunocromatografia
- **Leptospira.** Richiede modalità colturali specifiche, diverse dalle emocolture tradizionali. Per evidenziare questo microrganismo le emocolture devono essere ottenute necessariamente durante i primi 7 giorni di malattia (la batteriemia non si protrae oltre) Il microrganismo non sopravvive a 35°C, pertanto le emocolture dovrebbero essere incubate a 30°C e facendo ricorso a terreni specifici terreno semisolido contenente albumina ed ac. oleico (come Ellinghausen-McCullough Johnson Harris o PLM-5) mantenendo le colture in osservazione per almeno 13 settimane. Nella pratica comune si ricorre all'approccio molecolare.
- **Mycoplasma.** Richiede modalità colturali specifiche (es. glucosio SP4 a pH 4.5), diverse dalle emocolture tradizionali. **Mycoplasma:** *M.hominis* (implicato in sepsi *post partum*) ma il reale significato clinico è ancora in discussione. Può essere coltivato con i flaconi tradizionali dei sistemi automatizzati e subcolturato su agar sangue tradizionale. *M.pneumoniae* può causare sepsi, ma raramente i sistemi per emocoltura ne supportano la crescita (SPS interferisce con la sua vitalità, essendo privo di parete; e manca l'arginina come fattore di crescita indispensabile al suo metabolismo). Anche il Gram tradizionale non è percorribile occorre la colorazione con Arancio di Acridina e subcolture su terreno di Shepard A-7 o SP4. Nella realtà si preferisce più semplicemente ricorrere alla biologia molecolare.

Appropriatezza ed indicatori di qualità

Le emocolture sono test essenziali per la diagnosi delle infezioni con rischio per la vita e sono una delle pietre miliari nei programmi di "stewardship" antibiotica essendo stata dimostrata l'importanza che hanno nella riduzione dell'uso eccessivo degli antibiotici e dei costi nei pazienti ospedalizzati. Nelle ultime due decadi si è verificato un miglioramento analitico per l'identificazione rapida e accurata dei patogeni responsabili delle infezioni ematiche. Tuttavia, il miglioramento diagnostico delle emocolture dipende anche da altri fattori della fase preanalitica: scelta appropriata del test, prelievo del campione, trasporto e distribuzione nel laboratorio. I laboratori in accordo con gli standard ISO15189 (2007) devono dare istruzioni specifiche per la raccolta e manipolazione dei campioni primari. Le carenze nelle procedure preanalitiche quali: indicazione, tempo prima dell'incubazione, volume di sangue e numero di emocolture,

hanno un effetto significativo nella resa diagnostica.

Un laboratorio, oltre a dare l'informazione critica che conferma una diagnosi, è responsabile anche della stima della qualità e miglioramento del processo, che comprende tutte le attività che avvengono nel laboratorio dall'identificazione dei ceppi isolati allo studio di sensibilità agli antibiotici. A tal fine la qualità va migliorata selezionando gli indicatori di performance chiave e determinando i valori per una qualità accettabile. Se questi limiti sono superati, devono essere intraprese azioni correttive per assicurare l'accuratezza della diagnosi. Inoltre, le attività volte a garantire la qualità comprendono anche le attività post-analitiche, che includono i referti dei risultati e l'*outcome* dei pazienti e le funzioni eseguite fuori dal laboratorio come la comunicazione e cooperazione con il personale sanitario. Di seguito vengono segnalati i possibili indicatori correlati alla fase preanalitica più studiati in letteratura, distinti in indicatori di appropriatezza dell'esame ed indicatori di performance per il prelievo e trasporto dei flaconi di emocoltura e gli indicatori di processo e di *outcome* (Tabella 1).

Indicatori correlati alla fase preanalitica

Indicatori dell'appropriatezza della richiesta

1.- Numero di set di emocoltura per 1.000 giornate di degenza

Il numero di set di emocolture processati da pazienti ospedalizzati ha una particolare importanza per verificare l'appropriatezza. Un indicatore quindi sarebbe il numero di emocolture eseguite nell'ospedale per 1.000 giornate di degenza (Baron *et al.*, 2005). Questo indicatore dovrebbe essere studiato a cadenza annuale. Il tasso può essere più basso o più alto a seconda del tipo di ospedale (universitario o meno, provinciale o regionale). Si raccomanda un numero di set di emocolture compreso tra 103 e 188 ogni 1.000 giornate di degenza. In realtà questi numeri sono molto più alti di quello che si osserva negli ospedali europei, che secondo il report annuale (EARS-Net) del ECDC, nel 2012 il tasso più alto osservato era di 83 per 1.000 giornate di degenza in Finlandia e valori molto più bassi in Inghilterra (45.4) e in Germania (16.6) (ECDC, 2013). Gli ultimi dati italiani reperibili sono del 2010-2011 dell'EARS-Net 2011 e segnalano 91.3 emocolture per 1000 giornate di degenza (ECDC, 2012).

2.-Tasso di positività delle emocolture in totale

Si calcola che i valori dovrebbero essere compresi tra 6-12% (4) o 5-15% (Baron *et al.*, 2005). Il calcolo di questo tasso richiede la distinzione tra le vere positive e le contaminate. Questo tasso dovrebbe preferibilmente essere eseguito ogni mese per reparto e, se necessario, per tipo di paziente.

Un tasso di vere positive <5% e/o >188 emocolture per 1000 giornate di degenza può indicare una richiesta eccessiva di emocolture da parte del medico. Per contro, un tasso di emocolture vere positive >15% e/o <103 emocolture per 1000 giornate di degenza può implicare l'opposto. In entrambi i casi, bisogna verificare il perché.

Se il rischio di batteriemia è basso e il tasso di contaminazione è elevato, il Valore Predittivo Positivo (VPP) delle emocolture è basso e il test risulta con frequenza clinicamente poco utile. La valutazione dell'appropriatezza dell'indicazione delle emocolture in uno studio eseguito da infettivologi in un ospedale, dopo lo studio dei dati clinici, radiologici e di laboratorio, è risultata del 91% per batteriemie e del 75% per le candidemie (Vitrato-Hincky *et al.*, 2011).

Indicatori di performance per il prelievo dei campioni:

1.- Tasso di contaminazione delle emocolture eseguite con sangue prelevata da vena periferica (negli adulti).

Le emocolture contaminate rappresentano circa il 50% delle emocolture positive (Aronson and Bor, 1987). Non esiste un “gold standard” o algoritmo per differenziare i veri patogeni dai contaminanti o non significativi. Un'emocoltura contaminata genera un risultato falso-positivo e le decisioni terapeutiche basate su questo risultato possono portare alla prescrizione inutile di antibiotici, ad un rischio addizionale di diarrea da *Clostridium difficile*, alla rimozione non necessaria di un CVC, ad aumentare le giornate di degenza, con stress addizionale per il paziente e aumento dei test di laboratorio, comportando aumento dei costi e delle resistenze agli antibiotici. Si calcola in circa 3000 \$ il costo complessivo per emocoltura contaminata (Boyce *et al.*, 2013). Da un punto di vista del laboratorio i due criteri più utili per interpretare il significato clinico sono l'identità del microrganismo ed il numero di *set* positivi, in funzione del numero di *set* prelevati. I microrganismi più frequentemente contaminanti sono principalmente gli stafilococchi coagulasi negativi, *Corynebacterium spp*, *Bacillus spp*, *Propionibacterium spp*, *Lactobacillus spp*, streptococchi viridanti e *Micrococcus spp*. Si considera una contaminazione probabile, quando di ≥ 2 emocolture prelevate, solo in una cresce uno dei possibili contaminanti descritti, o cresce lo stesso microrganismo (ad es. *S. epidermidis*) però con un antibiotipo diverso. Invece il risultato è “Indeterminato” quando è stata eseguita un'unica emocoltura ed è cresciuto uno dei microrganismi probabilmente contaminanti. In entrambi i casi non si consiglia di identificare la specie né eseguire un antibiogramma. (Weinstein and Doern, 2011).

Il tasso di contaminazione è più basso adottando antisettici per la cute più attivi con minore tempo di contatto, come la clorexidina gluconato al 2% in soluzione alcolica e disinfettando il tappo del flacone con alcool al 70% lasciandolo asciugare completamente prima di immettere il sangue .

Il tasso di contaminazione generalmente accettato per le emocolture prelevate da vena periferica deve essere $\leq 2-3\%$ di tutte le emocolture prelevate (Baron *et al.*, 2005). Se dopo attento monitoraggio il problema della contaminazione persiste, si consiglia di individuare il tasso di contaminazione per operatore o implementare un team ospedaliero per il prelievo delle emocolture.

La contaminazione avviene con maggiore frequenza nei bambini (9-11%) che negli adulti anche perché, in questi casi, frequentemente il sangue viene prelevato attraverso un catetere; per questa ragione nei bambini il risultato del test ha un minore valore predittivo positivo (VPP). Comunque alcuni accorgimenti nel prelievo sterile nei bambini possono ridurre sensibilmente il tasso di contaminazione (Hall *et al.*, 2013).

2.- Tasso di emocolture singole (escluse le pediatriche).

Le linee guida internazionali raccomandano, in caso di sospetta sepsi, ≥ 2 *set* di emocolture. Dato che un'unica emocoltura non è mai appropriata, se il laboratorio non dispone di un sistema di allarme automatico immediato per la richiesta di una seconda emocoltura, il numero di emocolture singole deve essere monitorato. Il numero di *set* singoli non dovrebbe superare il 5% (Novis *et al.*, 2001). Il *feedback* dovrebbe essere mensile inizialmente e con cadenze più lunghe se non ci sono problemi. Nei bambini piccoli sono frequenti le emocolture singole e questo fatto, in combinazione con l'utilizzo frequente di sangue prelevato da catetere venoso, abbassa il VPP delle emocolture, con la conseguente difficoltà di distinguere una vera batteriemia da una contaminazione, particolarmente quando si isolano stafilococchi coagulasi negativi.

3.- Percentuale di emocolture prelevate attraverso un catetere vascolare e non accompagnate da una coltura prelevata da vena periferica.

Il prelievo del sangue per emocoltura deve essere eseguito da una vena periferica e il prelievo del sangue attraverso un catetere intravascolare a permanenza deve essere evitato quando sia possibile. Le linee guida dell'IDSA ([Mermel et al., 2009](#)) indicano che se si sospetta un'infezione ematica correlata al catetere, devono essere prelevate sempre emocolture sia dal catetere che da vena periferica, prima di iniziare la terapia antibiotica. Ciò permette distinguere una batteriemia correlata al catetere da una contaminazione o colonizzazione del catetere. Questo indicatore di qualità deve essere monitorato ma per ora non esistono criteri specifici. Quello che risulta documentato è che il tasso di contaminazione delle emocolture prelevate da catetere è di circa l'11%, molto superiore al tasso di contaminazione delle emocolture prelevate da vena periferica. ([Dwivediet al., 2009](#)), indipendentemente se l'aliquota iniziale di sangue sia scartata o meno. Quindi, riducendo le emocolture prelevate da catetere si riduce il tasso di contaminazione ([Weinstein et al., 2011](#)).

4.-Percentuale di emocolture riempite con >2 ml sopra o sotto il volume raccomandato per il tipo di flacone, esclusi i pediatrici.

Il volume eccessivo di inoculazione può essere causa sia di falsi-negativi (potendosi formare coaguli che intrappolano i microrganismi) sia di falsi positivi (attività di crescita rilevata dai sistemi automatici è imputabile al metabolismo delle cellule della linea bianca del paziente). In assenza di strumentazione, già presenti sul mercato, che permetta automaticamente di valutare in entrata del flacone il corretto volume d'inoculazione, questo indicatore richiede uno sforzo quotidiano. La procedura più accurata in questo caso, in particolare quando si tratta di piccoli volumi come nei pazienti pediatrici, sarebbe opportuno pesare i flaconi prima e dopo l'inoculazione del sangue, cosa che richiede tempo. Negli adulti è sufficiente la comparazione del livello del liquido prima e dopo l'inoculo. Una delle cause principali di quest'errore è la mancanza di correlazione tra il vuoto del flacone e il volume ottimale di sangue da raccogliere. In uno studio eseguito in 4 ospedali in Belgio, più di un terzo delle emocolture non erano inoculate correttamente: era più frequente un volume di sangue più basso del raccomandato (26.3-30%), che uno più alto (7.6-12.8%) ([Willems et al., 2011](#)). Il monitoraggio dovrebbe essere eseguito annualmente per un tempo limitato.

5.- TROPPE emocolture ordinate.

Quando si eseguono 2 emocolture la resa della batteriemia o fungemia è varia da 82 a >99%, con 3 emocolture è da 96 a >99% e con 4 da >99 al 100% ([Weinstein and Doern, 2011](#); [Riedel et al., 2008](#); [Washington, 1975](#)). Si è dimostrato che quando i volumi di sangue > 80 ml non incrementano significativamente la resa delle emocolture e probabilmente non sono necessari. Bisogna costantemente informare al clinico e individuare altri test potenziali da eseguire.

6.- Emocolture non idonee per mancanza di etichetta identificativa o flaconi danneggiati o rotti

Tempo di trasporto al laboratorio

Percentuale di emocolture inviate con ritardo > 2 ore o > 4 ore ([Baron et al., 2005](#); [Isenberg, 2010](#)). Data l'importanza della rapida determinazione del patogeno in causa, è stato proposto di monitorare la proporzione di emocolture che sono inviate al laboratorio con ritardo, ma ancora non sono stati definiti i limiti critici da non superare. Una diminuzione significativa nel recupero dei patogeni è stata sperimentalmente osservata solo quando i flaconi sono stati conservati per >24 ore a 4°C o a temperatura

ambiente e per >12 ore a 37°C (Sautter *et al.*, 2011). Il problema dell'immissione ritardata delle emocolture nello strumento automatico d'incubazione si verifica in particolare durante i weekend e quando il reparto è situato a maggiore distanza del laboratorio (Schmitz *et al.*, 2013). In uno studio è stato confrontato il tempo di positività dei flaconi di emocoltura comparando il tempo di positivizzazione o "Time to Detection" (TTD) introducendo immediatamente i flaconi nello strumento Bactec con il l'immissione ritardata di circa 15 ore: per la maggior parte dei patogeni (inclusendo *Staphylococcus* spp e *Enterobacteriaceae*), il TTD era ridotto ≤ 4.4 hours rispetto all'introduzione tardiva, mentre si è osservato un aumento del TTD di 20.8 hours per i bacilli Gram-positivi (Janapatla *et al.*, 2010).

Indicatori di processo

Tempo di risposta dei risultati positivi

I risultati positivi delle emocolture hanno una grande importanza nella cura del paziente e devono essere considerati come emergenze. Il tempo medio di positivizzazione (TTD) di un emocoltura processata con un sistema automatico in agitazione continua come il Bactec, varia per i batteri da 11.9 ore per gli enterobatteri a 31.6 ore per *Enterococcus faecalis* e la media per *Candida* spp è risultata di 29.8 ore (Durmaz *et al.*, 2003)

1.-Tempo di risposta del Gram

Il fattore più importante che influenza una terapia appropriata è il risultato della colorazione di Gram delle emocolture positive. Prima si riesce a fornire il risultato al clinico (soprattutto nel primo episodio di batteriemia/fungemia), migliore è l'*outcome* del paziente. Studi hanno dimostrato che con un tempo di refertazione del Gram < 1 h, la mortalità cruda è pari al 10.6%; se > 1h sale al 19.2% (P = 0.0389) (Barenfanger *et al.*, 2008). Per questo motivo l'indicatore più utilizzato è il TAT del Gram che non dovrebbe mai superare di 1 ora (tempo calcolato dalla positività strumentale del flacone). Questo TAT viene superato ampiamente quando le emocolture si positivizzano nelle ore notturne e nei giorni festivi, a meno che il servizio sia h24/7 gg.

Il Gram refertato per via telefonica permette di aggiustare la terapia antibiotica empirica iniziale più rapidamente in circa il 50% dei casi (Bouza *et al.*, 2004). Una valutazione di questo parametro può aiutare a verificare le ricadute sul paziente del ritardo della terapia empirica più idonea. Il monitoraggio può essere eseguito per un periodo limitato di tempo, annualmente o più frequentemente, se necessario.

Inoltre, uno dei problemi è il trasferimento del paziente da un reparto, dove sono state eseguite le emocolture, ad un altro reparto ospedaliero. Di chi è la responsabilità di determinare la *location* del paziente quando le emocolture sono positive? Alcuni clinici pensano che sia del laboratorio.

2.-Tempo della risposta dell'identificazione e dell'antibiogramma

Questo parametro dipende dell'organizzazione e del grado di automazione del laboratorio. Ogni laboratorio dovrebbe monitorare il tempo minimo e massimo di risposta, sia per l'identificazione che per lo studio di sensibilità agli antibiotici, adottando metodiche rapide per l'identificazione e l'antibiogramma diretto dal sangue, per i risultati preliminari e finali dell'esame.

L'impatto della tecnologia MALDI-TOF per l'identificazione rapida dei patogeni presenti nelle emocolture positive si è dimostrato utile per ottimizzare la scelta della terapia antibiotica empirica, particolarmente nelle batteriemie da gram-negativi. Ad esempio, in ospedali con bassa prevalenza di batteri produttori di ESBL e MDR, la terapia è stata modificata nel 43.7% dei casi dello studio di Clerc, (Clerc *et al.*, 2013).

3.-Correlazione tra il Gram e il risultato delle colture

La mancanza di correlazione ha importanti conseguenze per il paziente per cui questo parametro deve essere monitorato annualmente.

4.-Correlazione tra i risultati dei test di sensibilità diretti dall'emocoltura comparati con quelli dei ceppi isolati

È stato osservato come una risposta rapida dei risultati migliora l'*outcome*. A questo fine alcuni laboratori eseguono un antibiogramma diretto dal brodo dell'emocoltura positiva. Baron indica la necessità di monitorare i risultati del test diretto comparandoli con quelli dei test eseguiti sulle colonie isolate. Alcune metodiche che non soffrono dell'effetto inoculo, come il test di sensibilità con gradiente di MIC, potrebbero ovviare a questo monitoraggio ed inoltre, anche l'esecuzione dell'antibiogramma eseguito sulla patina cresciuta su piastra dopo 4-5 ore di incubazione (Baron *et al.*, 2005).

Indicatori di outcome in rapporto alla terapia

L'*outcome* del paziente non dipende solo della terapia antibiotica adeguata, ma anche da altri parametri come il tipo di microrganismo, l'età del paziente, alcuni fattori predisponenti, la fonte dell'infezione, ecc.

Questi sono gli indicatori che si riferiscono all'*outcome* in rapporto al fatto che il microrganismo infettante sia sensibile alla terapia somministrata in ognuno dei seguenti momenti (Weinstein *et al.*, 1997):

- a) quando è stata prelevata la prima emocoltura positiva
- b) dopo che è stata prelevata l'emocoltura, ma prima di avere il risultato positivo della coltura (terapia empirica)
- c) dopo il referto dell'emocoltura positiva con il risultato della colorazione di Gram (ma prima di avere i risultati dell'identificazione e dei test di sensibilità)
- d) dopo che i risultati dell'identificazione e dell'antibiogramma sono stati prodotti in un referto definitivo.

Appropriatezza della terapia antibiotica empirica prima e la terapia dopo avere il risultato delle emocolture

La terapia empirica si basa sulle linee guide attuali considerando il sito, il tipo dell'infezione oltre che le condizioni di co-morbilità eventualmente presenti nel paziente.

Di tutti criteri di appropriatezza della terapia mirata (dose, buoni livelli sierici, minore tossicità, indicazioni cliniche specifiche, spettro più stretto, ecc), l'Infectious Diseases Society (IDSA) ritiene molti di questi troppo difficili di applicare mentre l'unico non controverso (di facile consultazione in cartella), sia la scelta di un antibiotico al quale il patogeno sia sensibile (Gross *et al.*, 1994). Dai dati della letteratura si è osservato che circa un 60% dei pazienti con infezione ematica riceve una terapia empirica appropriata. La valutazione dell'appropriatezza della terapia dopo i risultati del test dipende anche dai parametri che sono stati studiati e si aggira tra il 78 % (Weinstein *et al.*, 1997), l'88% e l'89-97% (Bouza *et al.*, 2004).

Comparati con quelli che non hanno ricevuto una terapia empirica adeguata, questi ultimi hanno un ricovero più lungo, maggiore rischio d'infezione da *Clostridium difficile*, maggior rischio di mortalità associata all'infezione e costi superiori (Vitrat-Hincky *et al.*, 2011, Bouza *et al.*, 2004). Weinstein (Weinstein *et al.*, 1997) evidenzia come la mortalità sia più bassa (9.8%) se il microrganismo era sensibile all'antibiotico somministrato la mortalità era più bassa rispetto a quella osservata nei pazienti in cui la terapia appropriata veniva impostata solo dopo il referto definitivo (12.6%). Certamente l'*outcome* dipende, inoltre, da altre approcci terapeutici, come il drenaggio del focolaio d'infezione, la rimozione di un catetere, l'escissione di un ascesso, ecc.

Integrando una rapida diagnosi con un'efficace *stewardship* antimicrobica in tempo reale, si può ridurre il

tempo della terapia antibiotica ottimale delle infezioni da batteri Gram-negativi resistenti, (da una media di 80.9 ore con i metodi convenzionali a 23.2 con metodi rapidi $P < 0.001$) e la terapia antibiotica efficace (89.7 h vs 32 h, $P < 0.001$), con riduzione della mortalità (21% vs 8.9%, $P = 0.01$) ([Perez et al., 2014](#))

Infine, dai dati raccolti in uno studio realizzato in 138 rianimazioni europee, è risultato che in Italia la sfida maggiore, percepita sia dal clinico (41%) che dal microbiologo (54%), come limite del tipo e numero di emocolture eseguite è il costo dell'esame ([Schmitzet al., 2013](#)). Per questo motivo un'analisi della stima del fabbisogno *standard* di un ospedale nell'uso delle emocolture come processo analitico riferito ai singoli pazienti, comparato con il fabbisogno standard ideale, può solo aiutare a incentivare un miglioramento della qualità nonché dei costi adeguati al servizio.

Tabella 3. Lista degli indicatori di performance per monitorare le principali fasi della preanalitica, del processo e dell'outcome delle emocolture con i valori target più frequentemente utilizzati e la frequenza del monitoraggio.

Indicatore	Valore target	Frequenza
Richiesta di emocolture		
Tasso di EMO vere positive	5-15%	mensile
numero di EMO ordinate/1.000 giornate di degenza	103-188	annuale
Prelievo delle emocolture		
Tasso di contaminazione delle EMO prelevate da vena periferica		mensile con report di feed-back ai reparti sopra gli standard
Tasso di EMO singole (adulti)	<2-3%	mensile o più lungo se non ci sono problemi
% di EMO prelevate solo da CVC e non accompagnate da EMO da VP	<5%	
% di EMO riempite con >2 ml di sangue sopra o sotto la quantità indicata		annuale, per un tempo limitato
troppe EMO richieste		sempre
Tempo di trasporto in laboratorio		
% di EMO inviate con ritardo >2-4 h		
Processo delle emocolture		
Tempo di comunicazione del Gram dalla positivizzazione del flacone		
Correlazione tra il Gram e la coltura		per periodi limitati, annualmente
tempo di refertazione della identificazione		o più frequentemente se necessario
tempo di refertazione del test di sensibilità		
Risultati comparati tra i test di sensibilità rapidi/preliminari e definitivi		
Indicatori di outcome		
% di infezioni trattate con un antibiotico al quale il microrganismo è sensibile, nelle diverse fasi (prima e dopo il prelievo ma senza risposta microbiologica, dopo i dati di laboratorio)		

BIBLIOGRAFIA

Abelson JA. Frequency of Fungemia in Hospitalized Pediatric Inpatients Over 11 Years at a Tertiary Care Institution PEDIATRICS Vol. 116 No. 1 July 2005

Aronson MD and Bor DH. Blood cultures. *Ann Intern Med*, 1987, 106: 246

Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, Ozenci V. Clinical Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel in Identification of Bacteria and Yeasts from Positive Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol*. 2013 Dec; 51(12): 4130-6.

Barenfanger J, Graham DR, Kolluri L, Sangwan G, Lawhorn J, Drake CA, Verhulst SJ, Peterson R, Moja LB, Ertmoed MM, Moja AB, Shevlin DW, Vautrain R, Callahan CD. Decreased mortality associated with prompt Gram staining of blood cultures *Am J Clin Pathol* 2008, 130: 870.

Baron EJ, Weinstein MP, Dunne WM, Yagupsky P, Welch DF, Wilson DM. 2005 Cumitech 1C, Blood cultures IV. Coordinating ed. E. J. B. ASM Press, Washington DC.

Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB Jr, Bourbeau P, Carroll KC, Kehl SC, Dunne WM, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Chapin KC, Snyder JW, Forbes BA, Patel R, Rosenblatt JE, Pritt BS. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). *Clin Infect Dis*. 2013 Aug; 57(4): e22-e121.

Barocci S, Giacomini M, Renzi A, Palma M, Latini L, Quagliarini L and Migali A. HB&L® System: rapid determination of antibiotic sensitivity of bacteria isolated from blood cultures. *MICROBIOLOGIA MEDICA*, Vol. 25 (1), 2010.

Bennet IL Jr., Beeson PB. Bacteremia: a consideration of some experimental and clinical aspects. *Yale J Biol Med*. 1954; 26: 241-262.

Buchan BW, Ginocchio CC, Manii R, Cavagnolo R, Pancholi P, Swyers L, Thomson, RB Jr., Anderson C, Kaul K, Ledebor NA. Multiplex Identification of Gram-Positive Bacteria and Resistance Determinants Directly from Positive Blood Culture Broths: Evaluation of an Automated Microarray-Based Nucleic Acid Test *PLOS Medicine* July 2013, Volume 10, Issue 7, e1001478.

Blot F, Nitenberg G, Chachatty E, Raynard B, Germann N, Antoun S, Laplanche A, Brun-Buisson C, Tancredi C. Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures. *Lancet* 1999; 354: 1071-7.

Boyce JM, Nadeau J, Dumigan D, Miller D, Dubowsky C, Reilly L, Hannon CV. Obtaining blood cultures by venipuncture versus from central lines. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2013, 34: 1042.

Bouza E, Burillo A, Munoz P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8(5): 265-274.

Bouza E, Sousa D, Munoz P, Rodriguez-Cr eixems M, Garcia Lechuz J. Bloodstream infections: a trial of the

impact of different methods of reporting positive blood cultures results. *Clin Infect Dis*, 2004, 39:1161

Chapin KC and Michael C. Musgnug Direct Susceptibility Testing of Positive Blood Cultures by Using Sensititre Broth Microdilution Plates. *J Clin Microbiol*, Oct. 2003, 41: 4751–4754.

Clerc O, Prod'hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis*. 2013 Apr; 56(8): 1101-7.

Cockerill FR III, Wilson JW, Vetter EA, et al. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis*. 2004; 38: 1724-30.

Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb SA, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013 Feb; 41(2): 580-637.

Durmaz G, Us T, Aydinli A, Kiremitzi A, Kiraz N, Akgun Y. Optimum Detection Times for Bacteria and Yeast Species with the BACTEC 9120 Aerobic Blood Culture System: Evaluation for a 5-Year Period in a Turkish University Hospital. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 819.

Dwivedi S, Bhalla R, Hoover DR, Weinstein MP, Discarding initial aliquot of blood does not reduce contamination rates in intravenous-catheter-drawn blood cultures. *J Clin Microbiol*, 2009, 47: 2950.

Fang-Lan Y, Ming-Hwei L, Jan-Ching L, Yi-Lin Lian Chia-Wun L, Chi-Tin C and Giueng-Chueng W. Comparison of Antimicrobial Susceptibility Testing of Isolates from Blood Cultures by Direct Inoculation Method and PHOENIX. *J Biomed Lab Sci*. 2011. Vol 23 No 1: 23-28.

Fontana C, Favaro M, Minelli S, Bossa MC, Altieri A, Favalli C. A novel culturing system for fluid samples. *Med Sci Monitor* 2009 Feb; 15(2): BR55-60.

Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wang YF. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database. *J Clin Microbiol*. 2013 Mar; 51(3): 805-9.

Fuller DD, Davis TE, Denys GA, York MK. Evaluation of BACTEC Myco/F Lytic medium for recovery of mycobacteria, fungi and bacteria from blood. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 2933-2936.

Goglio A, Nicoletti P. 2004 Indagine nazionale sulle metodiche per emocoltura in Italia. *Microbiologia medica* 19: 1-13.

Grohs P, Mainardi JL, Podglajen I, Xavier Hanras X, Eckert C, Buu-Hoi A, Varon E, Gutmann L. Relevance of Routine Use of the Anaerobic Blood Culture Bottle. *J. Clin Microbiol*, 2007, 45: 2711-15.

Gross PA, Barrett TL, Dellinger EP, Krause PJ, Martone WJ, McGowan JE, Sweet RL, Wenzel RP. Quality standard for the treatment of bacteremia. The Infectious Diseases Society of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1994, 15: 189.

Hall RI, Domenico HJ, Self WH, Hain PD. Reducing the blood culture contamination rate in a pediatric emergency department and subsequent cost saving. *Pediatrics*, 2013, 131: e292.

Harris DM and Hata DJ. Rapid identification of bacteria and *Candida* using pna-fish from blood and peritoneal fluid cultures: a retrospective clinical study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2013, 12: 2.

Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Liebana-Martos C, Navarro-Marí JM. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- β -lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. *Lett Appl Microbiol*. 2013 Nov 28.

Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, Collins CD, and Nagel JL. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis* 2013. vol. 57.

Jaimes F, Arango C, Ruiz G, Cuervo J, Botero J, Vélez G, Upegui N, Machado F. Predicting bacteremia at the bedside. *Clin Infect Dis*. 2004 38: 357-62.

Janapatla RP, Yanb J-J, Chienb M-L, Chenb H-M, Wua, H-M J Wua J-J. Effect of overnight storage of blood culture bottles on bacterial detection time in the BACTEC 9240 blood culture system. *J Microbiol Immunol Infect* 2010; 43: 126.

Kommedal O, Lekang K, Langeland N, Wiker HG. Characterization of polybacterial clinical samples using a set of group-specific broad-range primers targeting the 16S rRNA gene followed by DNA sequencing and RipSeq analysis. *J Med Microbiol*. 2011 Jul; 60(Pt 7): 927-36.

Kosmin AR and Fekete T Use of Fungal Blood Cultures in an Academic Medical Center[†] *Clin. Microbiol*. November 2008 vol. 46 no. 11 3800-3801.

Kroumova V, Gobbato E, Macaluso P, Fortina G. The answer of the Bacteriology Laboratory to new clinical needs. Rapid sepsis diagnostics at the Novara hospital. *Microbiologia Medica*. Vol. 2727, (2), 69. 2012.

Kroumova V, Gobbato E, Macaluso P, Tamburelli S, Marini F, Perone M, Orlandi S, Viviani M and Fortina G. Preliminary indications for antibiotic susceptibility tests in less than six hour in positive blood cultures. *Microbiologia Medica*, Vol. 25 (1), 2010.

Lagacé-Wiens PRS, Heather J. Adam, James A. Karlowsky, Kimberly A. Nichol, Paulette F. Pang, Jodi Guenther, Amanda A. Webb, Crystal Miller, and Michelle J. Alfa. Identification of Blood Culture Isolates Directly from Positive Blood Cultures by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight

Mass Spectrometry and a Commercial Extraction System: Analysis of Performance, Cost, and Turnaround Time. *J. Clin Microbiol.* 2012 Volume 50 Number 10: 3324-3328.

Leitner E, Scherr S, Strempl C, Krause R, Feierl G, Grisold AJ Rapid identification of pathogens with the hemoFISH test applying a novel beacon-based fluorescence in situ hybridization (bbFISH) technology in positive blood culture bottles. *J Mol Diagn.* 2013 Nov; 15(6): 835-9.

Li J, Plorde J., Carlson L. Effects of volume and periodicity on blood cultures. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 2829-2831.

Loonen AJ, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PF, van den Brule AJ. Anevaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012. 31: 1575–1583.

Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS., Fridkin SK, Gorwitz RJ Kaplan SL, Karchmer AW, Levine DP, Murray BE, Rybak MJ, Talan DA ,Chambers HF Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. *CID* 2011: 52.

Martinez RM, Bauerle ER, Fang FC and Butler-Wu SM. Evaluation of Three Rapid Diagnostic Methods for Direct Identification of Microorganisms in Positive Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52(7): 2521.

Martiny D, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012. 31: 2269–2281.

Meex C, Neuville F, Descy J, Huynen P, Hayette MP, De Mol P, Melin P. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. *J Med Microbiol.* 2012 Nov; 61(Pt 11): 1511-6.

Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, Raad II, Rijnders BJA, Sherert RJ, Warren DK. Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 2009, 49: 1.

Novis DA, Dale JC, Schiffman RB, Ruby SG, Walsh MK. Solitary blood cultures: a CAP Q-probes study of 132,778 blood culture sets in 333 small hospitals. *Arch Pathol Lab med*, 2001, 125: 1290.

Ntusi N, Lindsey Aubin, Stephen Oliver, Andrew Whitelaw, Marc Mendelson. Guideline for the optimal use of blood cultures. December 2010, Vol. 100, No. 12 SAMJ.

Perez KK., Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL. Infection integrating rapid diagnostics and antimicrobial stewardship improves outcomes in patients with antibiotic resistant Gram-negative bacteremia. *J of Infection*, 2014, 69: 216.

Riedel S, Bourbeau P, Swartz B, Brecher S, Carroll KC, Stamper PD, Dunne WM, McCardle T, Walk N, Fiebelkorn K, Sewell D, Richter SS, Beekmann S, Doern GV. Timing of specimen collection for blood cultures from febrile patients with bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(4): 1381-5.

Romero-Gómez MP, Muñoz-Velez M, Gómez-Gil R, Mingorance J. Evaluation of combined use of MALDI-TOF and Xpert(®) MRSA/SA BC assay for the direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles. *J Infect.* 2013 Jul; 67(1): 91-2.

Rondinelli V, Giglio S, Masciari R. New method for rapid Susceptibility Testing on blood culture with HB&L® system: preliminary data *MICROBIOLOGIA MEDICA*, Vol. 25 (4): 2010.

Sakarikou C, Parisato M, Lo Cascio Gand Fontana C. Beacon-Based (bbFISH®) Technology for Rapid Pathogens Identification in Blood Cultures. *BMC Microbiol* 2014 *BMC Microbiology* 2014, 14: 99.

Sautter RL, Bills AR, Lang DL, Rischell G, Heier BJ, Bourbeau PP. Effects of delayed-entry conditions on the recovery and detection of microorganisms from bat/alert and bactec blood culture bottles. *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 1245.

Skvarc M, Stubljarić D, Rogina P and Kaasch AJ. NON-CULTURE-BASED METHODS TO DIAGNOSE BLOODSTREAM INFECTION: DOES IT WORK? *European Journal of Microbiology and Immunology* 3 (2013) 2, pp. 97–104.

Schmitz RPH, Keller PM, Baier M, Hagel S, Pletz MW, Brunkhorst FM. Quality of blood culture testing - a survey in intensive care units and microbiological laboratories across four European countries. *Crit Care*, 2013, 17: R248.

Strand CL. Blood cultures: consensus recommendations in 1988: *Microbiology* no. MB88-1 (MB-172). American Society for Clinical Pathologists Check Sample Continuing Education Program. Chicago: American Society for Clinical Pathologists; 1988.

Thompson RB Jr, Evans BL, Southerland JL. Collecting blood for culture. *Generalist Microbiology Tech Sample No. G-1*. American Society of Clinical Pathologists; 1991.

Väisänen IT, Michelsen T, Valtonen V, Mäkeläinen A. Comparison of arterial and venous blood samples for the diagnosis of bacteremia in critically ill patients. *Crit Care Med.* 1985 Aug; 13(8): 664-7.

van der Velden LB, Mouton JM, Sturm PD. Clinical Impact of Preincubation of Blood Cultures at 37°C. *J Clin Microbiol* 2011, 49: 275-280.

Vitrat-Hincky V, Francois P, Labarère J, Recule C, Sthal JP, Pavese P. Appropriateness of blood culture testing parameters in routine practice. Results from a cross-sectional study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011, 30: 533.

Vlek Anne L.M., Marc J.M. Bonten, C.H. Edwin Boel. Direct Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of-Flight Mass Spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One.* 2012; 7(3): e32589.

Waites Ken B., E. S. Brooking, S. A. Moser, B. L. Zimmer. Direct Susceptibility Testing with Positive BacT/Alert Blood Cultures by Using MicroScan Overnight and Rapid Panels. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 2052–2056.

Weinstein MP, Towns ML, Quartery SM, Mirrett S, Reamer L., Parmigiani G, Reller LB. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis*, 1997: 24:

584.

Weinstein MP and Doern GV. A critical appraisal of the role of the Clinical Microbiology laboratory in the diagnosis of bloodstream infections. *J Clin Microbiol*, 2011, 49: S26.

Willems E, Smismans A, Cartuyvels R, Coppens G, Van Vaerenbergh K, Van der Abeele A-M, Frans J, on behalf of the Bilulu Study Group. The preanalytical optimization of blood cultures: a review and the clinical importance of benchmarking in a Belgian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012, 73:1.

Wilson ML, Davis TE, Mirret S, Reynolds J, Fuller D, Allen SD, Flint K, Koontz F and Reller LB. Controlled comparison of the BACTEC high-blood-volume fungal medium, BACTEC Plus 26 aerobic blood culture bottle, and 10-milliliter Isolator blood culture system for detection of fungemia and bacteraemia. *J Clin Microbiol* 1993;31:865-871.

[See comment in PubMed Commons below](#)

TESTI E LINEE GUIDA e web site

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved guideline. CLSI M47-A, 2007, Wayne PA.

EUCAST Direct antimicrobial susceptibility testing EUCAST direct antimicrobial susceptibility testing guidelines. February 2012.

Proposed Guideline. CLSI document M47-A [ISBN 1-56238-619-0]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.

Cumitech 1B Blood Cultures III. W.M. Dunne Jr., F.S. Nolte, M.L. Wilson. Aprile 1997 ASM Press P.O. Box 605 Herndon, VA 20172 USA.

Cumitech 1C Blood Cultures IV. February 15, 2006 by Ellen Jo Baron 1C IV.

European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), Stockholm: ECDC; 2013.

European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), Stockholm: ECDC; 2012.

Henry D. Iseberg 1992 e 1994. Clinical Microbiology Procedures Handbook e Supplement 1, ASM Press P.O. Box 605, Herndon, VA 20172 USA.

Iseberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. In: York, M.K., Henry, M. Gilligan P (Eds). Section 3.4.1. Aerobic bacteriology, blood cultures, general detection and interpretation. American Society of Microbiology Press (ASM); 2010, Washington DC.

Patrick R. Murray 2007 Manual of Clinical Microbiology. ASM Press P.O. Box 605 Herndon, VA 20172 USA.

Investigation of blood cultures (for organisms other than *Mycobacterium* species). Issue no: 5 Issue date: 09.08.05 Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Page 1 of 34. Reference no: BSOP 37i5.

Washington JA. Blood cultures: principles and techniques. Mayo Clin Proc. 1975; 50: 91-95.

<http://www.world-sepsis-day.org/?MET=SHOWCONTAINER&vPRIMNAVISELECT=4&vSEKNAVISELECT=1&vCONTAINERID=>
http://www.hpa.-standardmethods.org.uk/wg_bacteriology.asp.

Investigation of intravascular cannulae and associated specimens. Issue no: 4.1 Issue date: 03.05.05 Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Page 1 of 16. Reference no: BSOP 20i4.1

Sarti M, Farina C, Luzzaro F, Sambri V, Cellini A, Cosentino M, Mauri C, Nozzi D, Pedna MF, Pifferi L, Clerici G. Position Paper sulla possibilità della identificazione diretta dei microrganismi da emocoltura positiva con il sistema Vitek MS. AMCLI 2014.

UK Standards for Microbiology Investigations : Investigation of Blood Cultures (for Organisms other than *Mycobacterium* species) Issued by the Standards Unit, Microbiology Services, PHE Bacteriology | B 37 | Issue no: 7.1 | Issue date: 19.05.14 | Page: 1 of 51.