associazione microbiologi clinici italiani

Ente del Terzo Settore

Rif.2023-13

PERCORSO DIAGNOSTICO

INFEZIONI DEL TORRENTE CIRCOLATORIO

Gruppo di Lavoro Organizzativo dei Percorsi Diagnostici (GLOPD)

Coordinatore: Cristina Giraldi
c.giraldi54@gmail.com
Proprietà intellettuale di AMCLI ETS.

Nel caso i contenuti siano utilizzati è necessario citare il Percorso Diagnostico nel seguente modo: AMCLI ETS. Percorso Diagnostico - infezioni del torrente circolatorio Rif. 2023-13.

Associazione Microbiologi Clinici Italiani ETS (AMCLI ETS)
Via C. Farini 81 - 20159 Milano - T. 02 66801190 - segreteriaamcli@amcli.it N. 26168 iscrizione RUNTS - sez. "G - altri enti del Terzo Settore" - Iscrizione REA MI - 1969948 C.F. 06653690153 - P.I. 12404560158

REFERENTE

Carla Fontana, UOC Microbiologia e Banca Biologica,

I.R.C.C.S. Istituto nazionale Malattie infettive "Lazzaro Spallanzani", Roma

ESTENSORI DEL DOCUMENTO*

Gruppo di Lavoro Infezioni Paziente Critico

Coordinatore:

Carla Fontana, UOC Microbiologia e Banca Biologica, I.R.C.C.S. Istituto nazionale Malattie infettive "Lazzaro Spallanzani", Roma

Segretario

Fabio Arena, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale Università degli Studi di Foggia, Foggia

Componenti:

Paola Bernaschi, Microbiologia - Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS, Roma

Flora Marzia Liotti, Microbiologia e Virologia, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS, Roma

Giovanni Lorenzin, Microbiologia e virologia - Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari, Trento

Antonella Mencacci, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia, Perugia

Giulia Menchinelli, Microbiologia e Virologia, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS, Roma

Cinzia Peronace, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Renato-Dulbecco" di Catanzaro, UOC Microbiologia e Virologia- P.O. Pugliese, Catanzaro

Mario Rassu, Microbiologia e Virologia ULSS 8 Berica, Vicenza

Teresa Spanu, Microbiologia e Virologia, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS, Roma

*tutti i componenti hanno partecipato alla stesura del documento con medesimo contributo

REVISORI INTERNI

Bruno Viaggi, SOD Neuroanestesia e Rianimazione dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

Massimo Giusti, Medicina interna per intensità di cura 2 – Ospedale San Giovanni Bosco, Torino

REVISORI ESTERNI

Francesco Luzzaro, Delegato Regionale AMCLI - Lombardia

Componente GLISTER: *Carlo Tascini*, Malattie Infettive e Tropicali – ASUFC

Sommario

1. INTRODUZIONE 5
2. EMOCOLTURA PERCHÈ, QUANDO E COME 6
2.1 Perché 6
2.2 Quando 6
2.3 Come 6
2.3.a Il volume 7
2.3.b Con quali presidi. 7
Prelievo da vena periferica 7
Prelievi da cannule periferiche 8
Prelievo nel paziente con CVC, in cui si sospetti (o non si possa escludere) una batteriemia catetere-correlata 8
2.3.c Il numero di flaconi 8
Ripetizione del prelievo nei giorni successivi al primo 9
2.3.4 I flaconi da usare 9
2.3.5 Il ruolo del Microbiologo Clinico e ulteriori accorgimenti 9
Identificazione dei flaconi 9
Conservazione dei flaconi, se invio differito nel tempo 9
3. MODALITÀ E TEMPI DI INCUBAZIONE DELLE EMOCOLTURE 10
4. GESTIONE DELLE EMOCOLTURE POSITIVE 11
4.1 Iter standard 11
4.1.1 Esame microscopico 11
4.1.2 Sub-coltura su terreni agarizzati 11
4.1.3 Identificazione e antibiogramma fenotipico 11
4.2 Tecnologie fast 11
4.2.1 MALDI-ToF per la identificazione di specie da coltura "giovane" o brodocoltura. 13
4.2.2 Pannelli sindromici 13
4.2.3 Ricerca dei meccanismi di resistenza con test fenotipici o molecolari 15
4.2.4 Antibiogramma fenotipico rapido 16
4.2.5 Antibiogramma da colonia giovane 16
4.2.6 Test molecolari da sangue intero 17
Prospettive future: metagenomica 19

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

5. PROBLEMATICHE LEGATE ALL'ESAME DELL'EMOCOLTURA 20
5.1 Differenziare un contaminante da un reale patogeno 20
5.2 Risultati discrepanti 20
5.2.1 Emocolture segnalate come positive dallo strumento automatico, positive alla colorazione di Gram, con sub-coltura negativa 20
5.2.2 Emocolture segnalate come positive dallo strumento automatico, negative alla colorazione di Gram e con sub-coltura negativa 21
5.2.3 Emocolture segnalate come negative dallo strumento automatico, positive alla colorazione di Gram e con sub-coltura o a test molecolari positivi 21
6. EMOCOLTURE POLIMICROBICHE 22
7. INFEZIONI DEL TORRENTE CIRCOLATORIO SOSTENUTE DA BATTERI "DIFFICILI" ... 23
7.1 Abiotrophia spp. e Granulicatella spp. 23
7.2 Bartonella spp. 23
7.3 Brucella spp. 23
7.4 Campylobacter spp. 23
7.5 Helicobacter spp. 24
7.6 Francisella spp. 24
7.7 Batteri del gruppo HACEK 24
7.8 Legionella pneumophila 24
7.9 Leptospira spp. 24
7.10 Mycoplasma spp. 25
8. INFEZIONI DEL TORRENTE CIRCOLATORIO SOSTENUTE DA MICETI 26
9. INFEZIONI DEL TORRENTE CIRCOLATORIO CATETERE-CORRELATE 27
10. ENDOCARDITE INFETTIVA 28
11. CONSERVAZIONE DEGLI ISOLATI 30
12. REFERTAZIONE ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI 31
12.1 Referti preliminari 31
12.2 Referto definitivo 31
13. REQUISITI MINIMI DEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA CHE ACCETTA EMOCOLTURE 32
13.1 Biosicurezza 32
13.2 Requisiti organizzativi e tecnologici 32
13.2.1 Attività di monitoraggio della qualità della fase pre-analitica 32
13.2.2 Sistemi per l'informatizzazione dei referti e del flusso dei dati di laboratorio; 32
13.2.3 Sistema per il monitoraggio continuo delle emocolture e capacità di incubare i flaconi 24 ore su 24;33
13.2.4 Tecnologia MALDI-TOF per l'identificazione batterica e fungina 33
13.2.5 Sistema molecolare per la ricerca di meccanismi di resistenza e identificazione batterica rapida da brodo di emocoltura positiva 34
13.2.6 Biobanca o congelatore per la conservazione degli isolati clinici di interesse 35
15. BIBLIOGRAFIA 37

1. INTRODUZIONE

Le infezioni del torrente circolatorio (bloodstream infections, BSI) sono definite dalla presenza di microrganismi nel circolo sanguigno che, spesso, possono essere dimostrati attraverso la positività di una o più emocolture. Tali infezioni elicitano una risposta infiammatoria caratterizzata dall'alterazione dei parametri clinici, di laboratorio ed emodinamici. In questo senso le definizioni di BSI e quella di sepsi possono rappresentare due aspetti dello stesso fenomeno, poiché la sepsi è una insufficienza d'organo, potenzialmente letale, causata da una risposta disregolata dell'ospite ad un'infezione (Rhodes *et al.*, 2017); quest'ultima è spesso una BSI. Naturalmente, una BSI può essere preceduta, seguita o concomitante a una malattia infettiva localizzata, come endocardite, polmonite, infezioni del tratto urinario, meningite, infezioni di endoprotesi, ecc. (Viscoli, 2016; Mandell *et al.*, 2019). Tuttavia, la sepsi può essere presente anche in assenza di BSI. Nel sospetto di queste forme infettive ha senso intraprendere la ricerca di agenti patogeni nel sangue del paziente e la diagnosi delle BSI rappresenta una delle funzioni critiche per il laboratorio di microbiologia, nonché una delle più importanti, che meglio lo caratterizza (Miller *et al.*, 2018).

La sepsi è un'infezione grave caratterizzata da un'elevata mortalità che causa circa 50 milioni di nuovi casi per anno ed 11 milioni di morti (Schlapbach *et al.*, 2020). Circa l'80% dei casi sono di origine comunitaria, mentre la quota di sepsi-correlata all'assistenza, seppure non stimabile in maniera accurata, è di circa il 20% (Markwart *et al.*, 2020). Sulla sepsi insiste in modo importante il problema dell'antimicrobico resistenza, soprattutto, nei setting endemici, e i due fenomeni sono strettamente correlati (Fitzpatrick *et al.*, 2019). L'approccio alla sepsi richiede una azione coordinata multidisciplinare che meglio incarna la corrispondenza fra *diagnostic stewardship* e *antimicrobial stewardship* (Mangioni *et al.*, 2019). Le evidenze scientifiche dimostrano, infatti, come l'utilizzo di percorsi diagnostici fondati sulla combinazione di nuove tecnologie consenta un approccio diagnostico *fast* che a sua volta mostra un impatto positivo sulla *early targeted therapy* (Tiseo *et al.*, 2022).

Nonostante l'introduzione di nuove tecnologie per la diagnosi eziologica, l'emocoltura rimane il *gold standard* nella diagnostica microbiologica di sepsi e/o di febbre di origine ignota o più in generale delle BSI ed è una delle azioni comprese nella "*hour-1 bundle*", cioè delle azioni da intraprendere entro 1 ora dal riconoscimento del caso di sepsi, insieme alla misurazione dei lattati, somministrazione di terapia antibiotica, somministrazione endovena di fluidi, somministrazione di farmaci vasopressori in caso la somministrazione di fluidi non sia efficace (Levy *et al.*, 2018).

Più specificamente le linee guida raccomandano di ottenere emocolture (2 o più set) e colture microbiologiche da tutti i siti sepsigeni potenziali prima dell'inizio della terapia antimicrobica, quando ciò non comporti un ritardo sostanziale (>45 minuti) nell'inizio della terapia stessa. (Rhodes *et al.*, 2017). Tale raccomandazione è rimasta immutata nelle linee guida del 2021 (Evans *et al.*, 2021).

Scopo di questo documento è quello di fornire delle indicazioni, basate sulla evidenza, che prendano in considerazione gli aspetti pre-analitici, analitici e post-analitici delle emocolture. Il documento vuole sottolineare come una buona organizzazione del laboratorio, insieme ad alcuni accorgimenti di ordine tecnico-metodologico possono contribuire a ridurre i tempi di esecuzione e di trasmissione di risultati al clinico, ossia il *turn around time* (TAT), rendendo la diagnosi microbiologica uno degli strumenti più impattanti sull'*outcome* del paziente.

2. EMOCOLTURA PERCHÈ, QUANDO E COME

2.1 Perché

L'emocoltura rappresenta il *gold standard* per la diagnosi delle BSI. È anche la metodica con il miglior rapporto costo/efficacia permettendo di isolare, identificare e testare la sensibilità agli antimicrobici degli isolati batterici e/o fungini. (Singer *et al.*, 2016; Rhodes *et al.*, 2017, De Plato *et al.*, 2020)

2.2 Quando

BOX: L'emocoltura, nel sospetto di BSI, deve essere effettuata quanto prima, non appena viene formulato il sospetto clinico; soprattutto in caso di sepsi e shock settico. Non è raccomandato attendere il picco febbrile o l'insorgenza di brividi.

Una emocoltura va prescritta in risposta al sospetto clinico di batteriemia, associata non solo alla sepsi ma anche a polmonite, meningite, osteomielite e ad altre infezioni. Molti possono essere gli indicatori clinici che inducono alla prescrizione dell'esame, tra cui: la valutazione di segni di infezione localizzata con possibile coinvolgimento sistemico, la febbre o l'ipotermia, la presenza di brividi, la frequenza cardiaca elevata, la riduzione della pressione arteriosa, la variazione della frequenza respiratoria, l'alterato stato di coscienza. A corredo di una clinica suggestiva, il laboratorio fornisce degli importanti elementi che possono essere utili nella valutazione globale, come la conta dei globuli bianchi nell'emocromo, la proteina C reattiva (PCR), la procalcitonina, la proadrenomedullina, i lattati e più recentemente la presepsina (Singer *et al.*, 2016; De Plato *et al.*, 2020; Azim *et al.*, 2021).

Nonostante il timing di esecuzione delle emocolture sia uno dei principali fattori che influenza la sensibilità del metodo, ad oggi non esiste ancora un consenso a riguardo (Lamy *et al.*, 2016; De Plato *et al.*, 2020). Tuttavia, alcuni accorgimenti sono raccomandabili:

- L'esame deve essere prescritto tempestivamente a fronte del sospetto clinico;
- La batteriemia spesso non correla con segni e sintomi specifici, pertanto, non è indicato attendere la comparsa di brivido e/o del picco febbrile per eseguire il prelievo;
- L'esame deve essere eseguito prima o il più lontano possibile dall'inizio della terapia antibiotica empirica, questo tuttavia non deve causare ritardi nell'iter terapeutico (Rhodes *et al.,* 2017).

2.3 Come

BOX: La letteratura più recente indica che la "single sample strategy" presenta alcuni vantaggi rispetto allo standard corrente, basato sulla "multi sample strategy", soprattutto se si dispone di un team di personale dedicato e in generale nei reparti di terapia intensiva. In queste condizioni è consigliabile effettuare l'emocoltura tramite una singola venipuntura, utilizzando un kit con materiale pre-ordinato, secondo la tecnica "single sample strategy", prelevando circa 40 mL totali di sangue.

L'esame deve essere eseguito da personale infermieristico formato (è consigliata la presenza di due infermieri, ove praticabile) o addirittura di un *team* dedicato (es. tipo "PICC team") ed è consigliato organizzare un *kit* di prelievo che consenta di avere a disposizione del team tutti i dispositivi necessari per una corretta esecuzione (compresi i dispositivi per la disinfezione). 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.

Laddove possibile è generalmente raccomandata la "*single sample strategy*" ovvero il singolo prelievo di 30-40 mL di sangue da venipuntura periferica, da ripartire nei diversi flaconi di emocoltura (Jaimes *et al.,* 2004). La "*multi sample strategy*" viene utilizzata in specifiche circostanze, non solo legate alla tipologia di paziente, ma più spesso al sospetto di infezione: per esempio questa strategia è alla base della diagnosi di batteriemia associata ad endocardite infettiva subacuta (3 venipunture ad intervalli regolari in 24h, da ripetere in caso di negatività) (Li

*et al.,*1994; CLSI, 2022; Riedel *et al.,*1975; Miller *et al.,* 2018; Dellinger *et al.,*2013) oppure nel sospetto di infezione correlata a device (almeno 1 set dal device e 1 o più dalla vena periferica, simultaneamente).

Nel paziente con CVC, in cui si sospetti (o non si possa escludere) una sepsi catetere-correlata

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 rispetto a dove è posizionato il CVC (es: CVC lato destro, accesso venoso a sinistra) (CLSI, 2022)
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

2.3.a Il volume

Il volume di inoculo rappresenta la variabile più importante.

Tutte le più recenti linee guida prevedono che, indipendentemente dalle modalità di prelievo (*single/multi*) vengano prelevati almeno 30/40 mL di sangue (corrispondenti a 2-3 coppie di flaconi da emocoltura [cioè flacone aerobio e anaerobio]). La sensibilità dell'esame (probabilità di isolare il patogeno in caso di sepsi) aumenta al crescere della quantità di sangue prelevato. Diversi studi condotti sia con sistemi automatici sia in manuale dimostrano la relazione diretta tra volume di sangue prelevato e potere diagnostico dell'esame emocoltura. Tuttavia, è altrettanto noto che passando da 30 mL a 40 mL si ottiene un incremento della positività molto contenuto (circa il 10%) ed un ulteriore incremento fino a 60 mL non è consigliato né produttivo. Il volume raccomandato per ogni flacone è compreso fra 8 -10 mL, questo consente di mantenere un rapporto sangue/brodo di coltura tra 1:5 e 1:10 (rapporto ottimale).

Un volume di sangue >10 mL/flacone può determinare risultati falsi negativi o falsi positivi e la raccolta di una eccessiva quantità di sangue in ogni flacone va evitata (Lin *et al.,*2013).

Per il paziente pediatrico sono disponibili flaconi dedicati: questi possono essere inoculati con un volume di sangue minimo di 1 mL; il volume di sangue massimo per una singola emocoltura pediatrica è di 4 mL. Il volume di sangue inoculato, il tipo e la quantità di flaconi seguono delle tabelle dedicate come per esempio quella presente nelle linee guida IDSA (Miller *et al.,*2018; CLSI, 2022).

2.3.b Con quali presidi.

Prelievo da vena periferica

Il set di prelievo a doppio ago (DA) (farfalla) per la raccolta del sangue direttamente nei flaconi corredato o meno di ISDD (*initial specimen diversion device*) è generalmente da preferirsi 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 (Rupp *et al.,*2017). L'introduzione di *device* corredati da ISDD ha prodotto risultati preliminari molto soddisfacenti, riducendo, in uno studio, il tasso di contaminazione, da 1.78% allo 0.22%. Tuttavia, ulteriori studi più ampi sono necessari per accertare il reale impatto di tali *device*.

A corredo di procedure che ad oggi hanno un elevato grado di standardizzazione e con una rigorosa letteratura si vuole sottolineare che:

- È essenziale strofinare le mani per almeno 30 secondi con gel idroalcolico, prima di procedere al prelievo;
- È essenziale una corretta disinfezione della cute con una soluzione alcolica al 70% e clorexidina al 2% (30 secondi di attesa perché si asciughi);

- È essenziale una corretta disinfezione del tappo dei flaconi di emocoltura con lo stesso presidio antisettico usato per la disinfezione della cute nel rispetto delle indicazioni riportate dal produttore. Questo avviene idealmente poco prima del prelievo;
- È consigliato posizionare l'ago in vena e collegare il set di prelievo prima nel flacone per aerobi, poi nel flacone per anaerobi;
- È essenziale monitorare attentamente durante il prelievo la quantità di sangue prelevato in modo da inoculare ottimamente i flaconi, mantenendo i flaconi verticali e controllando il livello di liquido all'interno.

Non esistono in commercio flaconi sottovuoto capaci di raccogliere una quantità definita di sangue; quindi, il volume di sangue deve essere monitorato durante il prelievo 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.

Il prelievo con siringa non è raccomandato.

Prelievi da cannule periferiche

I prelievi da cannule periferiche sono gravati da un maggior rischio di contaminazione: per questo, è consentito il loro utilizzo solo nei casi in cui risulti impossibile eseguire un prelievo da venipuntura. Si consiglia sempre di utilizzare un ago cannula appena posizionato e di non utilizzare accessi pre-esistenti. È preferibile un prelievo contro-laterale rispetto al catetere/ago-cannula (es. catetere a Dx, prelievo periferico a Sx).

Prelievo nel paziente con CVC, in cui si sospetti (o non si possa escludere) una batteriemia catetere-correlata

A corredo di procedure che ad oggi hanno un elevato grado di standardizzazione e con una abbondante letteratura in campo infermieristico si vuole sottolineare che:

- È essenziale che il prelievo dal/dai cateteri venga eseguito contemporaneamente con quello da vena periferica, dopo aver disinfettato il raccordo con un adeguato presidio antisettico;
- È essenziale non scartare la prima quantità di sangue prelevato dal CVC perché è quella con la più alta concentrazione microbica;
- È essenziale rispettare i volumi di inoculo cercando di immettere in ogni flacone la stessa quantità di sangue: ciò consentirà l'interpretazione dei risultati sulla base dei tempi di crescita.

2.3.c Il numero di flaconi

Il numero di flaconi totali deve essere compreso tra 2 e 3 coppie.

Questo serve a facilitare l'interpretazione dei risultati e a mantenere ottimale la sensibilità. Nel caso di isolamento di microrganismi comunemente ritenuti contaminanti l'attribuzione di un eventuale significato clinico è possibile solo valutando tra i vari *set* di prelievo il numero di set positivi per lo stesso microrganismo sul numero totale di set prelevati (Hall *et al.,* 2006).

Nonostante sia fortemente sconsigliato da tutte le linee guida, l'invio di una singola emocoltura nell'adulto (laddove non rientri in una "aggiunta" ad un protocollo diagnostico di endocardite o candidemia) può essere eseguito in casi selezionati (es. nella gestione del paziente critico in reparti ad alta intensità oppure nei pazienti ematologici). Il valore diagnostico rimane modesto a causa dell'impossibilità di attribuire la corretta interpretazione ad un eventuale positività dovuta ad un microrganismo contaminante (Pappas *et al.,* 2016).

Nel sospetto di infezione correlata a CVC, procedere come indicato nei paragrafi successivi.

Non vi sono evidenze significative che il prelievo di sangue arterioso aumenti la sensibilità rispetto al prelievo venoso, al contrario aumenta i rischi di isolamento dei contaminanti (Miller *et al.,* 2018; De Plato *et al.,* 2019). Il prelievo da CVC si effettua solo nel sospetto di infezione catetere-relata.

Nell'endocardite subacuta oppure in caso di altre condizioni cliniche come infezioni ossee, vegetazioni su *device* endovascolari ecc., caratterizzate da una batteriemia continua, è preferibile

prelevare i 3 set a distanza di 15-30' per documentare la batteriemia continua). Trascorse le prime 24h, qualora i primi due-tre set risultino negativi, è necessario ripetere la campionatura con le stesse modalità.

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 deve basare sui dati clinici. In ogni caso il prelievo non andrebbe mai ripetuto prima di tre giorni dall'inizio della terapia mirata (Miller *et al.,* 2018; Cogliati Dezza *et al.,* 2020).

Ci sono tre eccezioni:

- l'endocardite (la persistenza dell'infezione può richiedere una modifica della terapia);
- le sepsi da *Staphylococcus 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).
- La candidemia (Cogliati Dezza *et al.,* 2020)

2.3.4 I flaconi da usare

Un *set* di emocoltura è per definizione composto da 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, ma è stato dimostrato come questi flaconi siano più performanti anche nel recupero di stafilococchi, enterococchi ed enterobatteri (Grohs *et al.,* 2007).

2.3.5 Il ruolo del Microbiologo Clinico e ulteriori accorgimenti

Il ruolo del microbiologo clinico è quello di essere promotore e parte attiva nello stilare e far rispettare tutte le misure atte a prevenire la contaminazione durante la raccolta, designando gli opportuni indicatori che consentano di verificare gli andamenti nel tempo del tasso di contaminazione per singolo reparto. Il Microbiologo deve partecipare alle attività formative didattiche per la corretta esecuzione del prelievo dell'emocoltura.

Identificazione dei flaconi

Secondo le modalità in uso nell'Azienda di riferimento. La Microbiologia deve essere in grado di riconoscere i diversi flaconi e i diversi *set* (sequenza, 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, entro 2 ore dal prelievo (conservare i flaconi per emocoltura per un tempo >2 ore a temperatura ambiente non è raccomandato) (Willems *et al.,* 2012; CLSI 2022). Incubare quanto prima un flacone, infatti, significa mettere gli eventuali patogeni nelle condizioni ottimali di crescita e questo si traduce in una riduzione del tempo di positivizzazione e quindi del TAT. La lunga permanenza all'esterno di alcuni sistemi di incubazione automatica dedicati può causare una mancata positivizzazione strumentale (Venturelli *et al.,* 2017) in quanto la crescita microbica potrebbe aver già raggiunto il *plateau* fuori dal sistema e non essere più rilevabile dai sistemi di "*detection*" degli incubatori 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.

3. MODALITÀ E TEMPI DI INCUBAZIONE DELLE EMOCOLTURE

BOX: I flaconi di emocoltura devono essere incubati il più velocemente possibile, e comunque entro 2 ore dal prelievo, in sistemi di monitoraggio automatizzati che mantengano i flaconi in osservazione continua Il tempo di incubazione raccomandato è di 5 giorni.

La maggior parte dei laboratori di microbiologia clinica sono dotati di sistemi semiautomatizzati o automatizzati per il monitoraggio continuo delle emocolture che consentono la rilevazione di emocolture positive in un tempo medio compreso fra le poche ore e 3 giorni, garantendo la rilevazione della positività in tempi più contenuti rispetto ai vecchi metodi manuali basati su ispezione visiva del flacone, colorazione di Gram e sub-coltura in cieco di flaconi per emocoltura a intervalli di tempo stabiliti *a priori* (24-48h di incubazione). Nei sistemi a monitoraggio continuo, il periodo di incubazione standard delle emocolture raccomandato è di 5 giorni ad una temperatura di 35 ± 2 °C (CLSI, 2022; Hagiya *et al.,* 2019, Lamy *et al.,* 2016, Lamy *et al.,* 2018, Lamy *et al.,* 2019, Lamy *et al.,* 2020).

Il 92–95% delle emocolture si positivizza entro le prime 24–48 ore di incubazione (Lamy *et al.,* 2019) con tempi in alcuni casi più lunghi per lieviti, batteri anaerobi e batteri particolarmente esigenti (vedi di seguito).

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

4. GESTIONE DELLE EMOCOLTURE POSITIVE

Le emocolture che si positivizzano devono essere prontamente gestite dal laboratorio di Microbiologia e i flaconi positivi devono essere rapidamente rimossi dall'incubatore al momento della segnalazione strumentale. Non è accettabile la gestione *in batch* delle emocolture positive.

Vengono di seguito riportati l'iter standard per il processamento delle emocolture positive e le diverse tecnologie *fast* disponibili per anticipare significativamente i TAT.

4.1 Iter standard

4.1.1 Esame microscopico

Dopo la rimozione dall'incubatore e l'annotazione del tempo di positività, cioè il tempo che intercorre tra l'inizio dell'incubazione e la positivizzazione della emocoltura (i sistemi automatizzati possono riportare tale tempo automaticamente nel LIS), , si procede con l'indagine batterioscopica che consiste nell'allestimento e l'osservazione al microscopio di un vetrino con striscio sottile sottoposto a colorazione di Gram. Devono essere valutate e annotate le caratteristiche morfologico-tintoriali dei microrganismi evidenziati al Gram classificandoli, in relazione alla morfologia (cocchi, bacilli, batteri pleomorfi, lieviti), alla colorazione di Gram nel caso di batteri (gram-positivi, gram-negativi e gram-variabili) e alla loro disposizione nello spazio (ad ammassi, a coppie, a corte catenelle, a lunghe catenelle, a ideogrammi cinesi ecc), con possibile riferimento al genere in caso dei cocchi gram-positivi (stafilococchi, streptococchi, enterococchi) (CLSI, 2022) Le informazioni ottenute nell'indagine microscopica e il tempo di positività della emocoltura costituiscono informazioni sufficienti per un referto preliminare cartaceo, elettronico o telefonico, in base alle procedure aziendali, da condividere con il clinico.

4.1.2 Sub-coltura su terreni agarizzati

Le emocolture positive devono essere sottoposte a sub-coltura su terreni solidi per apprezzare la crescita dei microrganismi. Considerando il primo flacone positivo per un nuovo paziente, tre o quattro gocce di emocoltura devono essere seminate su Trypticase Soy Agar + 5% sangue di montone e Agar Cioccolato (terreni in grado di assicurare la crescita dei microrganismi anche più esigenti), le piastre devono essere immediatamente incubate a 35± 2 °C in 5%CO_2. È largamente diffuso nella pratica laboratoristica l'utilizzo anche di terreni quali l'agar MacConkey (specifico per la crescita di batteri gram-negativi) e il Sabouraud dextrose agar (specifico per la crescita di lieviti) oppure l'utilizzo di terreni cromogeni. Il laboratorio di microbiologia in base al proprio flusso di lavoro e all'ecologia locale può implementare l'utilizzo aggiuntivo di piaste cromogene come quelle per la ricerca di *S. aureus* o selettive come quelle che consentono la crescita esclusivamente di ceppi cefalosporine-resistenti. I flaconi anaerobi positivi devono essere seminati aggiuntivamente anche su un terreno per anaerobi non selettivo, non differenziale arricchito con vitamina K e emina che deve essere incubato in condizioni di anaerobiosi ad una temperatura di 35± 2 °C. Per i flaconi successivi al primo di uno stesso paziente sarà necessario seminare Trypticase Soy Agar + 5% sangue di montone o Agar Cioccolato e terreno per anaerobi ove indicato. La maggior parte dei microrganismi aerobi o anaerobi facoltativi crescono su terreni solidi dopo 24-48h di incubazione. Per gli anaerobi stretti e per i miceti si raccomanda di prolungare il tempo di incubazione (CLSI, 2022).

4.1.3 Identificazione e antibiogramma fenotipico

Per le procedure utilizzate per l'identificazione dei microrganismi isolati dalle sub-colture su terreni solidi e l'antibiogramma fenotipico si rimanda ai manuali di batteriologia (Jorgensen, 2015) e alle linee guida adottate dal Laboratorio.

4.2 Tecnologie fast

BOX: Per i pazienti critici e/o quelli a rischio di più rapida progressione clinica, compatibilmente con la propria organizzazione di laboratorio è consigliata l'implementazione di tecnologie fast che

riducono i TAT di identificazione, mediante rilevazione di geni e/o meccanismi di resistenza, e AST fenotipico, (RAST oppure antibiogramma da colonie dopo incubazione ridotta).

La microbiologia tradizionale, che rappresenta tuttora il *gold standard* per la diagnosi di infezione del torrente circolatorio, è stata affiancata negli ultimi anni da tecniche innovative, rapide ed altamente specifiche che consentono una notevole riduzione dei tempi di refertazione. La riduzione del TAT, ovvero il tempo che intercorre tra la positivizzazione della emocoltura e la produzione di un risultato, rappresenta un *goal* importante per la microbiologia moderna con un impatto importante sul posizionamento di una terapia appropriata e sulla riduzione dei giorni di terapia empirica ad ampio spettro, impattando in modo significativo sull'*outcome* del paziente, sulla spesa correlata al consumo di antibiotici e in una ottica di *antimicrobial stewardship* (Bookstaver *et al.,* 2017).

In Tabella 1 riportiamo le principali tecnologie e applicazioni volte a ridurre i TAT.

Tabella 1 - Principali tecnologie e metodiche *fast* applicabili all'emocoltura positiva

Tecnologia	TAT	Vantaggi	Limiti
MALDI-ToF	1-9 h A seconda che la tecnologia sia applicata direttamente ai flaconi positivi o alle colonie giovani dopo subcoltura	Semplicità di esecuzione. Rapidità. Elevato numero di specie identificabili. Costo di esecuzione del test minimo.	Può essere applicato solo su colture monomicrobiche. Costo strumento elevato
Pannelli sindromici	1-3 h	Semplicità di esecuzione. Rapidità. Sensibilità e specificità elevate. Possibilità di rilevare più target contemporaneamente (indicati per emocolture polimicrobiche). Possibilità di rilevare marker di resistenza.	Numero di specie identificabili limitato ai target del pannello. Costi elevati.
Test fenotipici per la rilevazione dei meccanismi di resistenza	15/30 min	Semplicità di esecuzione. Rapidità. Buone sensibilità e specificità. Costi ridotti.	Numero di determinanti identificabili limitato ai target del pannello.
Test molecolari per la rilevazione dei meccanismi di resistenza	30 min-2h	Semplicità di esecuzione. Rapidità. Ottime sensibilità e specificità.	Numero di geni identificabili limitato ai target del pannello. Costi relativamente elevati.
Antibiogramma fenotipico rapido (RAST)	15 min	Semplicità di esecuzione. Rapidità.	Numero limitato di specie per cui sono disponibili breakpoint.

4.2.1 MALDI-ToF per la identificazione di specie da coltura "giovane" o brodocoltura.

L'identificazione di specie, che viene tradizionalmente effettuata su colonie pure previa crescita del microrganismo su terreno solido, dopo incubazione *over-night*, basata su test biochimici (effettuati in manuale o con sistemi semiautomatizzati) o tramite spettrometria di massa con tecnologia MALDI-ToF, può essere effettuata utilizzando protocolli rapidi da coltura "giovane" o brodocoltura (flacone positivo). L'identificazione di specie da coltura "giovane" prevede la semina delle emocolture positive su terreni agarizzati, una fase d'incubazione ridotta (4-8 ore) e, l'identificazione di specie con tecnologia MALDI-ToF. Questo consente di avere un risultato con circa 12 ore di anticipo rispetto al MALDI-ToF applicato alle colonie dopo una incubazione *over-night* e di oltre 24 ore rispetto all'identificazione biochimica (Idelevich *et al.,* 2014; Bhatti *et al.,* 2014). Deve sempre essere valutata la purezza della coltura e la concordanza del risultato con il dato fornito dall'esame batterioscopico.

L'identificazione di specie da flacone positivo può essere effettuata con tecnologia MALDI-ToF esclusivamente su emocolture monomicrobiche e prevede diversi passaggi di lisi, filtrazione e centrifugazione che possono essere effettuati seguendo protocolli *home-made*, *kit* commerciali (Loonen *et al.,* 2012; Saffert *et al.,* 2012) o attraverso una nuova tecnologia, di recente sviluppo, che concentra i microrganismi presenti nella emocoltura positiva producendo così una "colonia liquida" (Grinberg *et al.,* 2022). Questo consente di avere un risultato con circa 16-24 ore di anticipo rispetto alla microbiologia tradizionale. Anche in questo caso deve sempre essere valutata la concordanza del risultato con il dato fornito dall'esame batterioscopico.

4.2.2 Pannelli sindromici

Sono test molecolari basati su real-time PCR o multiplex nested PCR abbinata a rilevazione su microarray che forniscono una rapida identificazione di specie per la maggior parte dei microrganismi che causano infezioni del torrente circolatorio e sono in grado di rilevare i principali geni di resistenza antimicrobica ad essi associati. Sono test di semplice esecuzione che richiedono da 2 a 5 minuti di manipolazione per la preparazione del test che è completamente automatizzato sia nella fase di estrazione che di amplificazione. L'utilizzo di questi test consente di avere un risultato con 24-48 ore di anticipo rispetto alla microbiologia tradizionale. I risultati ottenuti devono essere sempre confermati con l'esame colturale (Dien Bard *et al.,* 2020) (Tabelle 2 e 3).

Nelle tabelle 2 e 3 sono riportati le caratteristiche e i target di alcuni pannelli sindromici attualmente sul mercato con approvazione CE-IVD ed IVDR (Peri *et al.,* 2021; Dien Bard *et al.,* 2020)

Tabella 2 – Caratteristiche e microorganismi target di alcuni pannelli sindromici attualmente sul mercato con approvazione CE-IVD ed IVDR

Pannello sindromico		Tempo di preparazione del test	Tempo di esecuzione	Targets identificati (*n*)	Microrganismi identificati
FilmArray BCID2		2 min	1h	43	*E. faecalis, E. faecium, L. monocytogenes, Staphylococcus spp., S. aureus, S. epidermidis, S. lugdunensis, Streptococcus spp., S. agalactiae, S. pyogenes, S. pneumoniae, A. calcoaceticus-baumannii complex, B. fragilis, Enterobacterales, E. cloacae complex, E. coli, K. aerogenes, K. oxytoca, K. pneumoniae group, Proteus, Salmonella, S. marcescens, H. influenzae, N. meningitidis, P. aeruginosa, S. maltophilia, C. albicans, C. auris, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. neoformans/gattii*
Unyvero		2 min	5h	50	*S. aureus, Stafilococchi coagulasi-negativi, Streptococcus spp., S. agalactiae, S. pyogenes/dysgalactiae, S. pneumoniae, Enterococcus spp., E. faecalis, L. monocytogenes, C. freundii/koseri, E. coli, E. cloacae complex, E. aerogenes, Proteus spp., K. pneumoniae, K. oxytoca, K. variicola, S. marcescens, A. baumannii complex, P. aeruginosa, S. maltophilia, N. meningitidis, H. influenzae, Corynebacterium spp., Mycobacterium spp., Propionibacterium acnes, Candida spp., C. albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. dubliniensis, C. glabrata, C. krusei, Aspergillus spp*
VERIGENE	GP	5min	3h	16	*E. faecalis, E. faecium, Listeria spp., Staphylococcus spp., S. aureus, S. epidermidis, S. lugdunensis, Streptococcus spp., S. agalactiae, S. pyogenes, S. pneumoniae, S. anginosus group, Micrococcus spp.*
	GN	5min	3h	15	*E. coli, K. pneumoniae, K. oxytoca, P. aeruginosa, S. marcescens, Acinetobacter spp., Citrobacter spp., Enterobacter spp., Proteus spp.*
ePlex	GP	2min	1:30 h	26	*B cereus* group, *B. subtilis* group, *Corynebacterium, C. acnes, Enterococcus, E. faecalis, E. faecium, Lactobacillus, Listeria, L. monocytogenes, Micrococcus, Staphylococcus spp., S. aureus, S. epidermidis, S. lugdunensis, Streptococcus spp., S. agalactiae, S. anginosus* group, *S. pneumoniae, S. pyogenes*, Pan Gram-Negative, Pan *Candida*
	GN	2min	1:30 h	29	*A. baumannii, B. fragilis, Citrobacter, C. sakazakii, Enterobacter* (non-*cloacae* complex), *E. cloacae* complex, *E. coli, F. nucleatum, F. necrophorum, H. influenzae, K. oxytoca, K. pneumoniae* group, *M. morganii, N. meningitidis, Proteus, P. mirabilis, P. aeruginosa, Salmonella, Serratia, S. marcescens, S. maltophilia, Pan Gram-Positive, Pan Candida*
	FP	2min	1:30 h	15	*C. albicans, C. auris, C. dubliniensis, C. famata, C. glabrata, C. guilliermondii, C. kefyr, C. krusei, C. lusitaniae, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. gattii, C. neoformans, Fusarium, Rhodotorula*

Tabella 3 – Determinanti genici di resistenza rilevabili da alcuni pannelli sindromici attualmente sul mercato con approvazione CE-IVD ed IVDR

Geni di resistenza	FilmArray BCID2	Unyvero	VERIGENE		ePlex	
			GP	GN	GP	GN
*mec*A		●	●		●	
*mec*C		●			●	
*mec*A/C	●					
*mec*A/C and MREJ	●					
*van*A		●	●		●	
*van*B		●	●		●	
*van*A/B	●					
ermA		●				
aac(6')/aph(2")		●				
aacA4		●				
bla_{KPC}	●	●		●		●
bla_{NDM}	●	●		●		●
bla_{OXA}	●	●*		●		●
bla_{IMP}	●	●		●		●
bla_{VIM}	●	●		●		●
bla_{CTX-M}	●	●		●		●
mcr-1	●					

* oxa 23, 24/40, 48, 58

4.2.3 Ricerca dei meccanismi di resistenza con test fenotipici o molecolari

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi test in grado di rilevare determinanti di resistenza (test fenotipici) o geni di resistenza (test molecolari). Questi test possono rilevare singoli target come ad esempio il gene *mecA*, o target multipli come ad esempio le carbapenemasi tipo KPC, NDM, IMP, VIM, OXA. Nascono come test da effettuare su singole colonie previa crescita su terreni agarizzati, ma possono essere utilizzati anche partendo da emocoltura positiva (Giordano *et al.,* 2019). Il loro utilizzo risulta di estrema importanza nella predizione dell'antibiogramma fenotipico e quindi di estremo aiuto per il clinico per il posizionamento di una terapia antimicrobica appropriata, con *de-escalation* o *escalation* della terapia empirica (Fiori *et al.,* 2019).

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

4.2.4 Antibiogramma fenotipico rapido

I test di sensibilità eseguiti direttamente da campioni di emocoltura positiva hanno il vantaggio di fornire risultati precoci rispetto all'analisi di isolati provenienti da subcolture (Vasala *et al.,* 2020). La necessità di test rapidi di sensibilità antimicrobica nelle infezioni del torrente cardiocircolatorio è attuale, vista la diffusione di batteri multi-resistenti per i quali la terapia empirica può non essere efficace. Storicamente, l'uso *off-label* del brodo di emocoltura positivo per i test di disco-diffusione o automatizzati è stato ampiamente eseguito nei laboratori diagnostici per anticipare i risultati dell'antibiogramma. Questo approccio era basato sul fatto che la maggior parte delle emocolture sono monomicrobiche e la concentrazione di microrganismi in una emocoltura positiva si avvicina alla concentrazione di 0.5 McFarland, che è quella di inoculo utilizzata per gli AST tradizionali. Tuttavia, la pratica è diventata meno diffusa negli Stati Uniti in seguito all'attuazione di una regolamentazione di laboratorio più rigorosa sotto forma di *Clinical Laboratory Improvement Amendments*, che ha imposto controlli più rigidi sui test di laboratorio (Banerjee *et al.,* 2021). In questa direzione la standardizzazione di un metodo di disco-diffusione direttamente da emocoltura positiva è stata intrapresa da due organizzazioni internazionali che forniscono standard di laboratorio: il Comitato europeo sui test di sensibilità antimicrobica (EUCAST) e l'Istituto di standard clinici e di laboratorio (CLSI).

EUCAST ha validato il metodo di test rapido di sensibilità antimicrobica RAST (Rapid AST) a partire direttamente da campioni di emocoltura positivi, che si basa sulla metodologia della disco-diffusione standard su piastre di agar Muller Hinton e Muller Hinton Fastidious (https://www.eucast.org/rapid_ast_in_bloodcultures). Il metodo è applicabile ai più importanti agenti patogeni di infezione del flusso sanguigno, Gram-negativi (*Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii)* e Gram-positivi (*Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium* e *Streptococcus pneumoniae*) contro un numero definito (anche se clinicamente utile nella maggioranza dei casi) di agenti antimicrobici (Jonasson *et al.,* 2020; Lalezari *et al.,* 2020). Il RAST prevede la lettura della zona di inibizione per ciascuna specie a diversi tempi di incubazione (4, 6, 8 e 16-20 ore). Per l'interpretazione è stata anche introdotta la cosiddetta "area di incertezza tecnica" (ATU) fra le categorie "sensibile" e "resistente", al fine di ridurre i risultati "falsi resistenti" o "falsi sensibili" dovuti al breve tempo di incubazione (Akerlund *et al.,* 2020). Le linee guida dei diversi criteri interpretativi aggiornate sono disponibili sul sito web di EUCAST https://www.eucast.org/rapid_ast_in_bloodcultures.

Ulteriori approcci da brodo di emocoltura positiva per l'AST fenotipico utilizzano tecnologie più sofisticate e dispendiose; come time-lapse imaging (dark-field microscopy, micropatterned plastic microchips oppure broth), light scattering technology, sensor array technology, flow cytometry applying fluorescent dyes e mass measurement by microcantilever (Banerjee *et al.,* 2021; Cenci *et al.,* 2020) e recentemente sistemi che sfruttano i principi di electrochemical sensors (Madhu *et al*., 2022).
Tuttavia, sebbene alcuni studi abbiano dimostrato che l'impiego di tali tecnologie può incidere positivamente sulla gestione della sepsi, riducendo i tempi della terapia empirica e anticipando la terapia appropriata, il loro utilizzo nella routine diagnostica rimane ancora controverso, soprattutto deboli sono le evidenze del loro impatto su *outcome* e/o in termini di riduzione della durata della ospedalizzazione (Banerjee *et al.,* 2021; Cenci *et al.,* 2021).

4.2.5 Antibiogramma da colonia giovane

Un'altra possibilità per ridurre i tempi dell'antibiogramma in modo affidabile ed economico è il sistema *short-term* incubation che consiste nell'utilizzare le colonie cresciute dopo una breve incubazione sui terreni solidi in cui viene subcoltivato il brodo dell'emocoltura positiva (Mauri *et al.,* 2017). Il terreno più adatto per la rapida identificazione e AST di batteri Gram-negativi è l'agar MacConkey e quello per i Gram-positivi è l'agar sangue Columbia (Frobose *et al.,* 2021)

4.2.6 Test molecolari da sangue intero

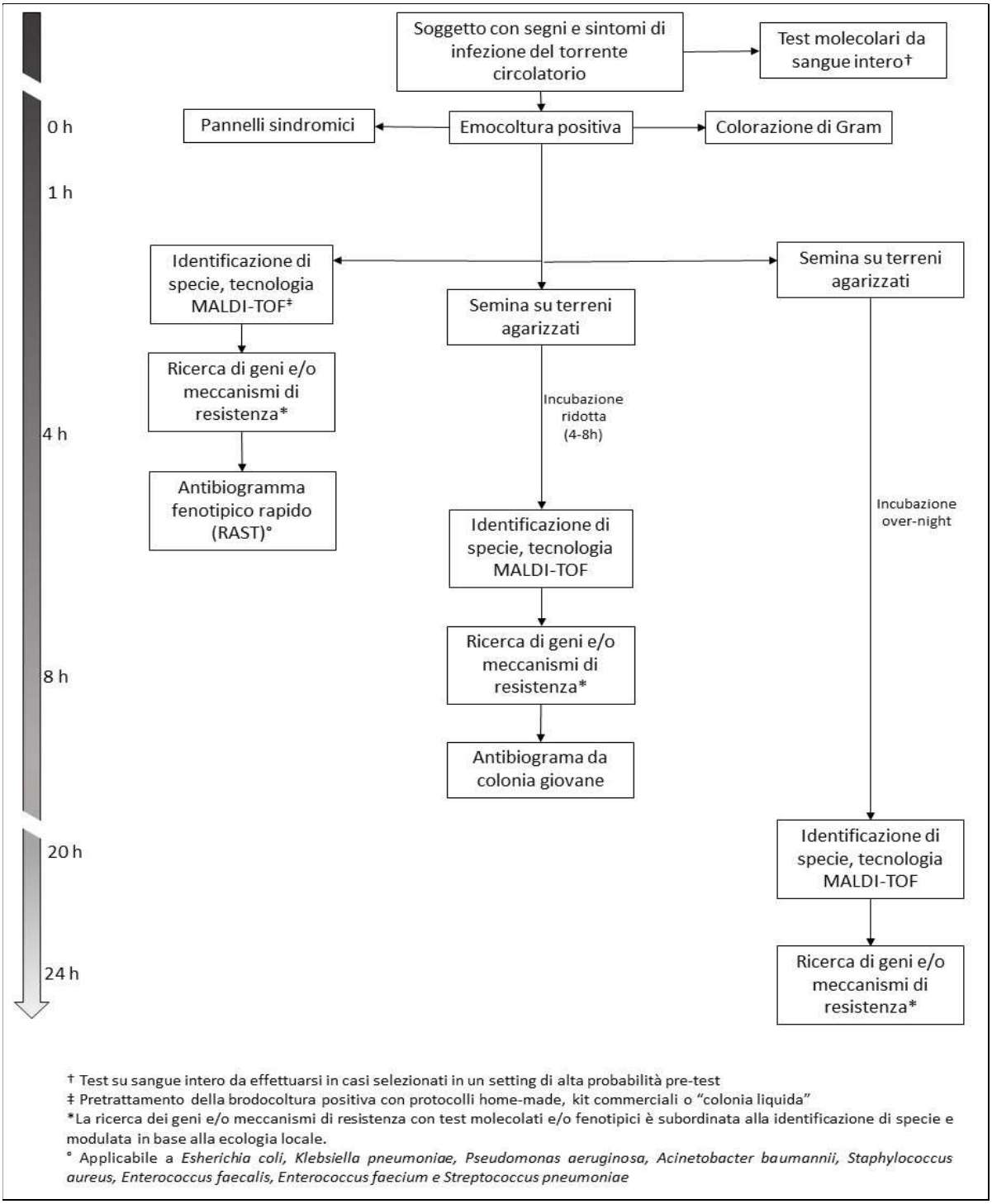
Questi saggi utilizzano come campione sangue intero e non richiedono la positivizzazione dell'emocoltura, consentono quindi di ridurre il TAT poiché non sono subordinati ai tempi di positivizzazione delle emocolture (Peri *et al.,* 2021). Diversi studi hanno dimostrato come l'utilizzo di queste tecnologie ha un grande potenziale, riducendo significativamente i tempi di identificazione, dell'implementazione di una terapia mirata, *de-escalation* di terapia empirica e lunghezza dell'ospedalizzazione, anche in area critica (Giannella *et al.,* 2021). Sono però saggi di difficile interpretazione che devono essere utilizzati in contesti di alta probabilità pre-test per massimizzare l'efficacia (Clancy *et al.,* 2018). Tali test hanno un tempo di esecuzione di 4-5 ore, sono in genere costruiti in modo da essere semplici da eseguire e richiedere un tempo breve di manipolazione (Tabella 4). D'altra parte, però, sono molto costosi, il numero di specie identificabili è limitato, sensibilità e specificità possono non essere ottimali e l'interpretazione dei risultati è spesso complessa.

Tabella 4 – **Caratteristiche dei test molecolari da sangue intero disponibili in commercio per la diagnosi delle infezioni del torrente circolatorio**

Tecnologia	TAT	Vantaggi	Limiti
Test molecolari da sangue intero	4-5 h	Semplicità di esecuzione Rapidità	Costi molto elevati Numero di specie identificabili limitate ai target del pannello Possibili limiti di sensibilità Interpretazione del risultato complessa

Nella figura 1 è rappresentato uno schema di implementazione delle principali tecnologie volte a ridurre il TAT nella diagnosi di infezione del torrente circolatorio. L'inserimento di questi test all'interno della routine di laboratorio dipende dalla complessità dei test da implementare, dalla mole di test da effettuare, dai costi, dal *workflow* e dall'orario di servizio di laboratorio.

Figura 1 - Schema di implementazione delle principali tecnologie *fast* volte a ridurre il TAT nella diagnosi di infezione del torrente circolatorio



Prospettive future: metagenomica

La metagenomica, in particolare la tecnologia next generation sequencing (NGS), rappresenta una tecnologia molto promettente, in quanto può fornire un'analisi completa della genetica microbica in un campione clinico grazie ad un massivo sequenziamento dei genomi che porta alla identificazione dei patogeni e alla caratterizzazione dei determinanti di resistenza. Nonostante sia molto promettente esistono alcune limitazioni che ne impediscono la diffusione e l'utilizzo su ampia scala, quali la frequente identificazione di colonizzanti e contaminanti, la mancanza di standard e controlli di riferimento ben caratterizzati, lunghi TAT, necessità di personale altamente specializzato, elaboratori dedicati e non ultimo costi ancora piuttosto significativi (Peri *et al.,* 2022). Ad oggi esistono alcuni test basati su NGS in grado di identificare più di 1200 patogeni (batteri, funghi, virus e parassiti) contemporaneamente (Parize *et al.,* 2017; Benamu *et al.,* 2018). Si tratta tuttavia di tecniche di recente introduzione in microbiologia il cui ruolo in ambito clinico rimane ancora da esplorare.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

5. PROBLEMATICHE LEGATE ALL'ESAME DELL'EMOCOLTURA

5.1 Differenziare un contaminante da un reale patogeno

Il problema della differenziazione tra un microrganismo contaminante e un vero agente patogeno è molto attuale visto l'aumento delle infezioni del torrente circolatorio da specie batteriche che in genere sono ritenute contaminanti, come nel caso delle infezioni correlate all'assistenza e a dispositivi medico-chirurgici. Sulla base dei dati di prevalenza, è raccomandato che i tassi di contaminazione delle emocolture si mantengano al di sotto del 3.0%. Il tasso di contaminazione è uno degli indicatori di appropriatezza delle emocolture, pertanto il laboratorio deve disporre di programmi informatizzati per la periodica valutazione di tale tasso (vedi paragrafo 15 Appropriatezza ed indicatori di qualità).

Le contaminazioni sono attribuite al trasferimento di microrganismi direttamente dalla cute del paziente o, più raramente, dalle mani degli operatori sanitari. Il College of American Pathologists (CAP) definisce contaminata un'emocoltura in cui sono presenti uno o più batteri in uno solo flacone o in un solo *set* dei due o tre *set* di emocolture, microrganismi quali stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS), *Micrococcus* spp., streptococchi del gruppo viridans, *Cutibacterium acnes, Corynebacterium* spp. e *Bacillus* spp. (Doern *et al.,* 2019; Gonzalez *et al.,* 2020). Il 75-88% dei contaminati sono rappresentati da CoNS. Anche *Enteroccocus* spp., *Abiotrophia/Granulicatella* spp., *Lactobacillus* spp. possono contaminare occasionalmente le emocolture (Estévez Agustín *et al.,* 2022).

Nella pratica di laboratorio, quando uno di questi microrganismi è isolato da un solo flacone o un solo set di due/tre set di prelievo, il microrganismo è da ritenersi un contaminante, tuttavia definire in modo univoco un contaminante talvolta può essere difficile e il significato dell'isolamento dei microorganismi sopraindicati va sempre inquadrato nel contesto clinico (CLSI, 2022, Dargere *et al.,* 2018

Anche nel sospetto di una contaminazione è necessario eseguire l'identificazione del microrganismo mentre l'esecuzione dell'antibiogramma non è raccomandata. Nel referto è necessario indicare l'identificazione di specie, aggiungendo una nota circa il possibile/probabile significato di contaminazione del microrganismo isolato e che il laboratorio conserverà l'isolato per 7 giorni a partire dalla data del referto per eventuale antibiogramma richiesto dal clinico. Nell'eventualità il clinico richieda che venga effettuato l'antibiogramma è raccomandato riportare la nota relativa al possibile/probabile significato di contaminazione del microrganismo isolato.

5.2 Risultati discrepanti

5.2.1 Emocolture segnalate come positive dallo strumento automatico, positive alla colorazione di Gram, con sub-coltura negativa

Rappresentano una quota esigua delle emocolture positive, ma meritano una particolare attenzione in quanto i patogeni che crescono nelle emocolture possono essere microrganismi particolarmente "esigenti" o a lenta crescita. Si raccomanda arricchimento in terreno liquido e subcoltura su terreni specifici addizionali rispetto alla pratica comune e incubazione prolungata delle piastre. La tipologia di terreni addizionali utilizzati nonché le condizioni di incubazione dipendono dal microrganismo esigente (vedi paragrafo 9 "batteri esigenti") (CLSI, 2022). Talvolta può essere necessario l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare (es: utilizzo di pannelli sindromici, sequenziamento 16S).

Un esempio può essere rappresentato da *S. pneumoniae* che, a causa della rapida autolisi in fase di crescita stazionaria, può risultare non rilevabile dai sistemi a monitoraggio continuo delle emocolture nel caso l'incubazione sia ritardata. *Campylobacter* spp. e *Mycoplasma* spp. possono invece causare la positivizzazione dell'emocoltura, alla quale non segue l'isolamento in subcoltura. Lo stesso fenomeno si può osservare con *Plasmodium falciparum* (Ombelet *et al.,* 2019; Nakatani *et al.,* 2021)

5.2.2 Emocolture segnalate come positive dallo strumento automatico, negative alla colorazione di Gram e con sub-coltura negativa.

Rappresentano una quota inferiore all'1% delle emocolture positive (Pohlman *et al.,* 1995). Principali cause di risultati falsi positivi includono una elevata conta leucocitaria, flaconi inoculati con un volume eccessivo di sangue o ritardi nell'incubazione dei flaconi tali per cui i flaconi vengono monitorati con un algoritmo inappropriato (Lamy *et al.,* 2016). Si raccomanda di verificare la curva di crescita microbica nel software del sistema a monitoraggio continuo, la conta dei globuli bianchi, il volume di sangue inoculato e di incubare a lungo le piastre della subcoltura. In questi casi i flaconi possono essere re-incubati nel sistema entro sessanta minuti (Lamy *et al.,* 2016).

5.2.3 Emocolture segnalate come negative dallo strumento automatico, positive alla colorazione di Gram e con sub-coltura o a test molecolari positivi

Tale evenienza è rilevabile solo nel caso in cui siano processati (dietro richiesta del clinico, in caso di fondato e forte sospetto diagnostico) i flaconi che lo strumento automatico segnala negativi durante o al termine del periodo di incubazione previsto (di norma di 5 giorni). Tale evenienza può essere causata da un eccessivo tempo di pre-incubazione (differenza di tempo che intercorre dal momento del prelievo all'inizio dell'incubazione); una bassa temperatura di pre-incubazione; dal tipo patogeno in questione e dal fatto che la tipologia di flacone utilizzata non è adatta alla crescita del patogeno in questione (ad esempio, batterio anaerobio in flacone per aerobi) (Lamy *et al.,* 2016).

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

6. EMOCOLTURE POLIMICROBICHE

A tutt'oggi non esiste una definizione univoca di infezione del torrente circolatorio polimicrobica che può essere definita come:

- Isolamento di più di un agente patogeno dalla stessa emocoltura;
- Isolamento di più di un agente patogeno da una o più emocolture, prelevate nell'arco di 48 ore;
- Isolamento di più di un agente patogeno da una o più emocolture, prelevate nell'arco di 72 ore;
- Isolamento di più di un agente patogeno durante un intero episodio infettivo.

Le infezioni polimicrobiche presentano una prevalenza variabile dal 2 al 14%, a seconda dei criteri di reclutamento e della definizione utilizzata nei differenti studi (Doualeh *et al.,* 2022) e, rispetto alle infezioni del torrente circolatorio sostenute da un unico microrganismo, possono essere più severe (Sancho *et al.,* 2012).

L'applicazione di tecnologie non colturali di *next-generation sequencing* allo studio della sepsi ha dimostrato che un'eziologia polimicrobica può verificarsi più frequentemente di quanto ritenuto fino ad ora, sulla base del solo isolamento in coltura degli agenti eziologici (Tan *et al.,* 2021; Decuypere *et al.,* 2016). La diagnostica microbiologica basata sull'emocoltura mostra una bassa sensibilità e si associa spesso alla mancata identificazione di tutti gli agenti eziologici che concorrono ad un determinato episodio settico, con conseguenti diagnosi non corretta e terapia tardiva e/o non efficace (Tsai *et al.,* 2014). Infatti, i microrganismi possono avere concentrazioni e tempi di crescita diversi nei flaconi di emocoltura. La crescita del microrganismo più abbondante o in fase esponenziale di crescita può essere rilevata dal sistema automatizzato per emocolture prima di quella di microrganismi a bassa concentrazione e/o a lenta crescita (Doualeh *et al.,* 2022). Le nuove versioni MALDI-ToF, come il modulo aggiornato Bruker MBT Sepsityper, sembrano essere migliori consentendo l'identificazione fino a due microrganismi (Scohy *et al.,* 2018). È ormai chiaro che, per superare i limiti della coltura tradizionale, è necessaria l'introduzione nella diagnostica di routine di tecnologie coltura-indipendenti basate su tecnologie molecolari avanzate (Doualeh *et al.,* 2022; Peri *et al.,* 2021). Si rimanda al paragrafo 4.2.2 "pannelli sindromici" per le indicazioni relative all'utilizzo di sistemi molecolari commerciali utili alla identificazione di batteriemie polimicrobiche causate da un pannello definito di agenti eziologici. Altre tecnologie, non specificamente validate per uso diagnostico *in vitro* e alla portata di pochi laboratori, comprendono: sequenziamento genomico (sequenziamento di Sanger, sequenziamento target HT, WGS), fingerprinting (fingerprinting genetico by High-Resolution Melting, fingerprinting genetico by ESI mass spectrometry, fingerprinting proteico by MALDI-ToF mass spectrometry, fingerprinting proteico by surface enhanced raman spectroscopy).

7. INFEZIONI DEL TORRENTE CIRCOLATORIO SOSTENUTE DA BATTERI "DIFFICILI"

I cosiddetti batteri "difficili" o "esigenti" sono organismi con esigenze nutrizionali complesse o particolari. Tali microrganismi, isolati raramente nella pratica di laboratorio, possono essere responsabili di infezioni gravi.

Di seguito vengono elencati i principali batteri esigenti e le problematiche relative al loro isolamento vengono sinteticamente descritte. Per approfondimenti si rimanda al Manuale di Microbiologia Clinica (Jorgensen, 2015)

7.1 *Abiotrophia spp.* e *Granulicatella spp.*

Abiotrophia spp. (con la sola specie *A. defectiva*) e *Granulicatella* spp. (composta da tre specie: *G. adiacens, G. elegans e G. balaenopterae*) sono noti come varianti nutrizionali di streptococchi, poiché necessitano di terreni di coltura arricchiti (come l'agar cioccolato) e presentano una crescita caratteristica con la produzione di piccole colonie satellite attorno a stafilococchi. Il loro ruolo quali responsabili di endocarditi infettive è ben conosciuto. L'identificazione si avvale dell'utilizzo della tecnologia MALDI-ToF MS, mentre i test di sensibilità antimicrobica sono eseguiti con metodo di microdiluizione in brodo (Tellez *et al.,* 2018, Tellez *et al.* 2022).

7.2 *Bartonella spp.*

I batteri del genere *Bartonella* sono patogeni Gram-negativi intracellulari facoltativi, a crescita lenta e tempi di incubazione prolungati (fino a 21 giorni). Nell'uomo *B. bacilliformis*, *B. henselae* e *B. quintana* possono essere causa di infezioni del torrente circolatorio ed endocarditi. L'isolamento da emocoltura può essere tentato su terreni di coltura quali Columbia Blood Agar base, agar cioccolato o Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar, incubati a 35-37°C in 5% di CO_2 per 14-21 giorni, ad eccezione della specie di *B. bacilliformis* che cresce a temperature comprese tra 26-28°C. L'identificazione si avvale principalmente di test sierologici e di metodiche di Real-Time PCR per la rilevazione delle sequenze geniche 16S rRNA (Okaro *et al.,* 2017).

7.3 Brucella *spp.*

Le brucelle sono coccobacilli Gram-negativi piccoli non mobili, non sporigeni e a crescita lenta. *Brucella melitensis* è la specie più virulenta per l'uomo. Nello stadio iniziale della brucellosi è presente una batteriemia continua di basso grado, facilmente rilevabile con un prelievo di due o tre set di emocolture. In questa fase i risultati dei test sierologici risultano negativi o con titoli anticorpali bassi o borderline. Con il progredire dell'infezione, il microrganismo viene sequestrato dai macrofagi ed è quindi difficilmente rilevabile anche prelevando numerosi di emocolture. I fattori che influenzano la possibilità di isolare il microrganismo da emocoltura sono relativi al microorganismo stesso (specie), al paziente (età, durata dei sintomi, malattia sistemica vs focale, prima infezione vs recidiva, precedente o attuale somministrazione di antibiotici) e al prelievo e processazione delle emocolture (volume di sangue e numero di set prelevati, tipologia e durata del monitoraggio delle emocolture, sensibilità del sistema a monitoraggio continuo, esecuzione di subcolture periodiche in cieco (Yagupsky *et al.,* 2019)

Per l'isolamento di *Brucella* spp., i sistemi automatici a monitoraggio continuo, in cui la rilevazione della crescita batterica è basata sulla produzione di CO2 da parte dei microrganismi, non necessitano il prolungamento dell'incubazione rispetto allo standard di 5 giorni (CLSI, 2022).

7.4 Campylobacter spp.

Le specie appartenenti al genere *Campylobacter* possono essere causa di batteriemia nei soggetti ospedalizzati e negli individui immunocompromessi (https://www.cdc.gov/campylobacter/technical.htmL).

Le specie più comuni, quali *C. jejuni*, *C. lari* e *C.fetus* causano principalmente endocarditi infettive e meningiti. Il tempo di incubazione per l'isolamento di *Campylobacter* spp. in sistemi

automatizzati è di 5 giorni. Le subcolture si eseguono su terreni come Columbia blood agar base o terreni selettivi per *Campylobacter*; incubati per almeno 3 giorni in condizioni di microaerofilia. L'identificazione microbiologica può essere effettuata con tecnologia MALDI-ToF MS, i test di sensibilità agli antibiotici possono essere eseguiti con il metodo della microdiluizione in brodo o disco-diffusione (Goyala *et al.,* 2021; https://www.fda.gov › media › 101423 › download).

7.5 Helicobacter spp.

Le batteriemie sostenute da specie di *Helicobacter* enteroepatiche sono frequentemente riportate in pazienti immunocompromessi. Il tempo di positività dell'emocoltura può essere relativamente lungo, molti studi riportano un tempo medio di 3-4 giorni (Araoka *et al.,* 2014). L'isolamento di *Helicobacter* spp. è difficile e in caso di emocoltura negativa dopo 7 giorni di incubazione e forte sospetto clinico si consiglia la subcoltura del brodo in condizioni di microaerofilia, mantenendo percentuali di umidità del 70-80% e tempi di incubazione di almeno 7 giorni (CLSI 2022). L'identificazione si avvale della tecnologia MALDI-ToF su singole colonie.

7.6 Francisella spp.

Francisella tularensis cresce molto lentamente, può richiedere fino a 7 giorni di incubazione per la positività dell'emocoltura e 2-3 giorni per la crescita delle colonie su agar cioccolato. La diagnosi microbiologica si avvale, per l'identificazione, di procedure standard e/o di tecniche molecolari. La sensibilità antibiotica può essere valutata direttamente da emocolture, con saggi rapidi come l'E-test, in grado di fornire concentrazioni di MIC affidabili (Shifman *et al.,* 2021*).* Rari casi di batteriemie causate da specie quali F. *philomiragia* e F. *opportunistica* sp. nov., sono stati descritti in pazienti immunocompromessi (Chua *et al.,* 2021; Dietrich *et al.,* 2020). Devono essere attuate rigorose precauzioni di sicurezza per prevenire la trasmissione all'operatore (mandatoria la manipolazione in laboratori di biosicurezza di classe 3).

7.7 *Batteri del gruppo HACEK*

I suoi componenti sono: *Haemophilus* spp., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Cardiobacterium hominis, Eikenella corrodens* e *Kingella kingae*. Sono batteri Gram-negativi a lenta crescita, che costituiscono il microbiota del cavo orale e del tratto respiratorio superiore, con bassa patogenicità. Nel 1-3% possono essere causa di endocarditi infettive e altre infezioni (Revest *et al.,* 2016; Khaledi *et al.,* 2022). Crescono con difficoltà in coltura, si raccomanda quindi l'utilizzo di terreni arricchiti e/o incubazione in condizioni di CO_2 al 5-10% e tempi di incubazione prolungati.

7.8 *Legionella pneumophila*

L. pneumophila è l'agente eziologico responsabile di forme severe di polmoniti acquisite in comunità (CAP). Il sierogruppo 1 (Lp1) è quello più comunemente isolato e responsabile di numerose epidemie (Ricci *et al.,* 2022). In letteratura, sono stati riportati rari casi di batteriemie da *L. pneumophila* correlate a polmonite, ad endocarditi/miocarditi ed encefaliti ed in pazienti con porpora trombocitopenica idiopatica (Iliadi *et al.,* 2022). La possibilità di recupero di *L. pneumophila* da emocolture è molto limitata, in quanto questo batterio rimane in fase stazionaria, senza replicarsi. Il *gold standard* per la diagnosi di infezione da *L. pneumophila* è l'isolamento del microrganismo in campioni di lavaggio bronco-alveolare (BAL) e espettorato in terreni arricchiti, quali BCYE agar o selettivi quali il Glycine-Vancomycin Polymyxin-Cycloheximide (GVPC). Le colonie crescono in condizioni di microaerofilia (2.5% CO_2) in camera umida e sono ben visibili dopo 4 giorni di incubazione. L'identificazione rapida si esegue con MALDI-ToF MS, tecniche di PCR e/o Real-Time PCR (Iliadi *et al.,* 2022). Un nuovo approccio, alla portata di pochi laboratori, per la diagnosi di legionellosi in campioni di lavaggio bronco-alveolare fluido (BALF) e sangue è basato su test di *next-generation sequencing* (Yue *et al.,* 2021).

7.9 Leptospira spp.

È responsabile di forme respiratorie severe associate a danno renale, con un alto tasso di mortalità. La maggior parte dei casi di leptospirosi si identifica mediante indagini sierologiche. La leptospiremia è di breve durata e si verifica durante la prima settimana di malattia acuta. Le emocolture devono pertanto essere eseguite precocemente ed incubate ad una temperatura di 30° C in quanto *Leptospira* non sopravvive a 35° C. L'isolamento richiede terreni specifici come Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris con aggiunta di 5-fluorouracile ed un tempo di incubazione di almeno 13 settimane e per un massimo di 6 mesi, monitorati settimanalmente mediante esame microscopico in campo oscuro (Girault *et al.,* 2017). Per l'identificazione delle quattro specie di *Leptospira* patogene, *L. borgpetersenii, L. interrogans, L. kirschneri* e *L. noguchiiome,* si utilizzano test di PCR o real-time PCR basati sull'amplificazione dei geni secY e ompL1 e/o del gene lipL32 (Allan *et al.,* 2020; Blanchard *et al.,* 2021).

7.10 Mycoplasma *spp.*

Mycoplasma hominis è un commensale del tratto urogenitale inferiore in adulti sessualmente attivi. *Mycoplasma hominis* e *Mycoplasma pneumoniae* possono determinare infezioni del torrente circolatorio. Occasionalmente *M. hominis* può essere responsabile di batteriemia nei neonati. Le emocolture devono essere incubate per un periodo di 7 giorni con successiva semina su terreni agarizzati SP4 (Waites *et al.,* 2001). Tuttavia la crescita nelle emocolture è molto difficile per gli effetti inibitori del sodio-polyanethol-sulfonato (SPS), un anticoagulante largamente usato nei brodi per emocoltura, e a causa del fatto che tali microrganismi, privi di parete cellulare, difficilmente sopravvivono in vitro. Difficile è anche l'osservazione microscopica che richiede una colorazione con arancio di acridina. L'accuratezza diagnostica aumenta con l'utilizzo di real-time PCR (Oeser *et al.,* 2020).

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

8. INFEZIONI DEL TORRENTE CIRCOLATORIO SOSTENUTE DA MICETI

Anche nel caso delle fungemie/candidemie l'emocoltura rappresenta il *gold standard* diagnostico. La crescita si verifica, in molti casi, entro i cinque giorni di incubazione con alcune eccezioni per *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Exophiala* spp. e per i funghi dimorfi. Tutti i funghi crescono bene nei flaconi per aerobi, mentre l'uso dei flaconi per miceti non è specificamente raccomandato (De Plato *et al.,* 2019). Anche per questi patogeni l'identificazione si può avvalere della tecnologia MALDI-ToF MS e/o di tecniche di biologia molecolare. Utile alla diagnosi delle infezioni del torrente circolatorio da miceti è anche l'utilizzo di sistemi che consentano la valutazione della presenza di antigeni fungini (biomarcatori fungini). Tali test sono basati sul dosaggio di antigeni fungini specifici e/o anticorpi. I biomarcatori più comunemente usati solo la ricerca di antigeni quali mannano, 1-3-β-D-glucano e galattomannano e degli anticorpi anti-mannano ed anti-tubo germinativo di *Candida* (CAGTA) (Martin-Loeches *et al.*, 2019) (Tabella 5).

Tabella 5 – Biomarcatori di Infezione Fungina Invasiva di uso comune

Biomarcatori di candidiasi invasiva	Biomarcatori di aspergillosi invasiva
• Mannano • Anticorpi anti-mannano • CAGTA(*Candida albicans germ tube antibody*) • 1-3-β-D-glucano	• Galattomannano • 1-3-β-D-glucano

Questo approccio diagnostico offre risultati più rapidi per il processo decisionale terapeutico, sebbene l'accuratezza di questi test vari ampiamente in base all'agente eziologico, al tipo di campione, alle caratteristiche cliniche dell'ospite ed al test utilizzato.
Una particolare menzione spetta alle candidemie sostenute da *Candida auris* per la sua diffusa resistenza ai farmaci antifungini e per l'alto tasso di mortalità (~72%) (Borman *et al.,* 2016; Raiesi *et al.,* 2019). È cruciale, nella sorveglianza ospedaliera, la sua rapida identificazione mediante MALDI-ToF MS e Real-time PCR. Alcune tecnologie di biologia molecolare combinate alla risonanza magnetica sono eseguibili direttamente da sangue intero del paziente (*culture free system*) e sono in grado di identificare *C. auris* in poche ore (< 5 ore) con una buona sensibilità: <5 CFU/mL (Lockhart *et al.,* 2022). Per facilitarne l'isolamento in coltura recentemente sono stati sviluppati nuovi terreni cromogeni dedicati (ad esempio CHROMagar™ Candida plus [CHROMagar] o HiCrome™ *C. auris* MDR selective agar [HiMedia]).

9. INFEZIONI DEL TORRENTE CIRCOLATORIO CATETERE-CORRELATE

I dispositivi intravascolari sono diventati componenti essenziali della medicina moderna per la somministrazione per via endovenosa di liquidi, farmaci, emoderivati, nutrizione parenterale, monitoraggio dello stato emodinamico e per emodialisi. La presenza di dispositivi intravascolari porta all'insorgenza delle infezioni catetere-correlate (*catheter-related bloodstream infections*, CRBSI) che costituiscono una importante causa di infezioni nosocomiali. Sono associate ad un aumento di morbidità, mortalità e ad elevati costi ospedalieri (Spelman *et al.,* 2017; Ziegler *et al.,* 2015).

Le linee guida internazionali descrivono ampiamente i punti chiave da applicare per ridurre il rischio di CRBSI (Chaves *et al.,* 2018; Farina *et al.,* 2019). Si stima che il 15-30 % di tutte le batteriemie nosocomiali siano catetere-correlate (Tome *et al.,* 2021).

La CRBSI è sospettata:

- nei pazienti con cateteri endovenosi, in caso di insorgenza di febbre, brividi o altri segni di sepsi
- nei pazienti con infezioni metastatiche (emboli settici)
- nei casi di batteriemia persistente o ricorrente causata da microrganismi che colonizzano la cute.

Nei pazienti con sospetta CRBSI, devono essere eseguite, simultaneamente, due emocolture, una da vena periferica e l'altra da catetere. Per i cateteri venosi a lume multiplo si suggerisce che le colture di sangue siano prelevate da tutti i lumi (stesso volume da ciascun lume) per stabilire una diagnosi di CRBSI. I flaconi per emocolture devono essere incubati tempestivamente al fine di interpretare i risultati sulla base di tempo di positivizzazione di ogni set di emocoltura. L'identificazione del microrganismo nelle infezioni catetere-correlate è considerata cruciale per interpretare il significato del risultato. Stafilococchi coagulasi-negativi, *Cutibacterium* spp., *Bacillus* spp. così come la maggior parte dei *Corynebacterium* spp., considerati in genere contaminanti, rappresentano la principale causa di infezione catetere-correlata (Chaves *et al.,* 2018).

Per le CRBSI batteriche, è necessario misurare la differenza tra i tempi di positivizzazione DTP (*differential time to positivity*) delle emocolture ottenute da catetere venoso centrale e quelle da vena periferica. È altamente suggestiva di CRBSI la positivizzazione delle emocolture ottenute da catetere ≥120 min prima di quelle da una vena periferica per lo stesso microrganismo (stessa specie, stesso fenotipo e stesso antibiotipo). Non è stato stabilito un *cut-off* del DTP ottimale per la diagnosi di candidemia catetere-relata.

L'utilizzo della tecnologia MALDI-ToF MS per l'identificazione rapida dei microrganismi ha un forte impatto clinico nel management dei pazienti con CRBSI. Contrariamente, ad oggi non ci sono studi soddisfacenti circa l'utilizzo delle tecniche di biologia molecolare come metodi di implementazione nella diagnosi di CRBSI.

Metodi conservativi per la diagnosi di CRBSI includono anche il *brushing* endoluminale, le colture superficiali della cute peri-catetere (*exit-site*) e la colorazione di Gram con arancio di acridina. L'osservazione microscopica dei microrganismi considerando 100 campi può essere indicativa di batteriemia catetere-correlata (Chaves *et al.,* 2018).

Per approfondimenti si rimanda al documento del percorso diagnostico Infezioni correlate all'assistenza e dei dispositivi impiantabili, "le infezioni associate ai cateteri vascolari" a cura del GRUPPO DI LAVORO PER LE INFEZIONI CORRELATE ALL'ASSISTENZA E DEI DISPOSITIVI IMPIANTABILI (GLICADI) dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI).

10. ENDOCARDITE INFETTIVA

L'endocardite infettiva (EI) è un'infezione che colpisce l'endocardio con interessamento delle valvole cardiache (native o protesiche) e/o di un dispositivo cardiaco. La EI è classificata come:

- **Acuta**, se la sintomatologia perdura per meno di 6 settimane;
- **Subacuta**, se la sintomatologia perdura per un periodo compreso tra 6 settimane e 3 mesi;
- **Cronica** se la sintomatologia perdura per più di 3 mesi.

Le manifestazioni cliniche includono vegetazioni valvolari, ascessi e miopericarditi (Hubers *et al.,* 2020.

In un paziente con sospetta EI devono essere effettuati almeno due set di emocolture per incrementare il volume di sangue in coltura e consentire l'identificazione di possibili contaminanti (CLSI 2022).

La diagnosi di EI si basa sui criteri diagnostici modificati di Duke, riassunti in tabella 6, in cui gioca un ruolo importante la positività dell'emocoltura (Habib *et al.,* 2015; Rezar *et al.,* 2021).

La diagnosi di EI richiede la soddisfazione di 2 criteri clinici maggiori oppure 1 criterio maggiore e 3 criteri minori oppure 5 criteri minori.

La EI viene definita possibile in presenza di 1 criterio maggiore e 1 criterio minore oppure 3 criteri minori.

La diagnosi di EI viene esclusa quando è presente una diagnosi alternativa definitiva, quando i segni sintomi si risolvono con 4 giorni di terapia antibiotica, quando non vi è evidenza patologica per EI al momento dell'intervento chirurgico (con terapia antibiotica di 4 giorni) e quando i criteri per una EI possibile non sono soddisfatti.

Tabella 6 – Criteri di Duke modificati per la diagnosi di endocardite infettiva

Criteri Maggiori	Criteri Minori
• Isolamento di un tipico agente eziologico di EI[a] da 2 emocolture separate • Emocolture persistentemente positive per qualsiasi microrganismo (almeno 2 emocolture positive da campioni prelevati a una distanza > 12 ore) • Singola emocoltura positiva per *Coxiella burnetii* o titolo anticorpale anti-fase I IgG >1:800 • Ecocardiogramma color doppler positivo per segni di EI tra cui vegetazione, ascesso, nuova deiscenza parziale di una valvola protesica o nuovo rigurgito valvolare	• Predisposizione: condizione cardiaca predisponente o uso di stupefacenti per via endovenosa • Febbre 38°C • Fenomeni vascolari: emboli arteriosi, infarti polmonari settici, aneurisma micotico, emorragia cerebrale, emorragie congiuntivali e lesioni di Janeway • Evidenze microbiologiche che non soddisfano i criteri maggiori • Emocoltura positiva che non soddisfa i criteri maggiori • Fenomeni immunologici (nodi di Osler, macchie di Roth, fattore reumatoide o glomerulonefrite)

Gli approfondimenti di *imaging*, quali tomografia cardiaca computerizza (TC), ecocardiogramma transtoracico (TTE) e tomografia ad emissione di positroni (PET) hanno migliorato l'accuratezza diagnostica delle EI. Le cause di EI sono legate a due fattori:

- comparsa di una batteriemia
- lesioni dell'endocardio e/o del rivestimento endoteliale (Hubers et al., 2020).

La batteriemia associata ad EI è continua e le emocolture rappresentano il *gold standard* diagnostico. Non necessariamente devono essere eseguite in presenza di febbre, e sono raccomandati almeno 2 set di emocolture, possibilmente prima della somministrazione della terapia antibiotica empirica, per incrementare il volume di sangue in coltura e consentire l'identificazione di possibili contaminanti (CLSI 2022).

S. aureus è il principale patogeno correlato a EI, isolato nel 31% dei casi, seguono, streptococchi viridanti, *Enterococcus* spp. e il gruppo dei microrganismi HACEK. La maggior parte di questi microrganismi produce biofilm in grado di eludere il sistema immunitario dell'ospite e di resistere al trattamento antibiotico. Raramente specie di *Candida* e *Aspergillus* sono responsabili di EI, associata alla presenza di grandi vegetazioni, aumentato rischio tromboembolico, di ascessi perivalvolari e ad una scarsa capacità delle terapie antifungine di raggiungere il sito infettivo.

La "endocardite coltura-negativa" riguarda il 5-10% dei casi, caratterizzati da emocoltura negativa (Cox *et al.,* 2020). La diagnosi si basa sull'utilizzo di test molecolari, per di più in house e difficilmente disponibili in commercio per l'uso diagnostico in vitro. I test sierologici possono essere di ausilio, tuttavia è necessario considerare le *cross-reattività* e risultati falsamente positivi (Liesman *et al.,* 2017).

L'endocardite "coltura-negativa" può essere dovuta:

- alla somministrazione di terapia antibiotica prima dell'esecuzione delle emocolture;
- ad agenti eziologici quali "*batteri esigenti o difficili*" quali quelli appartenenti al gruppo HACEK, *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes*, batteri intracellulari come *Bartonella* spp., *Chlamydia* spp., e *Tropheryma whipplei* o fungini, quali *Candida* spp. Si sottolinea come, per la EI da *Legionella* spp., *Chlamydia/Chlamydophila* spp. e *Mycoplasma* spp., di rarissimo riscontro, sono necessari specifici e approfonditi studi finalizzati a stabilire le metodologie e tecnologie più efficaci per la diagnosi microbiologica (Liesman *et al.,* 2017; Hubers *et al.,* 2020);
- alla eziologia non infettiva.

La tabella 7 sintetizza le principali procedure diagnostiche utilizzabili per la diagnosi di EI "coltura-negativa" (Habib *et al.*, 2015)

Tabella 7 – Procedure diagnostiche utilizzabili per la diagnosi delle di endocardite infettiva con emocoltura negativa

Patogeni	Procedure diagnostiche
Brucella spp.	Emocoltura, sierologia, colture, immunoistologia e PCR di materiale chirurgico
Coxiella burnetii	Sierologia (IgG fase I >1:800), coltura tissutale, immunoistologia e PCR di materiale chirurgico.
Bartonella spp.	Emocoltura, sierologia, colture, immunoistologia e PCR di materiale chirurgico
Tropheryma whipplei	Istologia e PCR di materiale chirurgico
Mycoplasma spp.	Emocoltura, sierologia, colture, immunoistologia e PCR di materiale chirurgico
Legionella spp.	Emocoltura, sierologia, colture, immunoistologia e PCR di materiale chirurgico
Miceti	Emocolture, sierologia, PCR del materiale escisso.

11. CONSERVAZIONE DEGLI ISOLATI

BOX: Il laboratorio deve conservare gli isolati, compresi i microorganismi considerati contaminanti, in piastre sigillate o conservare i flaconi di emocoltura positivi a temperatura ambiente per minimo due settimane, per rispondere alla richiesta di eventuali approfondimenti diagnostici da parte del clinico.

Ci sono due modalità per conservare gli isolati batterici, adatte a due diversi obiettivi:

- Conservazione degli isolati per ulteriori indagini finalizzate alle decisioni terapeutiche (ad es., introduzione di un farmaco non saggiato nell'antibiogramma iniziale) o allo studio di determinanti di virulenza (ad es., rilevazione della positività di un isolato di *S. aureus* per Leucocidina di Panton-Valentine): conservare le piastre sigillate o i flaconi di emocoltura positivi a temperatura ambiente per una, massimo due settimane (CLSI, 2022)
- Conservazione degli isolati per ulteriori approfondimenti non direttamente correlati alla gestione clinica del paziente, nell'ambito di studi epidemiologici, di farmaco-resistenza, di virulenza, etc: conservare con l'ausilio di crioprotettori sterili come il glicerolo 10% o il dimetilsolfossido (DMSO) 5% a –20° o meglio, –80°C.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

12. REFERTAZIONE ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dell'emocoltura, positiva o negativa, hanno un impatto rilevante nella cura del paziente settico, nella gestione della terapia antibiotica e nel controllo delle infezioni (Weinbren *et al.,* 2018). I risultati dell'emocoltura positiva devono essere comunicati al clinico rapidamente e tutto l'iter diagnostico, comprese le comunicazioni dei risultati parziali e definitivi, deve essere tracciabile. Nel delineare la tracciabilità si devono scegliere dei sistemi informativi che consentano anche di valutare l'appropriatezza delle richieste e per contro che permettano ai clinici la consultazione dei referti step by step, come: verifica della richiesta, sito di prelievo e numero di set di emocolture inviati in laboratorio, data e ora del prelievo e del *check in* (calcolo del Δ fra ora di prelievo e *check-in*).

È inoltre essenziale poter rilevare con precisione data e ora dell'inizio dell'incubazione delle emocolture e data e ora della positivizzazione di ciascun flacone (*time to detection* [TTD]).

Il referto, generalmente elettronico, deve contenere informazioni chiare su tutto l'iter diagnostico eseguito in laboratorio, deve essere facilmente leggibile e ben organizzato in maniera tale che le varie voci (tempo di positivizzazione, colorazione di Gram, identificazione dell'agente eziologico, eventuali geni e/o determinanti di resistenza ad esso associati, risultati dei test di sensibilità agli antibiotici) siano facilmente interpretabili dai clinici (CLSI 2022).

Considerando l'importanza del dato microbiologico nella gestione del paziente con infezione del torrente circolatorio si raccomanda la produzione di uno o più referti preliminari che precedano il referto definitivo.

12.1 Referti preliminari

È bene che le informazioni derivanti dai vari passaggi dell'iter diagnostico siano resi disponibili nella modalità di referto preliminare. Di seguito si riportano alcuni step che possono essere inclusi in un referto preliminare:

- **Esito della colorazione di Gram.** Il risultato del Gram è mandatorio nell'ottimizzazione della terapia antibiotica e deve essere comunicato al clinico tempestivamente, idealmente entro un'ora dalla positivizzazione. Una ritardata segnalazione di positività comporta un aumento della mortalità (Sautter *et al.,* 2015 e Barenfanger *et al.,* 2008).
- **Esito della identificazione mediante MALDI-ToF MS** utile nell'identificazione rapida di microrganismi direttamente da flaconi di emocolture positivi e/o da colonia giovane.
- **Esiti di pannelli sindromici - multiplex-PCR o microarray**, che consentono di identificare numerosi patogeni e i principali determinanti genici di resistenza agli antibiotici, direttamente da emocoltura positiva e/o da sangue intero. (vedi paragrafo 4.2.2 e 4.2.6). La loro applicazione è strettamente legata a programmi concordati con i clinici in un contesto di stewardship diagnostica (Lamy *et al.,* 2020) e antimicrobica (Jonasson *et al.,* 2020; Sfeir *et al.,* 2020).
- **Esiti dei test genotipici e/o fenotipici rapidi** per la ricerca di geni e/o meccanismi di resistenza (vedi paragrafo 4.2.3).
- **Risultati dell'antibiogramma fenotipico diretto da emocoltura** (vedi paragrafo 4.2.4 Antibiogramma fenotipico rapido).

12.2 Referto definitivo

Il referto definitivo deve essere preferibilmente prodotto per set di emocolture e riportare informazioni relative a entrambi i flaconi del set; deve altresì includere tutte le informazioni dei referti preliminari con l'aggiunta di informazioni quali ad esempio l'antibiogramma da coltura laddove non è possibile eseguire l'antibiogramma fenotipico rapido. Eventuali discordanze rispetto ai risultati preliminari devono essere segnalate chiaramente nel referto definivo tracciando possibilmente data e ora di entrambi.

13. REQUISITI MINIMI DEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA CHE ACCETTA EMOCOLTURE

13.1 Biosicurezza

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

Le emocolture possono essere processate solo nei Laboratori di Microbiologia che possano assicurare la protezione della salute dei lavoratori e personale adeguatamene formato.

Senza entrare nel merito degli aspetti organizzativi e strutturali, si sottolinea che il Laboratorio deve disporre della strumentazione adeguata, di cappe a flusso laminare almeno di secondo livello, nonché di dispositivi di protezione individuale, come previsto dal DL 81/2008 e sue integrazioni.

13.2 Requisiti organizzativi e tecnologici

Negli ultimi anni, l'evoluzione tecnologica ha fornito delle possibilità concrete di miglioramento della qualità dei servizi offerti dai Laboratori di Microbiologia Clinica. In particolare, le tecnologie disponibili consentono di migliorare gli standard qualitativi e di abbreviare i tempi di ottenimento di alcune informazioni rilevanti per la diagnosi eziologica delle infezioni del torrente circolatorio. Tuttavia, le nuove tecnologie sono state adottate dai laboratori in maniera non uniforme (Idelevic *et al.*, 2019). In alcuni casi esiste l'evidenza, supportata da metanalisi, che l'adozione di queste tecnologie comporta un vantaggio in termini di miglior *outcome* per i pazienti o una razionalizzazione dell'utilizzo degli antibiotici. In altri casi, i prodotti di letteratura scientifica disponibili e l'esperienza del panel di stesura di questo documento consentono di formulare alcune raccomandazioni.

Di seguito vengono elencati alcuni requisiti organizzativi o tecnologici essenziali per i Laboratori di Microbiologia Clinica che accettano emocolture:

- Attività di monitoraggio della qualità della fase pre-analitica
- Sistemi per l'informatizzazione dei referti e del flusso dei dati di laboratorio;
- Sistema per il monitoraggio continuo delle emocolture e capacità di incubare i flaconi 24 ore su 24;
- Tecnologia MALDI-ToF per l'identificazione batterica e fungina;
- Sistema molecolare per la ricerca di meccanismi di resistenza e identificazione batterica rapida da brodo di emocoltura positiva
- Biobanca o congelatori per la conservazione degli isolati clinici di interesse

13.2.1 Attività di monitoraggio della qualità della fase pre-analitica

I Laboratori di Microbiologia devono intraprendere un percorso di miglioramento continuo, assieme ai reparti clinici, mirato alla ottimizzazione delle fasi di prelievo, conservazione e trasporto delle emocolture. Nel contesto del percorso di miglioramento devono essere monitorati alcuni parametri qualitativi almeno con cadenza annuale (Lamy *et al.,* 2018):

- Tasso di emocolture singole nelle 24 ore
- Tasso di emocolture che non raggiungono o che superano il volume di sangue ottimale compreso fra 5-10 mL (solo per i Laboratori che dispongono di un sistema automatizzato per il controllo del volume di riempimento dei flaconi) (Khare *et al.,* 2019)
- Tasso di contaminazione delle emocolture (Snyder *et al.,* 2012, cdc *et al.,* 2015)

13.2.2 Sistemi per l'informatizzazione dei referti e del flusso dei dati di laboratorio;

L'introduzione efficace degli strumenti informatici aumenta l'accuratezza, la tempestività e la completezza degli esami microbiologici, riducendo al contempo il carico di lavoro di laboratorio, concorrendo a un'ottimizzazione del flusso di lavoro e alla riduzione dei costi (Rhoads *et al.,* 2014;

Bruins *et al.,* 2011). Uno studio comparativo multi-centrico ha dimostrato che i referti elettronici sono più tempestivi e più completi rispetto ai metodi di comunicazione cartacei o telefonici (Effler 1999).

L'implementazione di sistemi di refertazione elettronici è in genere molto apprezzata dai clinici. I principali vantaggi percepiti sono la riduzione della comunicazione cartacea e la possibilità di interpretare i risultati in relazione ad altri dati dei pazienti (Bruins *et al.,* 2011).

Una revisione sistematica e meta-analisi delle *best-practices* relative alle infezioni del torrente circolatorio ha evidenziato una riduzione della mortalità associata alla implementazione di test molecolari rapidi associati con comunicazione diretta dei risultati al clinico responsabile del paziente (Buehler *et al.,* 2016).

La maggior parte dei laboratori di Microbiologia è dotata di sistemi informatici dedicati (detti anche *Laboratory Information Systems*, LIS), in grado di gestire integralmente il flusso informativo del laboratorio. Questi sistemi costituiscono un supporto imprescindibile per ogni intervento di miglioramento, garantendo la disponibilità di dati standardizzati sui tempi di refertazione cumulativi e dei singoli esami.

13.2.3 Sistema per il monitoraggio continuo delle emocolture e capacità di incubare i flaconi 24 ore su 24;

Vista la gravità clinica e la rapida possibilità di evoluzione di alcune infezioni che coinvolgono il torrente circolatorio e vista l'importanza della diagnosi eziologica nell'impostazione della terapia antimicrobica appropriata, i Laboratori di Microbiologia dovrebbero garantire orari di apertura per l'accettazione e l'incubazione immediata degli esami di emocoltura 24 ore su 24, tutti i giorni dell'anno. Qualora la limitatezza delle risorse umane non consenta la copertura continuativa sono accettabili soluzioni organizzative in cui vengono installati nei reparti di degenza e/o nei reparti di emergenza/urgenza delle strumentazioni *random access* per l'incubazione e il monitoraggio automatico della positività dei flaconi di emocoltura (Lamy *et al.,* 2020).

In questo contesto i sistemi per l'automazione del laboratorio sono fondamentali. In particolare, sono disponibili e rappresentano un supporto irrinunciabile gli strumenti di monitoraggio continuo delle emocolture. Tipicamente, questi strumenti controllano elettronicamente i flaconi per rilevare l'eventuale crescita microbica su base quasi continua, in genere una volta ogni 10 minuti. Le tecniche per il rilevamento di microrganismi sono costantemente migliorate ed anche se nessuno di questi sistemi ha performance perfette, tutti si sono dimostrati utili nel velocizzare il riconoscimento degli agenti eziologici di batteriemia

Inoltre, negli ultimi anni, la riduzione delle risorse economiche e umane disponibili, comune a molte realtà sanitarie, ha frequentemente portato all'accorpamento dei laboratori di microbiologia clinica. A fronte dei conseguenti aumenti dei volumi di campioni, sono stati implementati dei sistemi di automazione aggiuntivi, al fine di facilitare i processi analitici su alti flussi di campioni.

Molteplici esperienze hanno dimostrato che l'introduzione di sistemi per l'automazione in microbiologia conduce a un incremento della qualità, dell'efficienza e a una riduzione dei costi laboratoristici tramite la standardizzazione della fase di semina, incubazione, e alla possibilità di lettura virtuale delle piastre. (Yannick *et al.,* 2015). In particolare, gli strumenti per la automazione della semina dei campioni clinici su terreni solidi si sono dimostrati utili nel migliorare la standardizzazione dell'isolamento, contribuendo in tal modo a un migliore flusso di lavoro complessivo, abbreviando i tempi ai risultati e fornendo risultati più accurati per i campioni polimicrobici (Froment *et al.,* 2014; Strauss & Bourbeau, 2015; Theparee *et al.,* 2018). I sistemi di automazione della semina sono un requisito base per i laboratori con elevati flussi di campioni (almeno 25.000 esami batteriologici/anno).

13.2.4 Tecnologia MALDI-TOF per l'identificazione batterica e fungina

L'esecuzione di un'accurata identificazione a livello di specie del sospetto agente eziologico di infezione è un passaggio fondamentale nella caratterizzazione di tutti i campioni microbiologici

sottoposti a esame colturale. Per molti anni l'identificazione batterica è stata eseguita sulla base delle caratteristiche fenotipiche e biochimiche delle colonie batteriche cresciute su terreni solidi. Tuttavia, questo tipo di approccio forniva spesso risultati ambigui e costringeva a tempi di refertazione lunghi, compresi tra le 18-24 ore.

Negli ultimi anni il processo laboratoristico di identificazione batterica e fungina è stato completamente rivoluzionato dall'introduzione di tecniche basate sulla spettrometria di massa di tipo MALDI-ToF MS, da colonia batterica (Saffert *et al.,* 2012; Croxatto *et al.,* 2012; Patel *et al.,* 2015; Patel *et al.,* 2016). Il successo di questa tecnica è dovuto all'ampio spettro di organismi identificabili, alla rapidità (pochi minuti) di esecuzione, all'accuratezza, alla riproducibilità del metodo e ai costi contenuti. Inoltre, la possibilità di utilizzare queste tecnologie anche per l'identificazione diretta da flacone di emocoltura o da subcoltura precoce (pratica più utilizzata e organizzativamente più sostenibile) (Iedelevic *et al.,* 2019) ha fatto si che la tecnologia MALDI-ToF MS sia stata rapidamente adottata dalla maggior parte dei laboratori di Microbiologia Clinica (Dubourg *et al.,* 2018). È possibile ipotizzare, inoltre, che le applicazioni della tecnologia MALDI-TOF MS in Microbiologia Clinica continueranno a crescere in futuro (Welker *et al.,* 2019).

Numerosi studi hanno dimostrato che l'introduzione della tecnologia MALDI-TOF MS e la conseguente riduzione dei tempi di esecuzione dell'identificazione batterica hanno un impatto positivo su: i) mortalità dei pazienti con batteriemia; ii) appropriatezza della terapia antibiotica; iii) durata della degenza (Delport *et al.,* 2017; Huang *et al.,* 2013; Perez *et al.,* 2013; Osthoff *et al.,* 2017; Nagel *et al.,* 2014; Patel *et al.,* 2016; Beganovic *et al.,* 2017)

È fondamentale notare che la maggior parte dei lavori citati, che documentavano un miglioramento della qualità della terapia antibiotica, prevedevano interventi integrati di antibiotic stewardship assieme all'introduzione della tecnologia MALDI-TOF MS.

13.2.5 Sistema molecolare per la ricerca di meccanismi di resistenza e identificazione batterica rapida da brodo di emocoltura positiva

I test genotipici (o molecolari) per la diagnosi eziologica delle infezioni del torrente circolatorio sono test basati, per la maggior parte, sulla reazione a catena della polimerasi che possono essere utilizzati partendo dal brodo del flacone di emocoltura positiva. In genere questi test prevedono la possibilità di eseguire una identificazione a livello di specie associata alla rilevazione di determinanti genici di resistenza rilevanti, con un tempo di analisi complessivo inferiore alle 3 ore.

Una recente metanalisi ha dimostato che i due principali sistemi commerciali, vale a dire i sistemi Verigene® e FilmArray®, hanno performace elevate in termini di sensibilità e specificità per la rilevazione dei meccanismi di resistenza su flaconi di emocoltura positivi per batteri Gram-negativi (Fiori *et al.,* 2019)

Una metanalisi condotta da Timbrook e colleghi (Timbrook *et al.,* 2016) ha dimostrato come l'introduzione di test genotipici rapidi conduce a una riduzione significativa della mortalità dei pazienti con infezioni del torrente circolatorio, quando l'introduzione del test è associata all'implementazione di un programma di antimicrobial stewardship. Assieme alla riduzione della mortalità, l'utilizzo di questi test conduce ad una riduzione del tempo necessario per l'adozione della terapia antimicrobica appropriata e a una diminuzione della lunghezza media della degenza dei pazienti con infezioni del torrente circolatorio. Gli autori concludono che i test molecolari rapidi (in realtà la metanalisi includeva anche una minoranza di studi in cui venivano adottate le tecniche PNA/FISH o MALDI-ToF) dovrebbero essere considerati come parte degli standard di cura nei pazienti con infezioni del torrente circolatorio.

Una revisione della letteratura e metanalisi condotta da Buehler e colleghi (Buehler *et al.,* 2015) ha evidenziato che tutte e tre le più diffuse strategie diagnostiche rapide finalizzate a ridurre il tempo di comunicazione degli esiti degli esami microbiologici conducono a una riduzione del tempo di implementazione della terapia mirata nei pazienti ospedalizzati con infezioni del torrente circolatorio e, quindi, potenzialmente a un miglioramento dell'*outcome* clinico.

In particolare, sia l'uso di test rapidi molecolari con o senza comunicazione diretta che l'utilizzo di tecniche fenotipiche rapide con comunicazione diretta migliorano la tempestività della terapia mirata. Come detto sopra (paragrafo 14.2.2), gli studi inclusi nella metanalisi mostrano una riduzione significativa e omogenea della mortalità associata all'uso rapidi test molecolari combinati con la comunicazione diretta.

13.2.6 Biobanca o congelatore per la conservazione degli isolati clinici di interesse

Gli isolati clinici di interesse perché caratterizzati da un comportamento particolarmente virulento o da un profilo di antibiotico-resistenza inusuale o esteso dovrebbero essere conservati per lunghi periodi (superiori a una settimana) per possibilità di eventuali re-testing o invio a centri di riferimento.

14. APPROPRIATEZZA ED INDICATORI DI QUALITÀ

BOX: L'emocoltura rappresenta il gold standard ed è uno dei campioni che richiede la massima attenzione da parte del laboratorio. Il miglioramento diagnostico delle emocolture dipende da fattori legati a tutte le fasi da quella preanalitica a quella post-analitica. E' importante che il laboratorio di microbiologia monitori i processi attraverso valutazioni almeno semestrali degli indicatori di appropriatezza e li comunichi ai reparti attraverso relazioni (anche grafiche).

L'emocoltura rappresenta il *gold standard* per la diagnosi microbiologica delle infezioni del torrente circolatorio. Il miglioramento diagnostico delle emocolture dipende da fattori legati a tutte le fasi diagnostiche, preanalitica, analitica e post-analitica. Il prelievo del campione, il tempo prima dell'incubazione, il volume di sangue, il numero di emocolture, il trasporto e la distribuzione nel laboratorio sono procedure preanalitiche che impattano significativamente sulla resa diagnostica (Venturelli *et al.,* 2017). Pertanto, il laboratorio di microbiologia oltre a dare conferma della diagnosi eziologica, deve tenere conto della qualità dell'intero processo, valutando gli indicatori di performance chiave e determinando i valori per una qualità accettabile 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 attività eseguite fuori dal laboratorio come la comunicazione e cooperazione con il personale sanitario. La tabella 8 elenca alcuni esempi di indicatori di performance per ogni fase del percorso diagnostico dell'emocoltura (CLSI 2022).

Tabella 8 – **Indicatori di qualità utili al monitoraggio delle fasi pre-analitica, analitica e post-analitica delle emocolture**

Attività	Indicatori di qualità
1. Fase pre-analitica	
Valutazione del paziente (nel caso di Laboratori in Aziende Ospedaliere in cui il dato sia ricavabile dall'ufficio di gestione)	• Percentuale di pazienti ammessi in ospedale con sospetta infezione del torrente circolatorio per i quali sono ottenute le emocolture come parte dell'iniziale indagine diagnostica
Prelievo delle emocolture	• Percentuale di pazienti per i quali il numero raccomandato di set di emocolture è eseguito (è raccomandato collezionare 2 o 3 set di emocolture in 24 ore per paziente e per ciascun episodio di BSI) • Percentuale di pazienti per i quali più set di emocolture sono eseguiti rispetto a quelli raccomandati: set di emocolture aggiuntivi sono indicati dopo 48/72 ore se non si hanno informazioni dai set iniziali. Emocolture di follow-up o di sorveglianza non sono raccomandati
Valutazione dei campioni	• Percentuale di flaconi con volumi di sangue maggiori o inferiori rispetto al

	volume raccomandato • Percentuale di campioni di emocoltura effettuati da accessi vascolari • Percentuale di campioni di emocoltura rifiutati (per es. flaconi non identificati)
Trasporto dei campioni (per i Laboratori che dispongano di LIS riporti data e ora di prelievo e data e ora di ricezione)	• Percentuale di emocolture inviate con ritardo >2-4h
Ricezione campioni e processamento	• Percentuale di campioni di emocoltura e caricati nel sistema di incubazione dopo un tempo > 30 minuti l'arrivo in laboratorio • Percentulae di singoli set di emocoltura (per paziente) presi in carico dal laboratorio durante un periodo di 24 ore (per i pazienti in ambiente ospedaliero, almeno 2 set di emocoltura sono raccomandati per ogni episodio settico).
2. Fase analitica	
Rilevazione microbica: identificazione e AST, verifica dell'affidabilità dei risultati e interpretazione dei risultati	• Percentuale di flaconi incubati nel sistema di incubazione risultati positivi • Percentuale di segnali falsi positivi dal sistema di incubazione • Percentuale di risultati finali della coltura che non corrispondono ai risultati preliminari (ad esempio, colorazione di Gram, test diagnostico molecolare rapido) • Percentuale di emocolture che richiedono la correzione dei risultati trasmessi • Percentuale di contaminazione (deve essere più bassa possibile. generalmente < 3% come accettabile, ottimale se <1%)
3. Fase post-analitica	
Comunicazione eventuali *alert* ed invio dei risultati preliminari	• Percentuale di emocolture positive per le quali non viene eseguita colorazione di Gram o altro esame appropriato entro 1 ora e/o per le quali i risultati non vengono riportati entro 2 ore • Percentuale di risultati critici segnalati entro 1 ora e con comunicazione documentata (i risultati critici delle emocolture devono essere comunicati al clinico entro 1 ora dall'esito. La comunicazione dovrebbe essere registrata nel registro delle comunicazioni ove previsto dalle politiche aziendali)

15. BIBLIOGRAFIA

Akerlund A, Jonasson E, Matuschek E, Serrander L, Sundqvist M, Kahlmeter G; RAST Study Group. EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories. J Antimicrob Chemother. 2020;75(11).

Allan Kathryn J., Maze Michael J., Galloway Renee L., Rubach Matthew P., et al. Molecular Detection and Typing of Pathogenic Leptospira in Febrile Patients and Phylogenetic Comparison with Leptospira Detected among Animals in Tanzania Am J Trop Med Hyg 2020;103(4):1427-1434.

Araoka H, Baba M, Kimura M, Abe M, Inagawa H, Yoneyama A. Clinical characteristics of bacteremia caused by Helicobacter cinaedi and time required for blood cultures to become positive. J Clin Microbiol. 2014 May;52(5):1519-22. doi: 10.1128/JCM.00265-14. Epub 2014 Feb 26. Erratum in: J Clin Microbiol. 2014 Jul;52(7):2745.

Azim A. Presepsin: A Promising Biomarker for Sepsis. Indian J Crit Care Med. 2021;25(2).

Banerjee R, Humphries R. Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Blood Cultures and Their Clinical Impact. Front Med (Lausanne). 2021 Mar 10;8:635831

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 culturesAm J Clin Pathol 2008, 130: 870.

Beganovic, M., Costello, M. & Wieczorkiewicz, S.M. Effect of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Alone versus MALDI-TOF MS Combined with Real-Time Antimicrobial Stewardship Interventions on Time to Optimal Antimicrobial Therapy in Patients with Positive Blood Cultures. E. Munson, ed. Journal of clinical microbiology, 2017; 55(5), pp.1437–1445.

Benamu E, Gajurel K, Anderson JN, Lieb T, Gomez CA, Seng H, Aquino R, Hollemon D, Hong D, Blauwkamp T, Kertesz M, Blair L, Bollyky PL, Medeiros BC, Coutre S, Zompi S, Montoya JG, Deresinski S. 2294. Evaluation of the Karius Plasma Next-Generation Sequencing Cell-free Pathogen DNA Test to Determine the Etiology of Infection and Impact on Anti-Microbial Management in Patients with Severe Neutropenia and Fever. Open Forum Infect Dis. 2018;5(Suppl 1):S680.

Bhatti MM, Boonlayangoor S, Beavis KG, Tesic V. Rapid identification of positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using prewarmed agar plates. J Clin Microbiol. 2014; 52(12).

Blanchard S, Cariou C, Bouvet J, Valfort W, Oberli F, Villard S, Barret-Hilaire F, Poulet H, Cupillard L, de Saint-Vis B. 2021. Quantitative real-time PCR assays for the detection of pathogenic Leptospira species in urine and blood samples in canine vaccine clinical studies: a rapid alternative to classical culture methods. J Clin Microbiol 2021;59:e03006-20.

Bookstaver PB, Nimmich EB, Smith TJ 3rd, Justo JA, Kohn J, Hammer KL, Troficanto C, Albrecht HA, Al-Hasan MN. Cumulative Effect of an Antimicrobial Stewardship and Rapid Diagnostic Testing Bundle on Early StreamLining of Antimicrobial Therapy in Gram-Negative Bloodstream Infections. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61(9).

Borman AM, Szekely A, Johnson EM. Comparative pathogenicity of United Kingdom isolates of the emerging pathogen Candida auris and other key pathogenic candida species. mSphere. 2016;1(4)

Bruins, M.J. et al.. Does electronic clinical microbiology results reporting influence medical decision making: a pre- and post-interview study of medical specialists. BMC Medical Informatics and Decision Making, 2011; 11(1), p.19.

Buehler, S.S. et al. Effectiveness of Practices To Increase Timeliness of Providing Targeted Therapy for Inpatients with Bloodstream Infections: a LaboFratory Medicine Best Practices Systematic Review and Meta-analysis. Clinical microbiology reviews, 2015; 29(1), pp.59–103.

Cenci E, Paggi R, Socio GV, Bozza S, Camilloni B, Pietrella D, Mencacci A. Accelerate Pheno™ blood culture detection system: a literature review. Future Microbiol. 2020;15.

Chaves F. a, Garnacho-Montero J., del Pozo J.L., Authors: E. Bouza d, J.A. Capdevila e, M. de Cuetof, M.Á. Domínguezg, J. Esteban h, N. Fernández-Hidalgoi , M. Fernández Sampedroj , J. Fortúnk, M. Guembel , L. Lorente m, J.R. Pano, P. Ramírez, M. Salavert, M. Sánchez, J. Vallés Diagnosis and treatment of catheter-related bloodstream infection: Clinical guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology and (SEIMC) and the Spanish Society of Spanish Society of Intensive and Critical Care Medicine and Coronary Units (SEMICYUC) Med Intensiva. 2018;42(1):5-36

Chua Hui Shan, Soh Yih Harng, Loong Shih Keng and AbuBakar Sazaly Francisella philomiragia bacteremia in an immunocompromised patient: a rare case report Ann Clin Microbiol Antimicrob 2021;20:72

Clancy CJ, Nguyen MH. T2 magnetic resonance for the diagnosis of bloodstream infections: charting a path forward. J Antimicrob Chemother. 2018;73(suppl_4).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and Procedures for Blood Cultures. 2nd ed. CLSI guideline M47 (ISBN 978-1-68440-148-2). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2022.

Cogliati Dezza F, Curtolo A, Volpicelli L, Ceccarelli G, Oliva A, Venditti M. Are Follow-Up Blood Cultures Useful in the Antimicrobial Management of Gram Negative Bacteremia? A Reappraisal of Their Role Based on Current Knowledge. Antibiotics (Basel). 2020 11;9(12).

Cox, Daniel A., Tani Lloyd Y. Pediatric Infective Endocarditis: A Clinical Update Pediatr Clin N Am 2020; 67:875–888

Croxatto, A., Prod'hom, G. & Greub, G., 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS microbiology reviews, 36(2), pp.380–407.

Dargère S, Cormier H, Verdon R. Contaminants in blood cultures: importance, implications, interpretation, and prevention. Clin Microbiol Infect. 2018 Sep;24(9):964-969

De Plato F, Fontana C, Gherardi G, Privitera GP, Puro V, Rigoli R, Viaggi B, Viale P. "Collection, transport and storage procedures for blood culture specimens in adult patients: recommendations from a board of Italian experts." Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) 57 (2019): 1680 - 1689.

Decuypere S, Meehan CJ, Van Puyvelde S, De Block T, Maltha J, Palpouguini L, Tahita M, Tinto H. Jacobs J, Deborggraeve S. Diagnosis of Bacterial Bloodstream Infections: A 16S Metagenomics Approach. PLoS Negl. Trop. Dis. 2016;10:e0004470.

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; 41(2).

Delport, J.A. et al. MALDI-ToF short incubation identification from blood cultures is associated with reduced length of hospitalization and a decrease in bacteremia associated mortality. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 2017; 36(7), pp.1181–1186.

Dien Bard J, McElvania E. Panels and Syndromic Testing in Clinical Microbiology. Clin Lab Med. 2020;40(4).

Dietrich Elizabeth A. Kingry Luke C., Kugeler Kiersten J., Levy Craig, Yaglom Hayley, Young John W., Mead Paul S., Petersen Jeannine M. Francisella opportunistica sp. nov., isolated from human blood and cerebrospinal fluid Int J Syst Evol Microbiol. 2020; 70(2).

Doern GV, Carroll KC, Diekema DJ, Garey KW, Rupp ME, Weinstein MP, Sexton DJ. 2019. A comprehensive update on the problem of blood culture contamination and a discussion of methods for addressing the problem. Clin Microbiol Rev 2020; 33:e00009-19.

Doualeh M, Payne M, Litton E, Raby E, Currie A. Molecular Methodologies for Improved Polymicrobial Sepsis Diagnosis. Int J Mol Sci. 2022;23(9).

Dubourg, G., Lamy, B. & Ruimy, R. Rapid phenotypic methods to improve the diagnosis of bacterial bloodstream infections: meeting the challenge to reduce the time to result. 2018 pp.1–9.

Effler, P. Statewide System of Electronic Notifiable Disease Reporting From Clinical Laboratories. JAMA; 1999; pp.1–7.

Estévez Agustín, Mercedes Marín Carlos Sánchez-Carrillo, Machado1Marina, Alcalá Luís, Pinilla Blanca, Delgado Antonia, Ramallo Víctor González, Pedraz Álvaro, Martínez-Sellés Manuel, Bouza Emilio, Valerio Maricela, Muñoz Patricia on behalf of GAME-HGUGM Abiotrophia spp. and Granulicatella spp. Infective Endocarditis: A Contemporary Perspective Front. Biosci. (Elite Ed) 2022; 14(3): 23

Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, Machado FR, Mcintyre L, Ostermann M, Prescott HC, Schorr C, Simpson S, Joost Wiersinga W, Alshamsi F, Angus DC, Arabi Y, Azevedo L, Beale R, Beilman G, Belley-Cote E, Burry L, Cecconi M, Centofanti J, Yataco AC, De Waele J, Dellinger RP, Doi K, Du B, Estenssoro E, Ferrer R, Gomersall C, Hodgson C, Møller MH, Iwashyna T, Jacob S, Kleinpell R, Klompas M, Koh Y, Kumar A, Kwizera A, Lobo S, Masur H, McGloughlin S, Mehta S, Mehta Y, Mer M, Nunnally M, Oczkowski S, Osborn T, Papathanassoglou E, Perner A, Puskarich M, Roberts J, Schweickert W, Seckel M, Sevransky J, Sprung CL, Welte T, Zimmerman J, Levy Executive Summary: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelinesfor the Management of Sepsis and Septic Shock 2021. Crit Care Med. 2021 Nov 1;49(11):1974-1982.

Farina J, Cornistein W, Balasini c, et al. Central venous catheter related infections. Inter-Societes update and recommendations. Medicina 2019; 79(1): 53-60

Fiori B, D'Inzeo T, Posteraro B, Menchinelli G, Liotti FM, De Angelis G, De Maio F, Fantoni M, Murri R, Scoppettuolo G, Ventura G, Tumbarello M, Pennestrì F, Taccari F, Sanguinetti M, Spanu T. Direct use of eazyplex® SuperBug CRE assay from positive blood cultures in conjunction with inpatient infectious disease consulting for timely appropriate antimicrobial therapy in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae bloodstream infections. Infect Drug Resist. 2019;3;12.

Fitzpatrick F, Tarrant C, Hamilton V, Kiernan FM, Jenkins D, Krockow EM. Sepsis and antimicrobial stewardship: two sides of the same coin. BMJ Qual Saf. 2019;28(9).

Froböse NJ, Idelevich EA, Schaumburg F. Short Incubation of Positive Blood Cultures on Solid Media for Species Identification by MALDI-TOF MS: Which Agar Is the Fastest? Microbiol Spectr. 2021;9(1):e0003821. doi: 10.1128/Spectrum.00038-21).

Froment, P. et al., 2014. Automated versus Manual Sample Inoculations in Routine Clinical Microbiology: a Performance Evaluation of the Fully Automated InoqulA Instrument. Journal of clinical microbiology, 52(3), pp.796–802.

Garcia RA, Spitzer ED, Beaudry J, Beck C, Diblasi R, Gilleeny-Blabac M, et al. Multidisciplinary team review of best practices for collection and handling of blood cultures to determine effective interventions for increasing the yield of true-positive bacteremias, reducing contamination, and eliminating false- positive central line-associated bloodstream infections. Am J Infect Control 2015;43:1222e37.

Giannella M, Pankey GA, Pascale R, Miller VM, Miller LE, Seitz T. Antimicrobial and resource utilization with T2 magnetic resonance for rapid diagnosis of bloodstream infections: systematic review with meta-analysis of controlled studies. Expert Rev Med Devices. 2021;18(5).

Giordano L, Fiori B, D'Inzeo T, Parisi G, Liotti FM, Menchinelli G, De Angelis G, De Maio F, Luzzaro F, Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T. Simplified Testing Method for Direct Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Positive Blood Cultures Using the NG-Test Carba 5 Assay. Antimicrob Agents Chemother. 2019; 24;63(7).

Girault Dominique, Soupé-Gilbert Marie-Estelle, Geroult Sophie, Colot Julien, Goarant Cyrille Isolation of Leptospira from blood culture bottles Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2017, 88 (1), pp.17-19.

Gonzalez Mark D., Chao Timothy, Pettengill Matthew A. Modern Blood Culture Management Decisions and Method Options Clin Lab Med 2020;40(4):379-392.

Goyala Dheeraj , Watkinsb Louise K. Francois, Montgomeryc Martha P., Bodeis Jonese Sonya M., Caidib Hayat, Friedmanb Cindy R. Antimicrobial susceptibility testing and successful treatment of hospitalised patients with extensively drug-resistant Campylobacter jejuni infections linked to a pet store puppy outbreak J Glob Antimicrob Resist. 2021 ; 26: 84–90

Grinberg S, Schubert S, Hochauf-Stange K, Dalpke AH, Narvaez Encalada M. Saving Time in Blood Culture Diagnostics: a Prospective Evaluation of the Qvella FAST-PBC Prep Application on the Fast System. J Clin Microbiol. 2022; 60(5).

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

Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta JP, Del Zotti F, Dulgheru R, El Khoury G, Erba PA, Iung B, et al.; Group ESCSD . 2015 ESC guidelines for the management of infective endocarditis: the task force for the management of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). Eur Heart J. 2015;36:3075–3128.

Hagiya H, Yoneda N, Kimura K, Mitsui T, Ueda A, Sunada A, Nishi I, Nakagami F, Rakugi H, Tomono K. Clinical impact of extended blood culture examination: Too much of a good thing. J Infect Chemother. 2019; 7.

Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. Clin Microbiol Rev. 2006;19(4).

Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, Collins CD, 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;57(9):1237-45.

Hubers Scott A., DeSimone Daniel C., Gersh Bernard J., and Anavekar Nandan S., Mayo Infective Endocarditis: A Contemporary Review Clin Proc. 2020;95(5):982-997.

Idelevich E.A., Seifert H.,Sundqvist M.,Scudeller L.,Amit S.,Balode A. et al. Microbiological diagnostics of bloodstream infections in Europe-an ESGBIES survey. Clin Microbiol Infect. 2019; 25: 1399-1407

Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(10).

Iliadi, V.; Staykova, J.; Iliadis, S.; Konstantinidou, I.; Sivykh, P.; Romanidou, G.; Vardikov, D.F.; Cassimos, D.; Konstantinidis, T.G. Legionella pneumophila: The Journey from the Environment to the Blood. J. Clin. Med. 2022; 11, 6126.

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.

Jonasson E., Matuschek E., Kahlmeter G. The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles. J Antimicrob Chemother. 2020;75(4).

Jorgensen JH, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. Eleventh Edition. ASM press 2015

Khaledi Mansoor, Samen Fatemeh, Afkhami Hamed, Hemmati Jaber, Aram Asareh Zadegan Dezfuli, Mohammad-Javad Sanae and Validi Majid Infective endocarditis by HACEK: a review Journal of Cardiothoracic Surgery 2022; 17:185

Khare R., Kothari T., Castagnaro J., Hemmings B., Tso M., Juretschko S. Active monitoring and feedback to improve blood culture fill volumes and positivity across a large integrated health system. Clin Infect Dis. 2019

Lalezari A , Cohen M J Svinik O S Tel-Zur O , Sinvani S , Abed Al-Dayem Y , C Block , A E Moses , Y Oster , S Salameh J Strahilevitz A simplified blood culture sampling protocol for reducing contamination and costs: a randomized controlled trial Clin Microbiol Infect 2020;26(4).

Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti J-J, Tattevin P. How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the art. Front Microbiol 2016;7.

Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA and the ESCMID Study Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis (ESGBIES) Bloodstream infections - Standard and progress in pathogen diagnostics Clin Microbiol Infect 2020;26(2).

Lamy B. Blood culture time-to-positivity: making use of the hidden information. Clin Microbiol Infect. 2019 Mar;25(3).

Lamy B., Ferroni A., Henning C., Cattoen C., Laudat P. How to: accreditation of blood cultures' proceedings. A clinical microbiology approach for adding value to patient care. Clin Microbiol Infect. 2018; 24.

Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. Intensive Care Med. 2018 Jun;44(6):925-928. doi: 10.1007/s00134-018-5085-0. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29675566.

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

Liesman RM, Pritt BS, Maleszewski JJ, Patel R. Laboratory diagnosis of infective endocarditis. J Clin Microbiol 2017; 55:2599-2608.

Lin HH, Liu YF, Tien N, Ho CM, Hsu LN, Lu JJ. Evaluation of the blood volume effect on the diagnosis of bacteremia in automated blood culture systems. J Microbiol Immunol Infect. 2013;46(1).

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.

Lockhart Shawn R., Lyman Meghan M., Joseph Sexton D. Tools for Detecting a "Superbug": Updates on Candida auris Testing J Clin Microbiol. 2022; 60(5): e00808-21

Loonen AJ, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PF, van den Brule AJ. An evaluation 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(7).

Madhu, S.; Ramasamy, S.; Choi, J. Recent Developments in Electrochemical Sensors for the Detection of Antibiotic-Resistant Bacteria. Pharmaceuticals 2022, *15*,1488. https://doi.org/10.3390/ph15121488

Mandell, Douglas, and Bennett' s Principles and Practice of Infectious Diseases di Bennett - Dolin - Blaser 2019

Mangioni D, Viaggi B, Giani T, Arena F, D'Arienzo S, Forni S, Tulli G, Rossolini GM. Diagnostic stewardship for sepsis: the need for risk stratification to triage patients for fast microbiology workflows. Future Microbiol. 2019;14.

Markwart R, Saito H, Harder T, Tomczyk S, Cassini A, Fleischmann-Struzek C, Reichert F, Eckmanns T, Allegranzi B. Epidemiology and burden of sepsis acquired in hospitals and intensive care units: a systematic review and meta-analysis. Intensive Care Med. 2020; 46(8).

Martin-Loeches I, Antonelli M, Cuenca-Estrella M, Dimopoulos G, Einav S, De Waele JJ, Garnacho-Montero J, Kanj SS, Machado FR, Montravers P, Sakr Y, Sanguinetti M, Timsit JF, Bassetti M. ESICM/ESCMID task force on practical management of invasive candidiasis in critically ill patients. Intensive Care Med. 2019 Jun;45(6):789-805. doi: 10.1007/s00134-019-05599-w. Epub 2019 Mar 25. PMID: 30911804.

Mauri C, Principe L, Bracco S, Meroni E, Corbo N, Pini B, Luzzaro F. Identification by mass spectrometry and automated susceptibility testing from positive bottles: a simple, rapid, and standardized approach to reduce the turnaround time in the management of blood cultures. BMC Infect Dis. 2017;17(1).

Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, Gonzalez MD, Jerris RC, Kehl SC, Patel R, Pritt BS, Richter SS, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Snyder JW, Telford S 3rd, Theel ES, Thomson RB Jr, Weinstein MP, Yao JD. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. 2018;67(6).

Nagel, J.L. et al. Impact of antimicrobial stewardship intervention on coagulase-negative Staphylococcus blood cultures in conjunction with rapid diagnostic testing. Journal of clinical microbiology, 2014; 52(8), pp.2849–2854.

Nakatani Ryo, Shimizu Koki, Matsuo Takahiro , Koyamada Ryosuke, Mori Nobuyoshi, Yamashita Takuya and Mori Shinichiro. Campylobacter fetus bacteremia and meningitis in an acute lymphoblastic leukemia patient undergoing maintenance therapy: a case report BMC Infectious Diseases 2021; 21:680

Oeser C, Pond M, Butcher P, Bedford Russell A, Henneke P, Laing K, et al. (PCR for the detection of pathogens in neonatal early onset sepsis. PLoS ONE 2020; 15(1): e0226817.

Okaro U, Addisu A, Casanas B, Anderson B. Bartonella species, an emerging cause of blood-culture-negative endocarditis. Clin Microbiol Rev 2017; 30:709 -746.

Ombelet S, Barbé B, Affolabi D, Ronat JB, Lompo P, Lunguya O, Jacobs J, Hardy L. Best Practices of Blood Cultures in Low- and Middle-Income Countries. Front Med (Lausanne). 2019; 18;6:131

Osthoff M, Gürtler N, Bassetti S, Balestra G, Marsch S, Pargger H, Weisser M, Egli A. Impact of MALDI-TOF-MS-based identification directly from positive blood cultures on patient management: a controlled clinical trial. Clin Microbiol Infect. 2017;23(2):78-85.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. Executive Summary: Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America.Clin Infect Dis. 2016;62(4).

Parize P, Muth E, Richaud C, Gratigny M, Pilmis B, Lamamy A, Mainardi JL, Cheval J, de Visser L, Jagorel F, Ben Yahia L, Bamba G, Dubois M, Join-Lambert O, Leruez-Ville M, Nassif X, Lefort A, Lanternier F, Suarez F, Lortholary O, Lecuit M, Eloit M. Untargeted next-generation sequencing-based first-line diagnosis of infection in immunocompromised adults: a multicentre, blinded, prospective study. Clin Microbiol Infect. 2017;23(8).

Patel, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. Clinical chemistry, 2015 61(1), pp.100–111.

Patel, T.S. et al. Cost Analysis of Implementing Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Plus Real-Time Antimicrobial Stewardship Intervention for Bloodstream Infections P. Bourbeau, ed. Journal of clinical microbiology, 2016 55(1), pp.60–67.

Perez, K.K. et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. Archives of pathology & laboratory medicine, 2013; 137(9), pp.1247–1254.

Peri AM, Stewart A, Hume A, Irwin A, Harris PNA. New Microbiological Techniques for the Diagnosis of Bacterial Infections and Sepsis in ICU Including Point of Care. Curr Infect Dis Rep. 2021;23(8):12.

Pohlman JK, Kirkley BA, Easley KA, Basille BA, Washington JA. Controlled clinical evaluation of BACTEC Plus Aerobic/F and BacT/Alert Aerobic FAN bottles for detection of bloodstream infections. J Clin Microbiol. 1995;33(11):2856-8.

Raiesi Omid , Shabandoust Hajar , Getso Muhammad, Raissi Vahid and Rezaei Ali Akbar Candida auris: A New Emerging Fungal Monster Arch clin Infect Dis 2019; 14(2):e70741.

Revest M, Egmann G, Cattoir V, Tattevin P. HACEK endocarditis: state-ofthe-art. Expert Rev Anti Infect Ther. 2016;14(5).

Rezar Richard, Lichtenauer Michael , Haar Markus, Hodl Georg , Kern Jan Marco, Zhou Zhichao, Wuppinger Thomas, Kraus Johannes, Strohmer Bernhard, Hoppe Uta C., Wernly Bernhard Infective endocarditis A review of current therapy and future challenges Hellenic Journal of Cardiology 2021; 62(3):190-200.

Rhoads, D.D. et al., 2014. Clinical Microbiology Informatics. Clinical microbiology reviews, 27(4), pp.1025–1047.

Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Intensive Care Med. 2017;43(3):304–377.

Ricci M.L., Fillo, S., Ciammaruconi, A., Lista, F., Ginevra, C., Jarraud, S., Girolamo, A., Barbanti, F., Rota, M.C., Lindsay, D., et al. Genome Analysis of Legionella pneumophila ST23 from Various Countries Reveals Highly Similar Strains. Life Sci. Alliance 2022; 5, e202101117.

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

Rupp, ME, Cavalieri, RJ, Marolf, C, Lyden, E. Reduction in blood culture contamination through use of initial specimen diversion device. Clin Infect Dis 2017;65:201–205

Saffert RT, Cunningham SA, Mandrekar J, Patel R. Comparison of three preparatory methods for detection of bacteremia by MALDI-TOF mass spectrometry. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73(1).

Sancho S, Artero A, Zaragoza R, Camarena JJ, González R, Nogueira JM. Impact of Nosocomial Polymicrobial Bloodstream Infections on the Outcome in Critically Ill Patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2012; 31.

Sautter Robert L., Thomson Richard B., Jr. Consolidated Clinical Microbiology Laboratories Journal of Clinical Microbiology 2015; 53:1467–1472

Schlapbach LJ, Kissoon N, Alhawsawi A, Aljuaid MH, Daniels R, Gorordo-Delsol LA, Machado F, Malik I, Nsutebu EF, Finfer S, Reinhart K. World Sepsis Day: a global agenda to target a leading cause of morbidity and mortality. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2020 ;319(3).

Scohy A, Noël A, Boeras A, Brassinne L, Laurent T, Rodriguez-Villalobos H, Verroken A. Evaluation of the Bruker® MBT Sepsityper IVD Module for the Identification of Polymicrobial Blood Cultures with MALDI-TOF MS. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2018; 37.

Sfeir M.M., Satlin M.J., Fauntleroy K.A. Blood-modified carbapenem inactivation method: a phenotypic method for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae directly from positive blood culture broths. J Clin Microbiol. 2020;58(2).

Shifman O., Aminov T., Aftalion M., Gur D., Cohen H., Bar-David E., Cohen O., Mamroud E., Levy H., Aloni-Grinstein R. et al. Evaluation of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacillus anthracis-, Yersinia pestis- and Francisella tularensis-Positive Blood Cultures. Microorganisms 2021; 9, 1055

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 2016;315.

Snyder SR, Favoretto AM, Baetz RA, Derzon JH, Madison BM, Mass D, et al. Effectiveness of practices to reduce blood culture contamination: a laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. Clin Biochem 2012;45:999e1011

Spelman T, Pilcher DV, Cheng AC, et al. Central line-associated bloodstream infections in Australian ICUs: evaluating modifiable and non-modifiable risks in Victorian healthcare facilities. Epidemiol Infect 2017; 145(14):3047e55.

Strauss, S. & Bourbeau, P.P., 2015. Impact of Introduction of the BD Kiestra InoqulA on Urine Culture Results in a Hospital Clinical Microbiology Laboratory B. A. Forbes, ed. Journal of clinical microbiology, 53(5), pp.1736–1740.

Tan CCS, Acman M, van Dorp L, Balloux F. Metagenomic Evidence for a Polymicrobial Signature of Sepsis. Mirob. Genom. 2021;7:00642.

Téllez A, Ambrosioni J, Hernández-Meneses M, Llopis J, Ripa M, Chambers ST, et al. Clinical characteristics and outcome of infective endocarditis due to Abiotrophia and Granulicatella compared to Viridans group streptococci. Journal of Infection. 2022; 85(2):137-146

Tellez A, Ambrosioni J, Llopis J, Pericas JM, Falces C, Almela M, et al. Epidemiology, clinical features and outcome of infective endocarditis due to Abiotrophia spp. and Granulicatella spp.: Report of 76 cases (2000-2015). Clinical Infectious Diseases. 2018; 66: 104–111.

Theparee, T., Das, S. & Thomson, R.B.Total Laboratory Automation and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Improve Turnaround Times in the Clinical Microbiology Laboratory: a Retrospective Analysis. R. Patel, ed. Journal of clinical microbiology, 2018; 56(1), p.1658.

Timbrook T.T., Morton J.B., McConeghy K.W. The effect of molecular rapid diagnostic testing on clinical outcomes in bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis. 2017;64(1):15–23.

Tiseo G, Brigante G, Giacobbe DR, Maraolo AE, Gona F, Falcone M, Giannella M, Grossi P, Pea F, Rossolini GM, Sanguinetti M, Sarti M, Scarparo C, Tumbarello M, Venditti M, Viale P, Bassetti M, Luzzaro F, Menichetti F, Stefani S, Tinelli M. Diagnosis and management of infections caused by multidrug-resistant bacteria: guideline endorsed by the Italian Society of Infection and Tropical Diseases (SIMIT), the Italian Society of Anti-Infective Therapy (SITA), the Italian Group for Antimicrobial Stewardship (GISA), the Italian Association of Clinical Microbiologists (AMCLI) and the Italian Society of Microbiology (SIM). Int J Antimicrob Agents. 2022;60(2).

Tome ML, Garrido Alejandro Sanchez, Perez-Granda María Jesús, Central venous catheter insertion: Review of recent evidence Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology 35 2021; 135e140

Tsai M-H, Chu S-M, Hsu J-F, Lien R, Huang H-R, Chiang M-C, Fu R-H, Lee C-W, Huang Y-C. Polymicrobial Bloodstream Infection in Neonates: Microbiology, Clinical Characteristics, and Risk Factors. PLoS ONE 2014, 9, e83082.

Vasala A, Hytönen VP, Laitinen OH. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance. Front Cell Infect Microbiol. 2020 Jul 15;10:308.

Venturelli C, Righi E, Borsari L, Aggazzotti G, Busani S, Mussini C, Rumpianesi F, Rossolini GM, Girardis M. Impact of Pre-Analytical Time on the Recovery of Pathogens from Blood Cultures: Results from a Large Retrospective Survey. PLoS One. 2017; 12(1).

Viscoli C. Bloodstream Infections: The peak of the iceberg. Virulence. 2016;7(3).

Waites and Canupp Kay C. Evaluation of BacT/ALERT System for Detection of Mycoplasma hominis in Simulated Blood Cultures Journal of Clinical Microbiology 2001; 4328-31

Weinbren MJ, Collins M, Heathcote R, Umar M, Nisar M, Ainger C, Masters POptimization Of The Blood Culture Pathway: A Template For Improved Sepsis, Management And Diagnostic Antimicrobial Stewardship, Journal of Hospital Infection 2018.

Welker, M. et al. An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. Expert review of proteomics, 2019; 16(8), pp.695–710.

Willems E, Smismans A, Cartuyvels R, Coppens G, Van Vaerenbergh K, Van den Abeele A-M, et al. The preanalytical optimization of blood cultures: a review and the clinical importance of benchmarking in 5 Belgian hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis 2012;73:1–8

Yagupsky P. Detection of Brucellae in blood cultures. J Clin Microbiol. 1999 Nov;37(11):3437-42. doi: 10.1128/JCM.37.11.3437-3442.1999. PMID: 10523530; PMCID: PMC85661.

Yannick C, Olivier D , Franceschi Christine, Degout Charmette Elodie , Zambardi Gilles, Cecchini Tiphaine, et al., Rapid Bacterial Identification, Resistance, Virulence and Type Profiling using Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry 2015; Scientific Reports 5:13944

Yue, R.; Wu, X.; Li, T.; Chang, L.; Huang, X.; Pan, L. Early Detection of Legionella pneumophila and Aspergillus by MNGS in a Critically Ill Patient With Legionella Pneumonia After Extracorporeal Membrane Oxygenation Treatment: Case Report and Literature Review. Front. Med. 2021; 8, 686512.

Ziegler MJ, Pellegrini DC, Safdar N. Attributable mortality of central line associated bloodstream infection: systematic review and meta-analysis. Infection 2015;43(1):29e36.

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore