

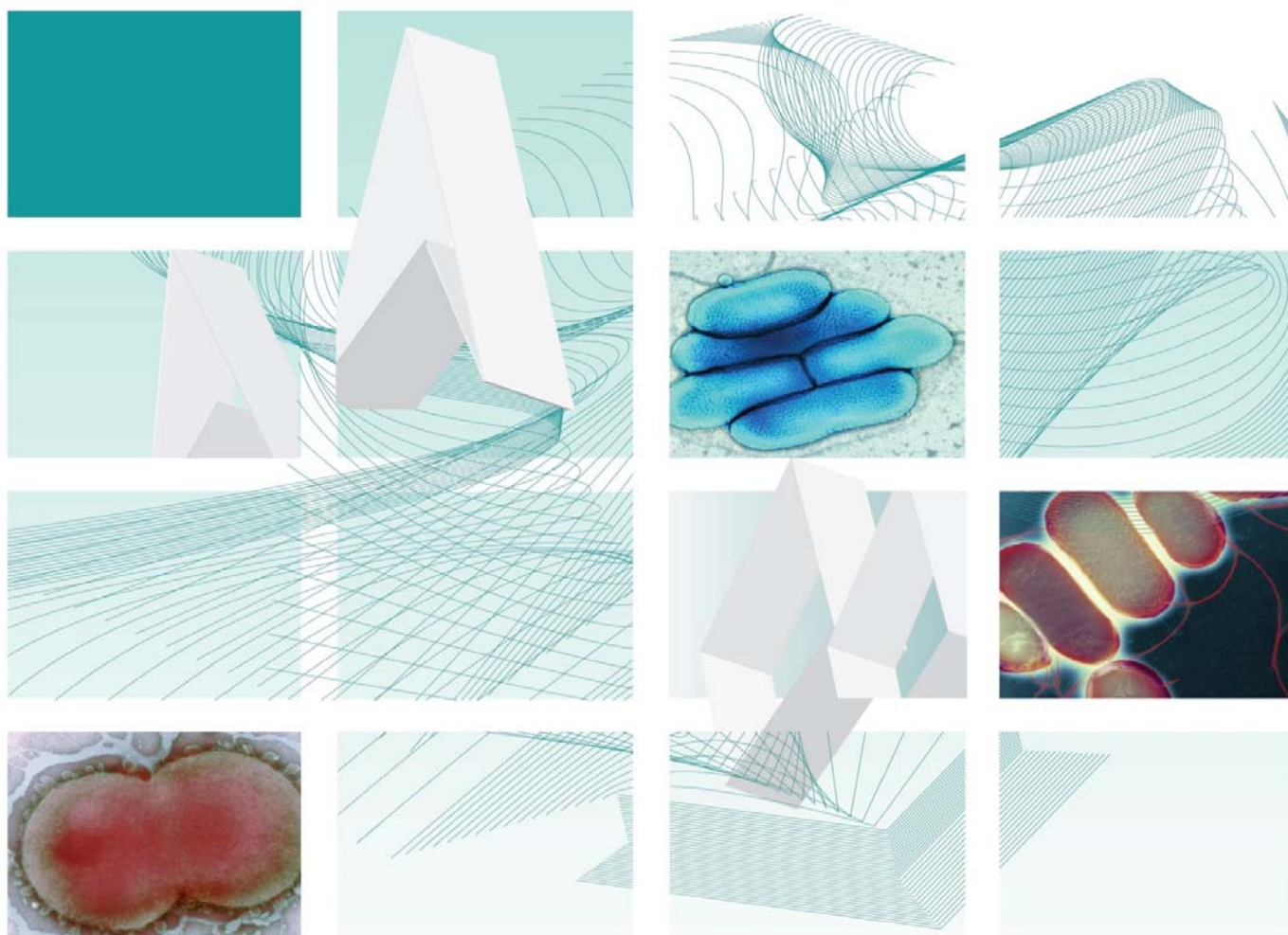


Public Health
England



Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Ricerca con Emocultura (per Microrganismi diversi da specie *Mycobacterium*)



Emesso da Standards Unit, Microbiology Services, PHE

Batteriologia I B 37 I Emissione no: 8 I Data emissione: 04.11.14 I Pagina 1 di 51

Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Public Health England (PHE) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <https://www.gov.uk/government/groups/standards-for-microbiology-investigations-steering-committee>).

Si ringraziano per contributi forniti i numerosi operatori dei laboratori clinici, gli specialisti e i laboratori di riferimento che hanno fornito informazioni e commenti durante lo sviluppo di questo documento. Si ringraziano i Revisori Medici per le modifiche apportate ai contenuti clinici.

Ringraziamo inoltre il Dr Shabnam Iyer, il dottor Mike Weinbren e Ian Sturgess per il loro notevole apporto specialistico.

Per ulteriori informazioni contattare:

Standards Unit
Microbiology Services
Public Health England
61 Colindale Avenue
London NW9 5EQ

E-mail: standards@phe.gov.uk

Website: <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche sono sviluppate con la collaborazione di:



Loghi modificati al momento della pubblicazione

Contenuti

RINGRAZIAMENTI.....	2
TABELLA MODIFICHE	4
SMI DEL RU: SCOPO E OBIETTIVO	5
SCOPO DEL DOCUMENTO	7
INTRODUZIONE.....	9
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI.....	25
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA	27
2 PRELIEVO DEL CAMPIONE	28
3 TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE	29
4 PROCESSO/PROCEDURA SUL CAMPIONE	29
5 PROCEDURA DI REFERTAZIONE	34
6 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE.....	35
APPENDICE 1:PUNTI CRITICI DI CONTROLLO NELLA RICERCA CON EMOCOLTURA..	36
APPENDICE 2: FINETRA TERAPEUTICA.....	37
APPENDICE 3: RICERCA CON EMOCOLTURE (PER MICRORGANISMI DIVERSI DA SPECIE <i>MYCOBACTERIUM</i>)	39
BIBLIOGRAFIA	40



NICE ha accreditato la procedura usata dalla Public Health England per elaborare gli Standards for Microbiology Investigations. L'accreditamento è valido per 5 anni dal Luglio 2011. Informazioni più dettagliate sull'accreditamento possono essere consultate: www.nice.org.uk/accreditation.

Per ulteriori informazioni sul nostro accreditamento consultare: : www.nice.org.uk/accreditation

Tabella delle Modifiche

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso E-mail: standards@phe.gov.uk

I documenti nuovi o revisionati devono essere controllati in ciascun laboratorio in accordo con il sistema locale di gestione della qualità.

Modifica No/Data.	11/04.11.14
Emissione eliminata. no	7.1
Emissione inserita no.	8
Sezione(i) interessate	Modifica.
Documento intero .	Collegamenti ipertestuali aggiornati a gov uk.
Pagina 2	Aggiunti loghi per aggiornamento
Scopo	Aggiunta valutazione su test diagnostici rapidi. Aggiunta nella Tabella 3 interpretazione per quanto riguarda il rilascio dei risultati seguendo le caratteristiche gestionali locali
Introduzione	Inclusione della valutazione per quanto riguarda l'utilità dello screening di sorveglianza nelle unità neonatali. Aggiunto al testo quanto riguarda la rimozione dalla SMI del tempo differenziale di positività e cultura quantitativa differenziale Aggiornati i collegamenti web nella sezione della Identificazione Rapida .
Considerazioni sulla Sicurezza	Aggiunto testo per quanto riguarda le considerazioni di sicurezza per <i>N. meningitidis</i>
Prelievo campione	Specificato il tempo ottimale di prelievo dei campioni per includere la possibilità di prelevare il sangue in qualsiasi momento.
Terreni di coltura, Condizioni e Microrganismi	Aggiunta di nota a piè pagina per quanto riguarda l'incubazione prolungata di flaconi per emocoltura per ricerca di specie <i>Cryptococcus</i> e <i>Histoplasma</i> Aggiunta di cisteina per organismi dipendenti quali quelli bersaglio dell'agar MacConkey/CLED
Procedura di Refertazione	Aggiunte al testo riguardante le strategie per il rilascio dei risultati concordate a livello locale.
Bibliografia	Bibliografia aggiornata

SMI del RU#: Scopo e Obiettivo

Utilizzatori delle SMI

Nel Regno Unito le SMI sono principalmente destinate come risorsa generale ai professionisti che operano nel campo della medicina di laboratorio e delle malattie infettive. Le SMI forniscono ai clinici informazioni in merito allo standard dei servizi di laboratorio riferibili alle ricerche per la diagnosi delle infezioni nei loro pazienti e le documentazioni forniscono indicazioni che facilitano la prenotazione elettronica di test appropriati. I documenti forniscono gli standard per le ricerche microbiologiche anche ai responsabili della sanità pubblica che devono considerarle come parte delle procedure da adottare per la salute sia clinica che pubblica per la propria popolazione.

Informazioni di Base per le SMI

Le SMI comprendono algoritmi e procedure raccomandate che riguardano tutte le componenti del processo diagnostico dalla fase pre-analitica (sindrome clinica) alle diverse fasi analitiche (prove di laboratorio) e post-analitiche (interpretazione e comunicazione dei risultati). Gli algoritmi delle sindromi sono corredati da informazioni più dettagliate contenenti consigli sulle indagini per specifiche malattie e infezioni. Note orientative riguardano il contesto clinico, la diagnosi differenziale e indagini appropriate per particolari condizioni cliniche. Le note orientative descrivono metodologie di laboratorio essenziali che sono alla base della qualità, ad esempio la validazione della prova, la garanzia della qualità, la definizione dell'incertezza della determinazione.

La Standardizzazione del processo diagnostico conseguente all'adozione delle SMI consente di garantire in tutto il Regno Unito strategie d'indagine equivalenti nei diversi laboratori ed è una condizione essenziale per interventi nel campo della sanità pubblica, della sorveglianza, e per le attività di ricerca e di sviluppo.

Collaborazione Paritaria

La preparazione e stesura delle SMI è effettuata mediante collaborazione paritaria fra PHE, NHS, Royal College of Pathologists e le organizzazioni professionali. L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. L'inclusione del logo di una organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del comitato direttivo e dei Gruppi di Lavoro che sviluppano le SMI. Le opinioni dei rappresentanti possono non essere rigorosamente conformi a quelle dei membri delle organizzazioni a cui appartengono né a quelle delle loro organizzazioni. I rappresentanti prescelti rappresentano uno strumento bidirezionale per la consultazione e dialogo. Le opinioni espresse sono ricercate con un processo di consultazione. Le SMI sono sviluppate, revisionate e aggiornate tramite una vasta procedura di consultazione.

Assicurazione di Qualità

Il NICE (National Institute for Health and Care Excellence) ha accreditato la procedura utilizzata dai Gruppi di Lavoro per produrre le SMI. L'accreditamento è applicabile a tutte le linee guida prodotte dall'Ottobre del 2009. La procedura per lo sviluppo delle SMI è certificata dalla ISO 9001:2008. Le SMI rappresentano una procedura standard di buona qualità pratica alla quale si devono attenere per la propria attività tutti i laboratori di microbiologia clinica e di sanità pubblica.

Microbiologia è usato come termine generico per includere le due specialità di Microbiologia Medica riconosciute dal GMC (General Medical Council), (che comprende Batteriologia, Micologia e Parassitologia) e la Virologia Medica.

del Regno Unito. Le SMI sono accreditate dal NICE e non rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio disponibili nel Regno Unito. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche aggiuntive qualora opportune. Le SMI aiutano i laboratori a soddisfare i requisiti dell'accreditamento con la promozione di procedure d'elevata qualità che possono essere verificate. Le SMI forniscono inoltre un punto di riferimento per lo sviluppo del metodo. Queste stesse devono essere utilizzate in associazioni con altre SMI. Le prestazioni della SMI dipendono dal personale ben addestrato e dalla qualità dei reagenti e delle attrezzature utilizzate. I laboratori dovrebbero assicurare che tutti i reagenti di tipo commerciale e quelli messi a punto in laboratorio siano stati validati e risultati idonei allo scopo. I laboratori devono partecipare a programmi di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

Coinvolgimento del Paziente e della Comunità

Nello sviluppo delle SMI i rispettivi Gruppi di Lavoro sono impegnati per favorire il coinvolgimento dei pazienti e dell'opinione pubblica. Grazie al coinvolgimento pubblico, di operatori sanitari, ricercatori e organizzazioni di volontariato la SMI risultante sarà strutturalmente valida e atta a soddisfare le esigenze dell'utente. L'opportunità di partecipazione per contribuire alla consultazione è estesa al pubblico con l'accesso libero al nostro sito web

Informazione della Gestione e dei Dati Sensibili

La PHE è un'organizzazione che condivide le direttive Caldicott. Ciò significa prendere ogni possibile precauzione per prevenire la diffusione non autorizzata di informazioni sui pazienti e di garantire che le informazioni relative agli stessi siano mantenute in condizioni di sicurezza. Lo sviluppo di metodi SMI è assoggettato agli obiettivi PHE di Uguaglianza

<https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/equality-and-diversity>.

I Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità di consultazione efficace con gli appartenenti al pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialistici coinvolti.

Dichiarazione Legale

Mentre ogni cura è stata intrapresa per la preparazione delle SMI, PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, deve, per quanto possibile in base a qualunque legge vigente, escludere la responsabilità per tutte le perdite, costi, reclami, danni o spese derivanti da o connessi all'uso di una SMI o con qualsiasi informazione ivi contenuta. Se si apportano modifiche a una SMI, si deve porre in evidenza dove e da chi sono state effettuate tali modifiche.

Le conoscenze di base e la tassonomia microbica per la SMI sono le più complete possibili, al momento della pubblicazione. Eventuali omissioni e nuove informazioni saranno considerate nel corso della prossima revisione. Queste procedure standard (SMI) possono essere sostituite solo da revisioni dello standard, azione legislativa, o in seguito ad indicazioni da parte dell'ente accreditato NICE.

I diritti d'autore delle SMI sono della "Crown" e questi dovrebbero essere riconosciuti quando appropriato.

Citazione Suggesta per questo Documento

Public Health England. (2014). Investigation of Blood Cultures (for Organisms other than *Mycobacterium* species). UK Standards for Microbiology Investigations. B 37 Emissione 8. . <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Scopo del Documento

Tipo di campione:

Sangue

Nei flaconi per emocultura, quando appropriato, possono essere processati altri tipi di campioni (consultare [B26 – Investigation of fluids from Normally Sterile Sites](#) e [B 38 – Investigation of Bone Marrow](#)).

Scopo

Questo metodo descrive la procedura e la ricerca batteriologica per emoculture e tende a stabilire standard per ciascuna fase del processo di ricerca. Per le emoculture positive sono disponibili test di diagnosi rapida, e questi devono essere considerati idonei all'uso dopo la loro validazione. Le tecniche molecolari dirette su campioni clinici non sono trattati in questa SMI. La SMI non affronta il rilevamento di parassiti, virus (consultare [V 10 - Blood Borne Virus Testing in Dialysis Patients](#)), o specie *Mycobacterium* (consultare [B 40 – Investigation of specimens for Mycobacterium species](#)) e non riferisce dettagli specifici sui sistemi commerciali disponibili.

Questa SMI deve essere utilizzata contemporaneamente con le altre SM.

Standard

Per ottimizzare l'utilità clinica dei risultati dell'emocultura, deve essere ridotto al minimo l'intervallo intercorrente tra la raccolta dei campioni e la refertazione dei risultati. Il tempo di risposta consigliato (TAT - turnaround time), dal prelievo alla refertazione è compreso tra uno e cinque giorni (più a lungo se si sospetta una infezione fungina, se è richiesta incubazione più prolungata, o se gli isolati sono inviati per conferma a un laboratorio di riferimento)¹. Suddividendo il processo, è possibile individuare i punti critici di controllo in cui si possono verificare ritardi o potenziali condizioni per ridurre il TAT (Appendice 1) e per migliorare la prognosi dei pazienti (Appendice 2)². La procedura può essere suddivisa in fase pre-analitica, analitica e post-analitica, tutte queste dovrebbero essere completate entro il tempo raccomandato.

Una volta adottati, gli standard devono essere regolarmente verificati per assicurare che questi siano rispettati e per valutare la prestazione del servizio predisposto³. Questi standard sono finalizzati a enfatizzare la natura critica dell'emocultura per la gestione del paziente; questi non presuppongono che il servizio di patologia deva investire in attrezzature specifiche, ma incoraggiare l'uso ottimale delle risorse già esistenti.

Riassunto Tabella 1: Standard pre-analitici^{1,2,4-8}

I flaconi delle emoculture devono essere incubati il più presto possibile, entro un massimo di quattro ore.

Fase della ricerca:	Standard:
Pre-Analitica	Periodo di Tempo
Dal prelievo all'Incubazione	≤4 ore

Il tempo limite di quattro ore dalla raccolta all'incubazione delle emoculture riflette il loro significato clinico.

Riassunto Tabella 2: Standard Analitici⁷⁻¹¹

I risultati della seguente identificazione e le prove di sensibilità (se eseguite) dovrebbero essere completati entro le seguenti frazioni di tempo dalla comparsa del segnale di positività:

Fase Investigativa :	Criteri:	Standard:
Analitica		
Da segnale Positivo a Identificazione Microscopica, e Prove di Sensibilità	Test (se eseguito)	Tempo per Risultato
	Colorazione Gram	≤2ore
	Test Rapido per Antigene	≤2ore
	Saggi Molecolari	alcuni giorni
	Identificazione isolato (Diretta/Automatizzata)	≤24ore
	Identificazione isolato (Metodi Convenzionali)	24-48ore
	Sensibilità Isolato (Diretta/Automatizzata)	≤24ore
	Sensibilità Isolato (Metodi Convenzionali)	24-48ore

Riassunto Tabella 3: Standard Post-Analitica¹²⁻¹⁹

Gli Standard sono stati pure impostati per il tempo di ritorno del risultato dal laboratorio (tempo che intercorre tra il ricevimento del campione in laboratorio e la refertazione):

Fase di Ricerca:	Criteri:Criteri	Standard:
Post-Analitica		
Referto Negativo (da ricevimento in laboratorio a referto negativo)	Tipo di Referto	Turnaround time
	Referto Preliminare Negativo	48ore * (dipende dalla gestione locale)
	Referto Negativo Finale	≤5 giorni (o superiore per richiesta di incubazione prolungata)
Referto Positivo (da ricevimento in laboratorio a referto negativo)	Referto Preliminare Positivo (Telefono/Fax/Email/Elettronica)	Immediatamente, entro 2 ore da disponibilità di identificazione/sensibilità. (consultare Riassunto della precedente Tabella 2)
	Referto Positivo Finale	≤5 giorni (o maggiore per richiesta di incubazione prolungata, o se gli isolati sono stati inviati per conferma al laboratorio di riferimento)

*Fare riferimento alla sezione della sepsi neonatale per disporre di altre informazioni per quanto riguarda la refertazione negativa dell'emocoltura neonatale¹⁸⁻²⁰.

Introduzione

L'emocoltura è considerata "standard di riferimento" per la rilevazione dei microrganismi nel sangue²¹. La cultura dei microrganismi isolati dal sangue è essenziale per la diagnosi microbiologica di batteriemia, fungemia, endocardite infettiva, e molte situazioni infettive associate a una condizione clinica di febbre di origine ignota (PUO - pyrexia of unknown origin)^{21,22}. E' anche importante nella diagnosi delle infezioni del materiale protesico (ad esempio articolazioni e trapianti vascolari) e nella sepsi intravascolare associata a catetere. Le emocolture possono anche rilevare l'infezione ematica associata ad altre malattie infettive, quali polmonite, artrite settica e osteomielite.

La resistenza agli antibiotici presente negli agenti patogeni (in particolare Gram negativi) è la causa più frequente dell'inefficace trattamento empirico dell'infezione del sistema circolatorio. L'identificazione precoce e la sensibilità agli antibiotici degli isolati dall'emocoltura forniscono preziose informazioni diagnostiche su cui si può impostare un'appropriata terapia antimicrobica, in modo da contribuire a ridurre la morbidità e la mortalità, migliorare l'assistenza al paziente e ridurre i costi sanitari^{23,26}. Si raccomanda quindi la riduzione dei tempi di risposta (TAT) in ogni fase del processo, dal trasporto dei campioni alla refertazione dei risultati²¹.

Infezione del Sistema Circolatorio

Il sangue circolante contiene numerosi componenti ad azione antimicrobica costituiti da lisozima, leucociti, immunoglobuline e complemento. I batteri possono penetrare nel sangue da un focus di infezione presente in una sede corporea, da una superficiale colonizzata da flora normale, tramite la rottura della cute o delle membrane mucose, dal tratto gastrointestinale o per introduzione diretta nel sistema vascolare di materiale contaminato²³. Questi batteri sono solitamente rimossi dal sangue circolante in pochi minuti; solo quando le difese dell'ospite sono sopraffatte o eluse, si evidenzia l'infezione sistemica. La mortalità dipende dal tipo di microrganismo infettante e dalla natura della malattia sottostante^{27,28}. L'infezione circolatoria è causata da batteri (batteriemia) o funghi (fungemia) nel sangue e può essere transitoria, intermittente o continua¹².

Transitoria

La batteriemia transitoria esprime una condizione correlata alla presenza di batteri o funghi nel sistema circolatorio per pochi minuti, può essere conseguente a manipolazioni di, o procedure chirurgiche in tessuti infetti o a manovre strumentali su superfici mucose colonizzate. Sono esempi di tipo frequente l'estrazione dentale e la cateterizzazione delle vie urinarie. Può anche essere determinata dalla masticazione in caso di scarsa igiene dentale. La defecazione può essere associata all'ingresso di un esiguo numero di batteri nel sistema circolatorio. La pressione su foruncoli o eruzioni cutanee (spremitura di foruncoli) possono indurre una batteriemia transitoria. I tossicodipendenti per via endovenosa possono avere come sorgente d'infezione aghi contaminati o droghe. La batteriemia transitoria può anche manifestarsi in corso d'infezioni localizzate quali la polmonite pneumococcica e la pielonefrite.

Intermittente

La batteriemia intermittente esprime una condizione "transitoria ricorrente" ed è associata in modo caratteristico ad ascessi intra-addominali non drenanti. Si manifesta precocemente in corso di numerose infezioni localizzate o sistemiche, quali la batteriemia pneumococcica nella polmonite da pneumococco. Le colture prelevate in fase febbrile e dopo l'insorgenza di brividi

possono non rilevare la batteriemia intermittente perché i microrganismi tendono a scomparire prima del prelievo in seguito all'attivazione dei meccanismi di difesa dell'ospite.

Continua

La batteriemia continua suggerisce la presenza di una grave infezione che ha superato le difese dell'ospite. E' inoltre una caratteristica delle infezioni endovascolari, quali l'endocardite infettiva e la tromboflebite suppurativa. Occasionalmente, la batteriemia continua si manifesta associata a sorgenti extra vascolari, in modo particolare nei pazienti immunosoppressi.

Pseudobatteriemia

La pseudobatteriemia si riscontra quando gli isolati colturali originano da sedi diverse da quelle del torrente circolatorio del paziente. La contaminazione dell'emocoltura si può realizzare in qualsiasi fase compresa fra il prelievo ematico e le procedure di laboratorio e può originare da sorgenti di tipo diverso. Sono state descritte epidemie da pseudobatteriemi imputabili a microrganismi ambientali che hanno contaminato liquidi e strumentazione in corsia e laboratorio, o a prelievo non corretto del sangue²⁹⁻³⁰.

Sepsi³¹⁻³³

Il termine Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS- Systemic Inflammatory Response Syndrome) descrive la risposta precoce dell'organismo a lesioni che possono essere di origine infettiva o non infettiva³⁴. La SIRS si manifesta quando sono presenti due o più delle seguenti condizioni cliniche³⁴:

- Temperatura corporea $<36^{\circ}\text{C}$ o $>38^{\circ}\text{C}$.
- Frequenza cardiaca >90 battiti minuto.
- Iperventilazione >20 atti respiratori minuto.
- Conteggio leucocitario >12.000 cellule per μL o <4000 cellule per μL .

La sepsi, in precedenza nota come setticemia, descrive un paziente con SIRS in cui la causa è di tipo infettivo. E' definita come l'infezione con risposta sistemica a, o manifestazioni dell'infezione^{31,34}. Circa il 20% dei casi di sepsi sono associati a batteriemia, il resto è secondario a infezione in altre sedi corporee³⁴. L'incidenza della sepsi continua ad aumentare con percentuale segnalata di mortalità associata del 35 - 65%³⁵. La precoce terapia antibiotica empirica è associata alla riduzione della percentuale di mortalità e a una migliore prognosi clinica^{24,35}. Nella sepsi grave ogni ora di ritardo del trattamento antibiotico determina in un aumento di mortalità^{26,36}.

La sepsi dell'ospite immunocompromesso è definita come SIRS con una o più delle caratteristiche cliniche presenti, associata a eziologia infettiva.

Sepsi Grave

La sepsi grave è definita come sepsi più sepsi-indotta da disfunzione d'organo o di un tessuto ipoperfuso³¹.

Shock settico

Lo shock settico è definito come sepsi-indotta da ipotensione che persiste nonostante la somministrazione adeguata di liquidi³¹. I sintomi clinici sono di solito causati da componenti batterici tossici e/o dalla risposta dell'ospite a questi. Lo shock è più frequentemente osservato nella setticemia da Gram negativi, ma può anche essere associato a microrganismi Gram-

positivi, in particolare con infezione pneumococcica fulminante, streptococchi di Gruppo A di Lancefield e batteriemia da stafilococco³³.

Gli agenti antimicrobici sono di scarso aiuto nel combattere gli effetti acuti dello shock; si raccomanda la terapia antibiotica endovena entro la prima ora dal riconoscimento dello shock settico e della sepsi severa³¹. Sono essenziali altri interventi di supporto, come la terapia con liquidi, ventilazione meccanica e mantenimento della pressione sanguigna.

Sepsi Neonatale^{37,38}

La sepsi neonatale è definita come SIRS clinicamente diagnosticata, causata da infezione che si manifesta entro le prime quattro settimane di vita. L'incidenza della sepsi neonatale aumenta con il basso peso alla nascita o la prematurità e può essere diviso in due tipi:

Insorgenza precoce della sepsi neonatale^{18,37}

L'esordio precoce della sepsi neonatale avviene nelle prime 72 ore di vita e di solito è causata da un'infezione ascendente dal tratto genitale materno o, meno frequentemente, per via placentare.

Insorgenza tardiva della sepsi neonatale³⁷

L'esordio tardivo sepsi neonatale avviene dopo le prime 72 ore di vita e i microrganismi possono essere acquisiti dall'ambiente esterno (ad esempio, ospedale o casa). L'infezione è spesso trasmessa dalle mani degli operatori sanitari; i microrganismi colonizzano inizialmente le sedi superiori delle vie respiratorie e progrediscono fino a causare sepsi diffusa, polmonite o meningite.

I microrganismi isolati dalle sedi superficiali, aspirato gastrico e liquido amniotico sono indice di colonizzazione e possono comprendere gli agenti patogeni responsabili della sepsi neonatale. Tuttavia, questi non inducono un'infezione sistemica attiva. L'isolamento di microrganismi dal sangue rappresenta la diagnosi di riferimento dell'infezione batterica sistemica nei neonati. I microrganismi associati alla sepsi neonatale includono^{37,38}:

- Streptococchi β -emolitici, in particolare streptococchi di gruppo B.
- Enterobacteriaceae.
- *S. aureus*.
- Stafilococchi coagulasi negativi.
- *Listeria monocytogenes*.
- Specie *Enterococcus*.
- Pseudomonadi.
- Lieviti.

La Seps neonatale causata da batteri anaerobici è segnalata nella maggioranza dei casi come sostenuta da specie *Bacteroides*, specie *Clostridium* o *Peptostreptococcus*³⁹.

L'utilità dello screening di sorveglianza è controversa⁴⁰. La sorveglianza con lo screening di routine è eseguita in molte unità di patologia neonatale e può essere utilizzata per monitorare le tendenze della flora resistente e definire la politica degli antibiotici⁴¹.

Seguendo le linee guida della NICE, l'uso precoce degli antibiotici all'insorgenza dell'infezione neonatale, può essere usato in considerazione della sospensione del trattamento antibiotico. E'

stato suggerito che 36 ore sono un periodo d'incubazione sufficiente per escludere la sepsi nei neonati asintomatici, tuttavia le emocolture prelevate a neonati nati da <72 ore potrebbero richiedere un'incubazione più prolungata^{18,20,42}.

Infezione Batteriemia in Pazienti Immunocompetenti

Acquisita in comunità

La batteriemia acquisita in comunità insorge spesso nel paziente in precedenza in buona condizione di salute, solitamente in associazione con infezioni focalizzate evidenti quali la polmonite pneumococcica. I microrganismi possono entrare in circolo anche provenendo dalla flora commensale propria del paziente o da una sede infetta non rilevabile e causare infezioni di tipo metastatico (come talvolta in corso di osteomielite da *Staphylococcus aureus*). Altre malattie con batteriemia generalizzata includono la febbre enterica (quale la tifoidea) e la brucellosi.

I microrganismi più comunemente isolati negli adulti con batteriemia acquisita in comunità includono:

- *Escherichia coli*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *S. aureus*
- Altre Enterobacteriaceae
- *Neisseria meningitidis*
- Streptococchi β -emolitici

Batteriemia acquisita in ospedale

L'aumentato ricorso alle procedure invasive quali cateterizzazione, terapia immunosoppressiva, terapia antibiotica, e misure di sostegno alla sopravvivenza, hanno determinato un consistente aumento delle batteriemie, candidemie e altre fungemie acquisite in ospedale. Queste procedure possono consentire l'ingresso di microrganismi nel sangue o indebolire le difese dell'ospite. I microrganismi più frequentemente isolati negli adulti con infezione circolatoria acquisita in ospedale dipendono dalla tipologia del paziente e mutano con la durata della permanenza in ospedale. I microrganismi comprendono⁴³:

- Stafilococchi coagulasi negativi
- *E. coli*
- *S. aureus*
- Altre Enterobacteriaceae
- *Pseudomonas aeruginosa*
- Enterococchi
- Anaerobi
- *S. pneumoniae*
- Lieviti

Molti altri microrganismi sono stati implicati nelle batteriemie acquisite in ospedale e in comunità⁴⁴⁻⁵².

Infezioni associate ad Assistenza sanitaria –(HCA-Healthcare Associated Infection)

Le HCAI si manifestano dopo interventi sanitari tra cui l'assistenza o il trattamento fornito a domicilio, presso l'ambulatorio del medico o la clinica, in case di cura o da assistenza successiva a quella ospedaliera. Nei pazienti che ricevono cure regolari, è spesso difficile determinare con precisione se l'infezione è comunitaria o associata all'assistenza sanitaria; la cooperazione tra la Public Health e il Gruppo dell'Infection Control è quindi essenziale ai fini investigativi ed epidemiologici.

Batteriemia anaerobica

Recenti studi hanno dimostrato che i microrganismi anaerobi rappresentano dall'uno al diciassette per cento delle emocolture positive; i microrganismi anaerobici sono quindi ancora una importante causa di batteriemia e dovrebbero essere ricercati di routine^{39,53-55}. Quelli più frequentemente associati a batteriemia anaerobica includono³⁹:

- Bacilli Gram negativi, comprese le specie *Bacteroides* e *Fusobacterium*.
- *Peptostreptococcus*.
- Specie *Clostridium*.

Infezione del sistema circolatorio nei bambini

L'eziologia della batteriemia pediatrica è mutata negli anni recenti. Le infezioni da *Haemophilus influenzae* di tipo b sono diminuite in modo significativo in seguito al programma di vaccinazione Hib, mentre sono aumentate le infezioni nosocomiali di tipo sistemico. I microrganismi di più frequente riscontro isolati dai bambini con batteriemie di tipo comunitario includono:

- *S. pneumoniae*
- *N. meningitidis*
- *S. aureus*
- *E. coli*

I microrganismi implicati nelle infezioni nosocomiali pediatriche sono simili a quelli isolati negli adulti; le batteriemie polimicrobiche e quelle da anaerobi sono comunque meno frequenti⁵⁶.

Le batteriemie occulte si possono manifestare nei bambini con sintomatologia moderata o assente, di solito associate a infezione del sistema circolatorio⁵⁷. La febbre può essere il solo sintomo presente, ma non è specifica. I microrganismi responsabili sono in modo predominante *S. pneumoniae*, ma sono state segnalate infezioni occulte da *H. influenzae*, specie *Salmonella* e pure da *N. meningitidis*.

Batteriemia correlata a catetere

La conferma che il catetere rappresenti la sorgente di un'infezione in corso di batteriemia o fungemia correlata a catetere endovenoso (CEV) è sovente difficile. Spesso non esiste evidenza d'infezione nella sede d'inserzione del catetere, e i microrganismi interessati appartengono di solito alla flora cutanea normale e possono essere comuni contaminanti delle emocolture

La diagnosi di batteriemia correlata a catetere di solito si avvale di^{58,59}:

- Isolamento dello stesso microrganismo dal sangue e dall'inserzione purulenta del CEV o dalla sua punta.
- Sepsis clinica, non rispondente alla terapia antimicrobica, che si risolve con la rimozione del catetere.

Il tempo differenziale di positività e la cultura quantitativa differenziale (intesi come mezzo per diagnosticare la batteriemia catetere correlata) sono stati rimossi da questa SMI per i dubbi sull'affidabilità di questi metodi. Questi si basano sul presupposto che se un catetere è la fonte dell'infezione, il sangue prelevato attraverso di esso avrà una carica batterica elevata, e quindi un tempo più breve di positività rispetto al sangue periferico⁶⁰⁻⁶². I risultati degli studi sono stati contrastanti, con alcuni di questi che riportano differenze statisticamente significative di carica microbica, e altri che segnalano differenze non significative⁶³⁻⁶⁵. Con il progressivo miglioramento della tecnologia utilizzata nei sistemi di coltura a monitoraggio continuo del sangue, è probabile che la sensibilità di rilevazione migliorerà, rendendo l'uso del tempo differenziale quantitativo di positività discutibile⁵⁹. Oltre a ciò, il tempo differenziale di positività non può essere applicato nei casi di infezione polimicrobica⁶⁰.

Donna gravida

La *Listeria monocytogenes* può causare nella gravida un'infezione grave. La setticemia da *L. monocytogenes* si presenta come malattia acuta febbrile che può coinvolgere il feto^{66,67}. Questa può indurre un'infezione sistemica (granulomatosis infantisepticum), nascita di feto morto o meningite neonatale. I prodotti del concepimento, la placenta e i tamponi dello screening neonatale devono essere processati per la ricerca di questo microrganismo. La coltura di routine dei tamponi vaginali per *L. monocytogenes* non è di solito eseguita sebbene possa essere utile nei casi sospetti⁶⁶.

L'aborto settico può determinare una morbidità materna grave, talvolta infausta. Le cause d'infezione sono imputabili a perforazione dell'utero, presenza di residui necrotici e prodotti di ritenzione placentare; la maggior parte delle infezioni sono polimicrobiche e coinvolgono gli anaerobi. La sepsi da Clostridi che complica l'aborto è potenzialmente letale. In alcune donne le specie *Clostridium* appartengono alla flora vaginale residente.

Endocardite infettiva (EI)⁶⁸

L'endocardite infettiva rappresenta l'infezione delle valvole cardiache e/o di altre aree dell'endocardio. Si manifesta di solito in sedi predisposte alle lesioni cardiache o nei difetti congeniti ove si generano flussi ematici turbolenti che favoriscono il danneggiamento dell'endocardio e l'adesione delle piastrine⁶⁹⁻⁷¹. Sulla superficie endocardica danneggiata si deposita un coagulo di fibrina che è poi colonizzato da microrganismi penetrati nel torrente circolatorio, formando in tal modo delle vegetazioni infette. Nella parte profonda della vegetazione possono essere presenti microrganismi vitali e così pure sulla loro superficie; questa condizione rende difficile il trattamento con antimicrobici⁷².

Storicamente l'endocardite è stata classificata in "acuta" o "sub-acuta", con riferimento all'andamento della malattia non trattata. Attualmente ci si riferisce ai criteri diagnostici di Duke, proposti nel 1994⁶⁹. Questi sono più indicati a descrivere la malattia facendo riferimento al microrganismo infettante o alla sede anatomica coinvolta.

Endocardite primitiva delle valvole

La malattia cardiaca reumatica cronica (MCR) è stata il principale fattore predisponente nella EI ma ora è stata sostituita da altre forme morbose quali malattie cardiache congenite, prolasso della valvola mitrale, e malattie valvolari degenerative dell'anziano. L'endocardite infettiva si può manifestare su valvole anatomicamente e funzionalmente normali come sequela di alcune batteriemie. I microrganismi più frequentemente isolati includono⁷²:

- Streptococchi orali
- Stafilococchi (circa l'80% di questi sono *S. aureus*)

- Enterococchi
- *Streptococcus bovis* (*S. bovis* biotype 1 può anche essere indicato come *S. gallolyticus subsp. gallolyticus*)⁷³

Le infezioni fungine sono rare, tranne che nei tossicodipendenti per via endovena e nei pazienti affetti da soggiacenti malattie gravi, e richiedono immediato trattamento chirurgico^{74,75}. Sono stati segnalati numerosi altri microrganismi, inclusi quelli esigenti che raramente determinano malattia nell'uomo diversa dall'endocardite (gruppo HACEK: *Haemophilus aphrophilus*, specie *Aggregatibacter*, specie *Cardiobacterium*, *Eikenella corrodens* e *Kingella kingae*); (Consultare [ID 12 – Identification of Haemophilus species and the HACEK Group of Organisms](#))^{69,76}. E' stata studiata l'utilità di una prolungata incubazione dell'emocoltura per questi organismi; diverse ricerche hanno dimostrato che non è necessaria quando si utilizzano sistemi di monitoraggio continuo⁷⁶⁻⁷⁸. Le specie *Bartonella* sono in progressivo aumento come agenti eziologici di endocardite e assumono particolare importanza nei pazienti con infezione da HIV⁷¹

Endocardite della protesi valvolare (EPV)

Oltre ad una terapia antimicrobica, le valvole infette richiedono la rimozione chirurgica e la loro sostituzione per eliminare l'infezione o per problemi d'insufficienza. L'infezione della protesi valvolare si può manifestare in qualsiasi momento dopo la chirurgia valvolare ma, con il trascorrere del tempo, diviene sempre meno frequente e coinvolge differenti gruppi di microrganismi. Nel primo anno il rischio di EPV è dell'1,5%, e dopo un anno diminuisce a circa l'1%⁷². La protesi valvolare aortica è la più esposta all'infezione.

L'EPV "precocce" si manifesta di solito entro 60 giorni dall'impianto, ma la malattia caratteristica può non rendersi evidente se non dopo 4-6 mesi dalla sostituzione valvolare. Quest'infezione rappresenta una contaminazione della protesi valvolare insorta nel periodo peri-operatorio. Questa si realizza di solito nella fase intra-operatoria. L'EPV "precocce" ha un'elevata percentuale di mortalità rispetto alla manifestazione "tardiva" e i microrganismi responsabili sono spesso più resistenti agli antibiotici, suggerendo la loro probabile origine ospedaliera e l'uso della profilassi e terapia antibiotica peri-operatoria.

I microrganismi di più comune riscontro sono⁷²:

- Stafilococchi coagulasi negativi
- *S. aureus*
- Bastoncini gram negativi
- Specie *Candida*
- Streptococchi ed enterococchi
- Specie *Corynebacterium*

L'EPV "tardiva" si può manifestare alcuni anni dopo l'impianto valvolare. Si ritiene che la sorgente dell'infezione sia una batteriemia o fungemia transitoria che coinvolge la valvola con lo stesso modo d'insediamento che si realizza sulla valvola naturale, sebbene possa essere anche una manifestazione tardiva di un'infezione nosocomiale. I microrganismi implicati sono molto simili a quelli coinvolti nell'endocardite della valvola naturale e includono:

- Streptococchi orali
- Stafilococchi.
- Bastoncini Gram negativi.

- Specie *Candida*.
- Enterococchi.
- Specie *Corynebacterium*

Infezione del Sistema Circolatorio in Pazienti Immunocompromessi

I pazienti immunocompromessi includono quelli con anomalie del sistema immunitario di tipo ereditario, acquisito o farmaco dipendente. Le deficienze correlate a fagocitosi, complemento, produzione di anticorpi e immunità cellulo-mediata sono spesso associate a particolari disfunzioni o malattie quali forme maligne, infezione da HIV, malattia a cellule falciformi e nei pazienti con trapianto d'organo, terapia con farmaci immunosoppressivi o steroidei⁷⁹. Il rischio d'infezione è massimo nei pazienti con neutropenia, nei quali i batteri Gram negativi determinano sepsi grave con elevata percentuale di mortalità⁸⁰.

Nei pazienti immunodepressi esiste un'elevata incidenza d'infezione causata da microrganismi che non sono virulenti nell'ospite normale e che appartengono alla flora residente. Questi sono solitamente considerati dei contaminanti nell'ospite immunocompetente⁸⁰. Stafilococchi coagulasi-negativi, enterococchi e streptococchi viridanti rappresentano tipici esempi.

I pazienti iposplenici o privi di milza sono esposti a setticemia fulminante causata da una grande varietà di microrganismi, in modo particolare da batteri capsulati quali *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *N. meningitidis*, ma anche microrganismi meno frequenti quali le specie *Capnocytophaga*^{52,81}.

Negli anni recenti lo spettro dei microrganismi isolati si è modificato. Ciò probabilmente riflette il prolungamento dei periodi di neutropenia e la durata della degenza ospedaliera, l'aumento del ricorso al cateterismo venoso centrale (CVC) e la somministrazione di antibiotici ad ampio spettro. In questo gruppo di pazienti le infezioni polimicrobiche sono più frequenti ed è anche aumentato il numero di infezioni da Gram positivi e da batteri opportunisti, in modo particolare quelle causate da funghi e da specie *Mycobacterium*⁵². Oltre ai microrganismi associati alle infezioni del sistema circolatorio dei soggetti immunocompetenti, gli isolati includono⁸¹:

- Bastoncini Gram negativi non fermentanti
- *Listeria monocytogenes*
- Specie *Corynebacterium*
- Specie *Candida*

Altri organismi d'insolito isolamento comprendono una grande varietà di batteri e funghi, molti dei quali hanno esigenze di crescita molto specifiche⁸¹⁻⁸³.

Emocolture Post Mortem

Le emocolture post mortem hanno dimostrato di essere associate a percentuali di positività molto più elevate rispetto a quelle prelevate in vita. Tuttavia, provvedendo alla conservazione delle salme in condizioni refrigerate controllate e eseguendo l'accertamento dopo 2 – 10 giorni dal decesso, è stato dimostrato che non si registra alcun aumento delle percentuali delle colture positive^{84,85}. I risultati delle emocolture post mortem e il loro significato clinico devono essere interpretati con cautela, ma possono comunque essere utili per l'accertamento della morte improvvisa nei neonati e nei bambini (SUDI Sudden Unexpected Death in Infants)⁸⁴⁻⁸⁷.

Microrganismi Inusuali che possono essere coinvolti in caso di Diffusione Deliberata o Accidentale d'Infezione (Bioterrorismo o Guerra Biologica)

In assenza di qualsiasi altro fattore di rischio (ad esempio, viaggi all'estero, lavoro in laboratorio clinico e veterinario che implicano un pericolo di infezione), casi singoli o multipli sostenuti dai microrganismi di seguito elencati, potrebbero suggerire la possibilità di un loro rilascio volontario o accidentale. Questi eventi richiedono una risposta immediata; il sospetto di una diffusione volontaria o accidentale di microrganismi deve essere comunicata con urgenza alla Public Health England 24hr Duty Doctor at Microbiology Services Colindale. L'elenco dei microrganismi di seguito segnalato non è completo; i microrganismi sono oggetto di informativa alla PHE secondo (Notifica) della Regulation della HPA 2010; un elenco completo degli agenti causali soggetti a denuncia alla PHE è disponibile presso il: <https://www.gov.uk/notifiable-diseases-and-causative-organisms-how-to-report>.

Esistono altri accordi in [Scotland](#)^{88,89}, [Wales](#)⁹⁰ e [Northern Ireland](#)⁹¹.

Se si sospettano i seguenti organismi, l'indagine dovrebbe essere eseguita a livello di contenimento 3, se non altrimenti specificato. Gli isolati sospetti devono essere inviati all'appropriato laboratorio di riferimento per la caratterizzazione.

- *Bacillus anthracis* (Antrace).
- Specie *Brucella* (Brucella).
- *Francisella tularensis* (Tularemia).
- *Burkholderia mallei* (Morva).
- *Burkholderia pseudomallei* (Meliodosi).
- *Clostridium botulinum* (Botulismo).

Fare riferimento a [ID 8 - Identification of Clostridium species](#).

- *Coxiella burnetii* (Febbre Q).
- *Yersinia pestis* (Peste).

Nota: Le specie *Brucella*, *B. mallei*, *B. pseudomallei* e *Y. pestis* sono elencate nelle banche dati di alcune confezioni commerciali disponibili, dotate di sistemi d'identificazione; i risultati devono comunque essere interpretati con cautela.

Nota: *B. anthracis*, specie *Brucella*, *C. botulinum* e *Y. pestis* sono tutti agenti causali di malattia da segnalare al Local Authority Proper Officer under the Health Protection (Notification) Regulations 2010. L'elenco completo delle malattie da denunciare alla Local Authority Proper Office under the Health Protection (Notification) Regulations 2010 è disponibile presso:

<https://www.gov.uk/notifiable-diseases-and-causative-organisms-how-to-report>

Nota: La brucellosi è oggetto di informativa ai sensi del decreto sulle zoonosi 1989.

Aumento della Resistenza agli Antibiotici⁹²⁻⁹⁴

La resistenza agli antibiotici è aumentata soprattutto tra i batteri Gram negativi negli ultimi 15 anni⁸⁷. Prima di questo periodo, i batteri Gram negativi erano, in genere, sensibili ad aminoglicosidi, cefalosporine di terza generazione e ai chinoloni fluorurati. Tuttavia, i meccanismi di resistenza si sono evoluti simultaneamente non solo per una, ma per diverse classi⁸⁷. Sono

fonte di preoccupazione le Enterobatteriaceae, le *Enterobatteriaceae* produttrici di β -lattamasi ad ampio spettro (ESBL), le Enterobatteriaceae, produttrici di le i ai carbapenemi e le *Pseudomonas aeruginosa* multiresistenti^{92,95}. L'incidenza di multiresistenza ai farmaci in organismi Gram positivi quali *S. aureus*, stafilococchi coagulasi negativi ed enterococchi è aumentata negli ultimi anni⁹². Il risultato conseguente ha determinato un numero crescente di pazienti per i quali la terapia antibiotica empirica iniziale 24 non è inefficace²⁴.

La prevalenza negli anni recenti dei batteri multi resistenti Gram-negativi, *S. aureus* resistenti alla meticillina (MRSA), enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) e di altri organismi resistenti evidenzia la necessità di emoculture accurate e tempestive per garantire che sia somministrato un adeguato trattamento antibiotico e per ridurre l'utilizzo complessivo di antibiotici ad ampio spettro^{25,26,92,96}.

Sistemi di Emocultura

Il sistema ideale di emocultura deve produrre il massimo riscontro del patogeno nel più breve tempo possibile, al fine di avere la migliore possibilità d'influenzare la gestione del paziente, consentendo in tal modo il raggiungimento di risultati ottimali.

L'introduzione dei sistemi commerciali completamente automatizzati con monitoraggio continuo dell'emocultura ha consentito la diagnosi precoce e una migliore identificazione degli agenti patogeni. Ciò è particolarmente vero per i microrganismi ritenuti maggiormente patogeni, quali *S. aureus*, bacilli Gram negativi e streptococchi¹². Tuttavia, l'emocultura ha i suoi limiti.

Pre-analitica⁶

La fase pre analitica, dal prelievo all'inserimento nel sistema analitico, dipende da molti fattori:

- Sede del laboratorio in relazione al reparto (in sede/fuori sede).
 - o Modalità di trasporto esterne (frequenza, ore fuori servizio, ecc.)
 - o Accordi di trasferimenti interni (frequenza, disponibilità di trasporto con posta pneumatica, ore fuori servizio, ecc).
- Livello di operatività del Laboratorio oltre le ore di prestazione dei servizi (carico di frequenza fuori orario, ecc.)
- Attrezzature disponibili e sviluppi della tecnologia attuale (disponibilità di sistema di emocultura con monitoraggio continuo, termostato per pre incubazione ecc).

Con il monitoraggio continuo dei sistemi per emocultura, i flaconi dovrebbero essere teoricamente inseriti nello strumento 24 ore il giorno, il più presto possibile dopo la raccolta ed entro un massimo di 4 ore.

Tradizionalmente, dove non è possibile il posizionamento diretto nello strumento, le emoculture sono state pre-incubate in un termostato separato. Una conseguenza involontaria di questa procedura è che una percentuale di colture positive non può essere rilevata una volta inserito il flacone nello strumento dopo la pre-incubazione (consultare Informazioni Tecniche/Limitazioni). Di conseguenza, molti laboratori non eseguono la pre-incubazione delle emoculture lasciandole a temperatura ambiente per una notte; ciò comporta un aumento del tempo di rilevamento (tempo dall'inserimento al segnale di positività) una volta posizionato il flacone nello strumento (consultare Informazioni Tecniche/Limitazioni/Appendice 1). Si richiede il raggiungimento di un equilibrio tra emocultura con risultato falso negativo e ritardo della disponibilità del risultato della colorazione Gram.

Una diminuzione del tempo di positività (tempo che intercorre tra il prelievo e segnale positivo) può essere realizzato in vari modi in funzione delle strutture e delle risorse locali⁶.

- prendere in considerazione le modalità di trasporto interno ed esterno per diminuire il tempo fra prelievo e inserimento
- prendere in considerazione la tipologia dei turni di lavoro o la copertura di laboratorio fuori orario (per diminuire il tempo fra prelievo e inserimento)
- prendere in considerazione l'uso di personale non in carico alla Microbiologia (es. Centro Trasfusionale) per l'inserimento fuori orario nella strumentazione per emoculture.
- prendere in considerazione l'uso delle attrezzature. Per esempio, controllo del tempo di funzionamento dei pre-incubatori utilizzando un timer programmabile per sette giorni. Le (emoculture ricevute al di fuori del normale orario di lavoro sarebbero inserite nell'incubatore durante la notte, ma questo sarebbe alimentato solo per un numero limitato di ore, per esempio da mezzanotte alle 9:00). Ciò riduce il tempo di positività)
- Prendere in considerazione i nuovi sviluppi/progressione nella tecnologia attuale. per la diminuzione del tempo di positivizzazione dal prelievo al caricamento)

Analitica

Il tempo di rilevamento (TTD, time to detection) dopo che i campioni sono stati inseriti dipende dal tempo necessario alla moltiplicazione per ottenere una concentrazione significativa; i microrganismi esigenti e non coltivabili possono non essere in grado di crescere e la sensibilità del sistema può essere diminuita quando i campioni sono prelevati direttamente dopo trattamento antibiotico².

I sistemi di emocultura devono quindi avere lo scopo di raggiungere i seguenti obiettivi:

- terreno di coltura il più ricco possibile per consentire il recupero di un numero esiguo di una grande varietà di microrganismi esigenti.
- .neutralizzazione o rimozione di sostanze antimicrobiche, sia componenti naturali del sangue sia di agenti antimicrobici.
- riduzione al minimo della contaminazione.
- rilevamento il più precoce possibile di batteri e funghi.

I sistemi di emocultura si avvalgono di numerosi principi di rilevazione e condizioni culturali per il riscontro dei microrganismi. Molti sistemi e i loro relativi terreni sono stati fra loro confrontati, ognuno di loro presenta limiti e vantaggi^{12,78, 97-101}. I sistemi con monitoraggio continuo completamente automatizzato sono semplici da usare rispetto ai sistemi manuali e a quelli semi-automatici.

La maggior parte dei sistemi utilizza flaconi aerobi e anaerobi per gli adulti, ma fornisce una sola bottiglia aerobica per uso pediatrico; per questi i volumi dei campioni di sangue sono spesso ridotti¹⁰².

Fattori che Condizionano l'Isolamento dei Microrganismi Causali

Un certo numero di fattori clinici e tecnici possono influenzare l'isolamento del microrganismo infettante, indipendentemente dal sistema utilizzato^{12,52}

Clinici:

Metodo di prelievo

Il prelievo del sangue dal paziente deve essere eseguito seguendo la Department of Health guidance¹⁰³.

Le ricerche hanno dimostrato che anche scartando la prima aliquota di 10mL di sangue prelevato da cateteri vascolari, non si ottiene alcun effetto sulla percentuale di contaminazione di questi campioni, anche rispettando severe precauzioni di sterilità; i campioni prelevati da cateteri venosi centrali hanno percentuali più elevate di contaminazione rispetto a quelli ottenuti dai cateteri periferici o arteriosi^{104,105}. Il sangue arterioso non offre alcun vantaggio rispetto a quello venoso per individuare la maggior parte dei microrganismi, anche se è stato segnalato essere migliore nella rilevazione dell'infezione fungina disseminata¹⁰⁶. Il cambio degli aghi tra prelievo venoso e inoculazione delle bottiglie non è raccomandato perché può comportare il rischio di punture con l'ago. Secondo alcuni autori, il cambio dell'ago non riduce le percentuali di contaminazione, ma secondo risultati ottenuti con la metanalisi, la riduce lievemente^{30,59,107-109}.

Numero e Tempi di Prelievo dei Campioni

Per la maggior parte dei pazienti, sono raccomandati due set di emocolture. Un secondo o terzo set preso da una sede diversa non solo aumenta la resa, ma permette anche il riconoscimento della contaminazione¹¹⁰. Nella maggior parte delle condizioni diverse dall'endocardite, la batteriemia è intermittente, essendo correlata alla febbre e a brividi che si manifestano 30-60 minuti dopo l'ingresso di microrganismi nel flusso ematico. I campioni devono essere prelevati il più presto possibile dopo il picco di febbre. Tuttavia, alcune ricerche hanno dimostrato poca differenza nelle percentuali d'isolamento fra sangue prelevato a intervalli o al momento della comparsa dei picchi febbrili¹¹¹. Certamente, il momento del prelievo è meno importante per la batteriemia continua, come riscontrato nell'endocardite infettiva.

Terapia Antimicrobica Precedente²

In condizioni ottimali, i campioni di sangue devono essere prelevati prima del trattamento antimicrobico. Quando è già in corso il trattamento, l'emocoltura deve essere prelevata poco prima della dose successiva, quando la concentrazione degli antibiotici nel sangue è più ridotta. Qualsiasi terapia antimicrobica recente può avere un effetto significativo sulle emocolture, diminuendo la sensibilità dell'accertamento. Ciò può essere particolarmente importante nei pazienti che hanno ricevuto la profilassi antibiotica e che sono ad alto rischio di infezioni del sistema circolatorio. Se i pazienti hanno ricevuto un precedente trattamento antimicrobico la batteriemia deve essere considerata, anche quando i risultati delle emocolture sono negativi.

Volume di sangue

Il Volume di sangue per l'emocoltura rappresenta il fattore più importante per il rilievo dei microrganismi in un'infezione circolatoria. Esiste un rapporto diretto tra il volume del sangue e il risultato, con circa un incremento del 3% per ml di sangue posto in coltura. Se per l'esame colturale sono inviati volumi di sangue insufficienti, possono verificarsi falsi negativi¹¹².

Il numero di microrganismi presenti nella batteriemia dell'adulto è spesso ridotto, spesso $<1 \times 10^3$ unità formanti colonia per litro (ufc/L)¹¹³. Per i pazienti adulti si raccomanda la coltura di 20-30 mL di sangue per set^{54,114}. I sistemi commerciali più moderni consentono la semina di 10mL di sangue per ogni flacone. Le indicazioni ottimali dei produttori per il volume di sangue sono diverse; leggere queste informazioni prima dell'uso.

I dati riguardanti il volume ottimale del sangue totale per set per i neonati e per i bambini sono limitati. I criteri per il calcolo dei volumi totali per l'emocoltura sono spesso riferiti al peso, piuttosto che all'età e tengono conto del volume totale del sangue del paziente¹¹². Nei neonati e nei bambini l'entità della batteriemia è di solito superiore a quella degli adulti; quindi, la sensibilità di rilevamento non è ridotta in modo significativo dal basso rapporto sangue-terreno. È stato suggerito che il volume di sangue prelevato dovrebbe essere non più di 1% del volume totale di sangue del paziente^{115,116}.

Nei neonati e nei bambini con microrganismi clinicamente significativi si possono verificare basse concentrazioni di batteriemia ($<4 \times 10^3$ cfu/L); uno studio suggerisce che per una ricerca affidabile di batteriemia a bassa concentrazione, il volume totale del sangue del paziente da seminare nella coltura dovrebbe essere del 4-4,5%, e non dell'1%¹¹⁷

Tecnici:

Terreni utilizzati

La maggior parte dei sistemi utilizza diversi terreni per l'isolamento di microrganismi aerobi e anaerobi, e alcuni di questi sono specificamente progettati per la rilevazione di microrganismi quali funghi e specie *Mycobacterium*. In commercio è disponibile una grande varietà di terreni e di sistemi per emocultura che sono stati valutati^{97,118-121}. I terreni si differenziano per tipo e percentuale dei vari integratori e anticoagulanti, volume di brodo, atmosfera nello spazio superiore del flacone e presenza di agenti antimicrobici neutralizzanti. I flaconi aerobi ora richiedono raramente la ventilazione durante il monitoraggio continuo nei sistemi completamente automatizzati^{122,123}. I flaconi aerobi che utilizzano altri sistemi e possono richiedere una ventilazione transitoria per aumentare il contenuto di ossigeno nello spazio superiore per microrganismi aerobi stretti quali *P. aeruginosa* e *Candida albicans*^{12,124-126}.

E' richiesto un rapporto sangue brodo di circa 1:15 per eliminare gli effetti antibatterici del sangue umano normale, questo può essere ridotto a 1:5 - e 1:10 aggiungendo 0,05% di sodio polianetol sulfonato (SPS)^{12,54,110}. Il mancato mantenimento di questo rapporto può comportare cultura falsa negativa. Il SPS ha un effetto inibitorio sulle specie *Neisseria*, cocchi anaerobi, *Streptobacillus moniliformis* e *Mycoplasma hominis*¹²⁷. Gli effetti inibitori del SPS possono essere ridotti con l'aggiunta al brodo di gelatina^{128,129}. In alcuni flaconi in commercio il terreno è arricchito con sostanze che migliorano il recupero microbico assorbendo le sostanze antimicrobiche e che lisano i globuli bianchi per liberare i microrganismi nella miscela sangue brodo¹².

Neutralizzazione degli agenti antimicrobici

Al momento del campionamento dell'emocultura il 28-63% dei pazienti è in attesa di ricevere un trattamento antimicrobico che può svolgere un effetto negativo sull'isolamento del microrganismo¹²⁰. Per contrastare l'effetto degli antimicrobici sono stati sviluppati terreni contenenti resine inattivanti e altri materiali assorbenti, tra i quali il carbone^{120,121}. Per la neutralizzazione dell'antimicrobico alcuni terreni si avvalgono tuttavia del rapporto ottimale della diluizione sangue-brodo¹²¹. Sono state utilizzate tecniche di lisi-centrifugazione, ma le informazioni sono contrastanti per quanto riguarda la loro efficacia e l'importanza clinica delle migliori percentuali d'isolamento loro attribuite¹³⁰⁻¹³³.

Tempo e Temperatura d'Incubazione

Per le emocolture di routine si consiglia una temperatura di 35-37°C¹². Se si usano sistemi automatizzati cinque giorni di incubazione sono solitamente sufficienti per il riscontro della maggior parte dei microrganismi^{13,14}. Se si sospettano malattie quali la brucellosi, sono di solito sufficienti 2-5 giorni di incubazione. Tuttavia questo periodo può essere prolungato a 10 giorni in funzione del terreno usato, e può essere richiesta una sottocoltura terminale¹⁵⁻¹⁷. E' consigliabile che, nel caso si sospettino questi batteri, tutte le culture e i campioni annessi siano inviati al laboratorio di riferimento.

Il periodo d'incubazione può essere prolungato in alcuni casi di sospetta endocardite, per pazienti in terapia antimicrobica, o quando si sospetta un'infezione da funghi o microrganismi insoliti, esigenti o a lenta crescita¹³⁴. Tuttavia, l'aumento della resa è modesto per alcuni microrganismi

(HACEK) e piuttosto che tempi d'incubazione prolungati, metodi specifici possono avere maggiori probabilità di migliorare il riscontro di questi microrganismi^{12,23,76,77,135}.

Agitazione dei Terreni

Gli effetti dell'agitazione comportano di solito un aumento della resa e un recupero più precoce nei flaconi aerobi. L'agitazione dei flaconi anaerobi non aumenta la resa, mentre l'agitazione delle emocolture dei micobatteri diminuisce il loro riscontro^{136,137}. I sistemi di monitoraggio continuo dispongono di diversi tipi e velocità di agitazione. I sistemi semi-automatici prevedono un periodo iniziale di agitazione per i flaconi aerobi. Nei sistemi manuali convenzionali dovrebbe essere considerata l'agitazione del flacone aerobico.

Atmosfera dello spazio superiore del flacone

L'atmosfera dello spazio superiore del flacone dipende dal sistema utilizzato, ma può influenzare la percentuale di crescita di alcuni microrganismi. Lo spazio superiore dei flaconi aerobi contiene di solito aria con diverse concentrazioni di CO₂ e può richiedere la ventilazione per incrementare il contenuto di O₂. In funzione della tipologia del sistema, lo spazio superiore delle bottiglie anaerobiche contiene di solito combinazioni di CO₂ e azoto.

Suttocultura

Se si utilizzano sistemi manuali o semi-automatici, la sottocultura di entrambe i flaconi di un set in cui solo uno ha rilevato segnale positivo pone in evidenza la positività in entrambi in circa il 50% dei casi. E' probabile che non sia necessario eseguire sottocolture dei sistemi di monitoraggio continuo. Nelle sottocolture dei flaconi anaerobi dotati di un'unità di subventilazione, l'uso di ansa o pipetta consentirà l'ingresso di aria nello spazio superiore se la procedura non eseguita in una cabina anaerobica; ciò potrebbe influenzare negativamente la successiva crescita dei microrganismi anaerobi. I sistemi difasici hanno il vantaggio di una semplice sottocultura chiusa, realizzata inclinando la bottiglia, ma il riconoscimento delle colonie può essere compromesso dallo spessore del vetro¹².

Sottocultura cieca o terminale

Quando si usano sistemi automatizzati per emocolture la sottocultura cieca o terminale non è raccomandata di routine (devono essere seguite le istruzioni del produttore), ma può essere indicata per i sistemi manuali^{14,122,138}. Alcuni microrganismi, come le specie *Neisseria*, specie *Brucella*, specie *Francisella*, *H. influenzae* e specie *Legionella* possono fornire segnali deboli o questi batteri possono essere presenti nei terreni di coltura contenente sangue senza mostrare segni visibili di crescita. Sono stati segnalati effetti simili per *P. aeruginosa* e specie *Candida*. Può essere presa in considerazione la sottocultura cieca (a livello di contenimento adeguato) di flaconi provenienti da pazienti in cui l'esordio clinico o l'anamnesi fa sospettare la presenza di questi microrganismi.

Identificazione Rapida e Prova di Sensibilità Diretta^{94,139-142}

Seguendo la procedura convenzionale, l'identificazione e la sensibilità dei microrganismi resistenti potrebbero non essere disponibili nelle 24-48 ore successive al segnale di positività; possono quindi essere notevolmente ritardate importanti informazioni, causando successivi ritardi nel trattamento antimicrobico diretto verso il patogeno specifico⁷. Utilizzando i test rapidi è possibile ottenere risultati di identificazione e sensibilità entro 24 ore dal segnale positivo.

Per ridurre i tempi di consegna dei risultati, i test rapidi d'identificazione e di sensibilità devono essere eseguiti in associazione ai metodi di routine, quando appropriato¹⁴³. Sono stati valutati numerosi metodi rapidi d'identificazione e sensibilità; questi comprendono coagulasi in provetta, lattice per antigeni, tecniche molecolari e recentemente è stato sviluppato il Matrix Assisted

Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight MALDI-TOF^{22,23,37,140,144,145}. Per evitare di refertare risultati fuorvianti è importante garantire che siano saggiate colture recenti di singoli isolati puri.

I laboratori devono seguire le istruzioni del produttore, e prima del loro uso tutti i test rapidi devono essere validati e avere dimostrato di essere idonei allo scopo.

Identificazione rapida

Test di agglutinazione per antigene

I saggi di agglutinazione per l'antigene sono utilizzati per identificare un microrganismo non noto usando antisieri conosciuti. Per esempio, sono usati nella sierotipizzazione delle specie *Salmonella* e per l'identificazione di gruppo degli streptococchi^{146,147}. Fare riferimento a [TP 3 - Agglutination Test for *Salmonella* species](#). L'identificazione diretta dalla cultura del gruppo degli Streptococchi di Lancefield è utile e clinicamente importante e può condizionare il trattamento antimicrobico. La ricerca dell'antigene è pure utile nelle emocolture per confermare la presenza di *S. pneumoniae* che ha subito autolisi. Fare riferimento a [ID 4 - Identification of *Streptococcus* species, *Enterococcus* species and Morphologically Similar Organisms](#).

Test della Coagulasi

I componenti del genere staphylococcus si differenziano per la capacità di coagulare il plasma mediante l'azione dell'enzima coagulasi. Sono ben documentati i test rapidi che differenziano gli stafilococchi coagulasi positivi (compresi *S. aureus*) e gli stafilococchi coagulasi negativi^{145,148-150}. Il test della coagulasi, di agglutinazione, le tecniche convenzionali di PCR e quelle molecolari con sonde marcate fluoriscenti hanno dimostrato d'identificare lo stafilococco coagulasi positivo direttamente nell'emocoltura. Sono state riscontrate sensibilità e specificità variabili, che possono essere dipendenti dal terreno¹². Fare riferimento a [TP 10 – Coagulase Test](#).

Metodi di identificazione automatizzati

Sono disponibili diversi sistemi automatizzati in grado di eseguire l'identificazione (e test di sensibilità) su isolati positivi usando tecniche di microtitolazione in brodo diluizione^{8,9,151}. Studi comparativi hanno dimostrato che i risultati ottenuti con questi metodi sono affidabili (soprattutto per i microrganismi Gram-negativi) e possono fornire risultati in metà del tempo richiesto dai metodi convenzionali¹⁵².

Metodi molecolari^{21,23,80,94,153}

Esiste un crescente interesse per l'utilizzo del saggio Polymerase Chain Reaction (PCR) e per altre tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT) per l'identificazione di batteri presenti nei campioni di emocoltura positivi^{10,154}. La PCR riconosce i geni bersaglio conservati nel genoma batterico e permette la rapida identificazione dei microrganismi, compresi quelli a lenta crescita o non coltivabili. I risultati sono disponibili entro breve tempo, in modo particolare se si usa la PCR multiplex real time¹⁵⁵. Sono disponibili alcuni saggi, compresi quelli per patogeni specifici (progettati per rilevare un bersaglio in un campione di sangue positivo), saggi con ampia possibilità (utilizzano primer che riconoscono sequenze conservate codificate nel DNA ribosomiale del patogeno) e test multiplex (progettati per rilevare gli agenti patogeni più frequenti con un'unica reazione)¹¹.

MALDI-TOF Spettroscopia di Massa²¹

Recenti sviluppi nella identificazione di batteri, lieviti e funghi includono l'uso di profili proteici ribosomiali 16s e 18s ottenuti con spettroscopia di massa con Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation -Time of Flight (MALDI-TOF)¹⁵⁵. I picchi di massa ottenuti dai ceppi in accertamento sono confrontati con quelli di riferimento noti. È possibile che il microrganismo sia identificato da

una colonia isolata in breve tempo e che lo strumento sia sempre più utilizzato nei laboratori perché fornisce un sistema di identificazione sicuro. L'uso del MALDI-TOF-MS per l'identificazione dei microrganismi direttamente dall'emocoltura positiva è stato valutato^{142,155-159}. Gli studi hanno dimostrato che l'identificazione diretta dei batteri Gram-positivi (in particolare stafilococchi) è meno affidabile rispetto ai batteri Gram negativi e che la composizione del terreno (ad esempio inclusione di carbone) può influenzare l'identificazione¹⁵⁵⁻¹⁵⁹. Altri studi hanno dimostrato che l'identificazione rapida mediante MALDI-TOF porta ad una diminuzione del tempo di identificazione, e determina altresì un aumento della percentuale di pazienti adeguatamente trattati con terapia antimicrobica¹⁴².

Sensibilità diretta

Per migliorare la qualità dei test di sensibilità si è sviluppato un interesse generale al di fuori dell'accertamento diretto su campioni clinici. La British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) ha comunque riconosciuto che la procedura è eseguita in molti laboratori come un mezzo per fornire risultati rapidi¹⁶⁰. Per ridurre i tempi di risposta, si raccomanda che i saggi di sensibilità diretti siano eseguiti su flaconi di emocolture positive quando appropriato, specificando che talvolta possono essere identificati microrganismi diversi dai flaconi della stessa coppia. I risultati devono essere interpretati con cautela, specialmente se l'inoculo è scarso o eccessivo rispetto a quello che consente la crescita semi-confluente raccomandata.

Metodo di Disco Diffusione dell'Antibiotico

La disco diffusione diretta non è un metodo nuovo, ma è rapido, facile da eseguire ed economico¹⁶¹. Sono emerse elevate percentuali di discrepanza dal confronto fra disco diffusione e metodi automatizzati⁹.

Saggi per Concentrazione Minima Inibente (MIC)

Per determinare la minima concentrazione di un agente antimicrobico in grado di inibire la crescita in condizioni di prova si possono usare i metodi di brodo e agar diluizione. Il valore MIC può essere usato per determinare la sensibilità agli antibiotici di un ceppo specifico verso un particolare farmaco. Sono state recentemente sviluppate strisce che possono valutare la MIC con antibiotico distribuito a gradiente utilizzate per acquisire risultati rapidi¹⁶².

I risultati dei test rapidi ottenuti da tali metodi possono influenzare la gestione del paziente, migliorare il flusso di lavoro del laboratorio e ridurre i costi. È importante che i risultati di identificazione e i saggi di sensibilità delle emocolture che utilizzano prodotti commerciali o di altro genere, siano valutati con cautela se non sono stati validati. Quando la coltura è mista o l'inoculo del test di sensibilità non è corretto è richiesta la ripetizione della prova¹⁶⁰.

Contaminazione

La contaminazione delle emocolture complica l'interpretazione e può comportare terapia antimicrobica inutile e aumento dei costi. In generale, le percentuali di contaminazione sono inferiori al 3%^{103,163,164}. Per distinguere tra contaminazione e vera batteriemia e determinare il significato clinico di un risultato positivo si utilizzano criteri diversi. Questi includono: tipo di microrganismo identificato, numero di set positivi, numero di flaconi positivi compresi in un set, qualità della crescita, dati clinici e di laboratorio (inclusa la sede di prelievo della coltura)^{59,165}. La prevenzione della contaminazione può essere ottenuta con un'adeguata preparazione della cute e del flacone, prelevando le colture da vena periferica e non da cateteri vascolari, e con la formazione del personale e misure d'intervento^{163,165,166}.

Informazione Tecnica/Limitazioni

Limitazioni delle SMI del RU

Le raccomandazioni formulate nelle SMI del RU sono basate su prove (ad esempio sensibilità e specificità), se disponibili, opinioni degli esperti e pragmatismo, tenendo in considerazione anche le risorse disponibili. I laboratori dovranno tenere in considerazione le esigenze locali e intraprendere ricerche aggiuntive, se appropriato. Prima del loro uso, i laboratori devono assicurare che tutti i saggi commerciali e in-house sono stati validati e siano idonei allo scopo.

Contenitori per Campioni^{167,168}

Le SMI usano il termine " contenitore a chiusura ermetica con marchiatura CE " per descrivere quelli contrassegnati con la marchiatura CE per la raccolta e il trasporto dei campioni clinici. I requisiti per i contenitori dei campioni sono riportati nella Direttiva UE per i Dispositivi Sanitari Diagnostici in vitro (98/79/CE allegato 1 B 2.1) in cui si stabilisce: " La progettazione deve consentire un'agevole manipolazione e, se necessario, ridurre per quanto possibile la contaminazione dei, e perdite dal dispositivo durante l'uso e, nel caso di recipienti per campioni, il rischio di contaminazione degli stessi. Le procedure di fabbricazione devono essere adatte a questi scopi".

Pre-Incubazione delle Emocolture

Il riconoscimento che alcuni Gram-negativi non fermentanti, come *Pseudomonas aeruginosa*, specie *Streptococcus* e lieviti può non essere rilevato dai sistemi di emocultura a monitoraggio continuo se i flaconi sono pre-incubati a 35-37° C; ciò ha prodotto effetti consistenti nella pratica analitica di laboratorio, determinando in molti di loro ritardi nella conservazione e trasporto dei campioni mantenuti a temperatura ambiente^{2,169,170}.

Questi microrganismi possono non superare l'algoritmo di soglia dello strumento a monitoraggio continuo dell'emocultura. Il riscontro della loro presenza nelle emocolture positive dipende da modificazioni biochimiche prodotte durante la fase di crescita. Quando la pre-incubazione è sufficientemente prolungata, il microrganismo può aver superato la fase di crescita e trovarsi in fase stazionaria o declinante; i flaconi contenenti questi organismi non saranno rilevati come positivi dallo strumento.

Se i flaconi sono pre-incubati, si stima che possa essere perso il 2-5% dei campioni positivi. Tuttavia, se conservati a temperatura ambiente prima dell'inserimento nello strumento, il tempo fra prelievo a risultato con segnale di crescita (tempo di positività o TTP time to positivity) per molti microrganismi può essere raddoppiato o triplicato^{2,4,5,35}.

Tutte le culture consegnate in ritardo devono essere controllate per segnali di crescita tra cui ingiallimento del sensore, emolisi, produzione di gas o presenza di torbidità. Se la crescita microbica è confermata dalla colorazione Gram, il flacone deve essere trattato come positivo con esecuzione della sottocoltura nel modo appropriato.

I laboratori dovrebbero ricercare recensioni di letteratura e manuali di laboratorio clinico su valutazioni analoghe ai metodi utilizzati e validarli in sede, oppure seguire le istruzioni del produttore.

Risultati discordanti

Aspetto in apparenza positivo/segnale positivo con striscio colorato Gram positivo, ma sottocoltura negativa

Ciò può avvenire con specie *Abiotrophia* (variante nutrizionale degli streptococchi), *S. pneumoniae* che hanno subito un certo grado di autolisi, e microrganismi esigenti, che non sono in grado di crescere sui terreni solidi di coltura utilizzati di routine^{71,171,172}. In funzione dei risultati microscopici e delle indicazioni cliniche devono essere considerati terreni addizionali o arricchiti, incubazione prolungata o in alternativa, atmosfera di crescita. I microrganismi possono includere:

- Specie *Campylobacter*.
- Specie *Helicobacter*.
- Microrganismi *Capnofili*.
- Anaerobi a lenta crescita.

Per ridurre l'autolisi di *S. pneumoniae* sono stati segnalati alcuni terreni¹⁷³. Se la microscopia o la valutazione clinica fanno sospettare *S. pneumoniae*, può essere utile inoculare parte della miscela sangue/brodo lisato in nuovi flaconi di emocultura nel tentativo di recuperare microrganismi vitali o considerare il test diretto per la ricerca dell'antigene sul brodo del flacone con metodo validato.

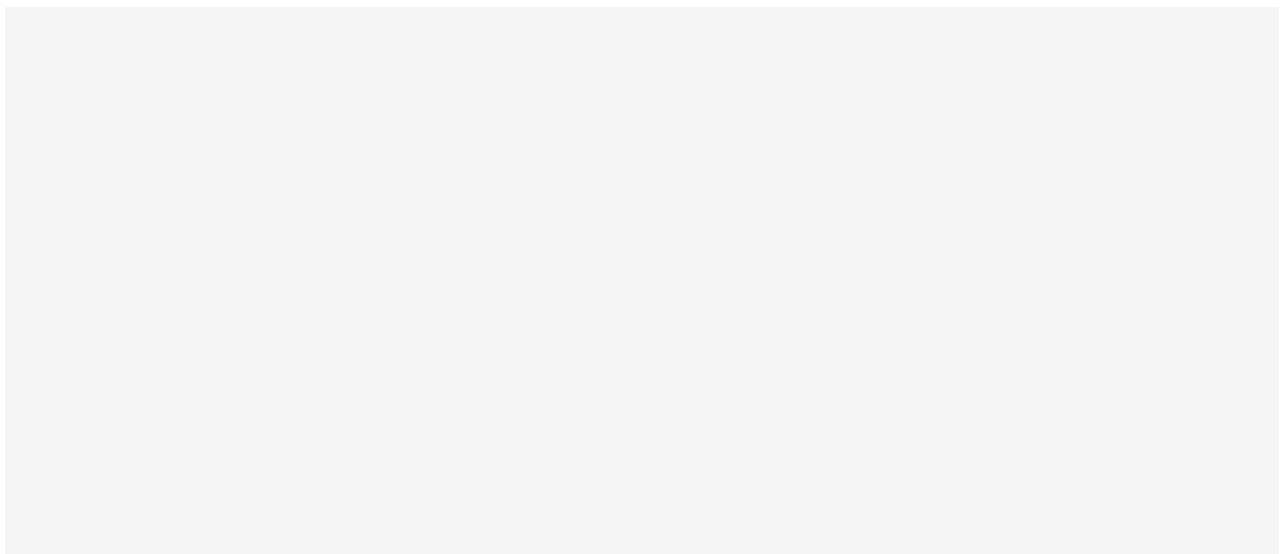
Aspetto positivo/segnale positivo, striscio colorato con Gram negativo, ma sottocultura negativa

E' importante esaminare la curva di crescita dei sistemi automatizzati prima di ritenere il segnale come falso-positivo e per escludere la possibilità di un falso negativo.

I motivi di una falsa positività sono spesso multifattoriali. I sistemi automatizzati possono incorrere in problemi riguardanti la strumentazione, valori della soglia impostati troppo bassi, superamento del volume massimo di sangue raccomandato, o per saggio su sangue con elevato conteggio leucocitario. Nei sistemi convenzionali, la torbidità può essere correlata all'aspetto del siero del paziente e non alla crescita microbica. Tuttavia, se le curve indicano crescita microbica, può essere utile una colorazione alternativa con carbol fucsina, Giemsa o Sandiford per dimostrare la presenza e la morfologia dei microrganismi presenti¹⁷⁴. Ciò può fornire indicazioni per selezionare terreni appropriati per le sottoculture.

Aspetto negativo/segnale negativo con striscio positivo al Gram e sottocultura positiva.

Fare riferimento alla sezione sulla sottocultura.



1 Considerazioni sulla sicurezza^{167,168,175-189}

1.1 Considerazioni sulla sicurezza^{167,168,175-178}

Usare tecnica asettica.

Raccogliere i campioni in appropriati contenitori a tenuta ermetica con marcatura CE (secondo le istruzioni dei costruttori se si utilizza un sistema di coltura di monitoraggio continuo del sangue) e trasportarli in sacchetti di plastica sigillati.

Ispezionare i flaconi per emocoltura per danneggiamenti.

Assicurarsi che i flaconi per emocoltura non abbiano superato la data di scadenza.

Non reincappucciare gli aghi.

E' essenziale la conformità alle normative postali, di trasporto e di conservazione.

1.2 Procedura sul Campione^{167,168,175-189}

Livello di contenimento 2.

Tutti i campioni devono essere processati a livello di contenimento 2, tranne quando si sospetta infezione con Gruppo di Rischio 3 (es. *Mycobacterium tuberculosis*, specie *Brucella*, specie *Francisella*, *Y. pestis*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*) o in caso di sottocolture da flaconi di sangue in casi sospetti di febbre tifoide o paratifo. In queste situazioni la manipolazione deve essere eseguita in cabina microbiologica di sicurezza in condizioni di Contenimento di Livello 3.

Le procedure di laboratorio che generano aerosol infettivi (tra le quali la ventilazione dei flaconi per emocoltura) devono essere eseguite in cabina di sicurezza microbiologica (MSC - microbiological safety cabinet)¹⁸¹. In teoria tutte le culture del sangue devono essere subcoltivate in una MSC perché possono mancare le informazioni cliniche e non evidenziare la possibilità di rischio da microrganismi appartenenti al Gruppo 3.

N. meningitidis causa malattie gravi e talvolta fatali. Sono state segnalate infezioni acquisite in laboratorio. Il microrganismo infetta principalmente per via respiratoria. Si dispone di un efficace vaccino per alcuni gruppi menongococchi

N. meningitidis appartiene al gruppo di Rischio 2 e la procedura della maggior parte del lavoro diagnostico può essere eseguita a livello di Contenimento 2.

A causa della gravità della malattia e dei rischi associati alla generazione di aerosol del microrganismo, qualsiasi manipolazione su isolati sospetti di *N. meningitidis* deve sempre essere effettuata in cabina microbiologica di sicurezza fino a quando *N. meningitidis* sia stata esclusa (come lo si deve fare per ogni procedura di laboratorio che generi aerosol infettivi).

Si deve essere consapevoli che alcuni funghi appartenenti al Gruppo di Rischio 3 sono termicamente dimorfi e che crescono come lieviti nei flaconi per emocoltura e nelle sottocolture incubate a 37 °C, ma come muffe molto infettive se posti in sottocolture di agar incubate a 28-30° C. Si deve porre attenzione se i soggetti da cui sono stati gli isolati i lieviti hanno un'anamnesi positiva di viaggio, soprattutto nei pazienti con infezione da HIV.

Evitare l'uso di oggetti taglienti, ove possibile. Sono preferibili aghi di aereazione per la ventilazione delle sub-unità per eseguire la sottocoltura dai flaconi, salvo che il sistema utilizzi un tappo a vite, in questo caso si raccomanda l'uso di una pipetta di plastica.

Inserire i flaconi dei pazienti "ad Alto Rischio" secondo le istruzioni del produttore e dei protocolli locali.

Fare riferimento alla linea guida corrente sulla sicurezza delle manipolazioni di tutti i microrganismi presentati in questa SMI.

Le linee guida precedentemente esplicitate devono essere supplementate con la COSHH locale e con la valutazione del rischio.

2 Prelievo del Campione

2.1 Tipo di Campione

Sangue

2.2 Tempo Ottimale e Metodo di Prelievo¹⁹⁰

Per la Sicurezza fare riferimento alla Sezione 1.1

Il campionamento di sangue deve essere effettuato secondo le linee guida del Department of Health¹⁰³

Prelevare i campioni prima della terapia antimicrobica se possibile¹⁹⁰.

Prelevare i campioni il più presto possibile dopo la comparsa dei sintomi clinici. Sebbene il sangue possa essere prelevato in qualsiasi momento, è considerato ottimale eseguire il prelievo durante, o immediatamente dopo una puntata febbrile, tranne in caso di endocardite, in cui il momento del prelievo è meno importante¹¹¹.

Raccogliere i campioni in appropriati contenitori impermeabili con marcatura CE e inserirli in sacchetti di plastica sigillati. Appropriate flaconi per emocoltura devono essere utilizzati per gli strumenti specifici quando si utilizzano sistemi di coltura a monitoraggio continuo del sangue e si dovrebbero seguire le istruzioni del produttore.

Nota: L'uso di disinfettanti a base di iodio non è raccomandato per la disinfezione del tappo di gomma butilica usato in alcuni sistemi commerciali perché si può influenzare l'integrità del setto.

Nota: Non è raccomandato l'uso di contenitore per la raccolta del sangue privo di set 'a farfalla' perché non è possibile valutare con precisione il volume del campione ed esiste il rischio potenziale di riflusso del sangue dai terreni di coltura alle vene del paziente.

Nota: Se con il sangue prelevato e con lo stesso prelievo venoso si devono eseguire altri esami, quali gas-analisi o Ves, per evitare la possibile contaminazione, inoculare per primi i flaconi per emocoltura. E' comunque preferibile prelevare separatamente il sangue per la cultura.

2.3 Quantità Adeguata e Numero Appropriato di Campioni¹⁹⁰

L'emocoltura è una cultura di sangue prelevata da un'unica sede venosa inoculata in uno o più flaconi.

Un set di emocoltura è definito come un flacone aerobico e uno anaerobico. Per i bambini e i neonati può essere richiesto un solo flacone aerobico.

Quantità

Adulti

Dovrebbe essere prelevato preferibilmente un volume di 20-30mL per ciascun set di emocoltura.

Nota: Possono essere richiesti più di 2 flaconi per set.

Bambini e neonati

Non più di 1% del volume totale del sangue.

Nota: Per ogni flacone non superare il volume massimo raccomandato dal produttore. Alcuni produttori commercializzano diverse tipologie di flaconi.

Nota: Se il volume di sangue è insufficiente per due bottiglie, il flacone aerobico dovrebbe essere inoculato prima e poi il resto inoculato nel flacone anaerobico.

Numero

Il numero e la frequenza della raccolta dei campioni dipendono dalle condizioni cliniche del paziente.

Prelevare due set consecutivi da due sedi di prelievo venoso separate durante un periodo di 24 ore per ciascun episodio settico¹¹⁰. Per i neonati, prelevare un solo flacone aerobico o un flacone speciale con volume ridotto.

Nei casi di sepsi grave, prima di iniziare un trattamento antibiotico, prelevare due set durante la prima ora, purché ciò non ritardi in modo significativo la somministrazione di antibiotico³¹.

Nel paziente con sospetta endocardite infettiva prelevare almeno tre set nel corso di 24 ore.

3 Trasporto e Conservazione del Campione^{167,168}

3.1 Condizioni Ottimali di Trasporto e Conservazione

Per considerazioni sulla Sicurezza fare riferimento alla Sezione 1.1

I flaconi inoculati dovrebbero essere trasportati e processati il più presto possibile¹⁹⁰.

I flaconi seminati dovrebbero essere inseriti il più presto possibile nei sistemi di coltura a monitoraggio continuo, entro un massimo di quattro ore^{1,2,4-6}.

Si raccomanda alla direzione del laboratorio di stabilire e gestire il trasporto dei campioni al fine di garantire il loro arrivo in un lasso di tempo adeguato al tipo di campione e per evitare il loro deterioramento³.

I campioni non devono essere refrigerati¹⁹⁰

Il personale di laboratorio deve essere consapevole che i flaconi di emocoltura arrivati in ritardo devono essere verificati per rilevare segni di crescita prima del loro inserimento nello strumento. Se questi sono presenti, si deve eseguire una colorazione di Gram e la sottocoltura del flacone^{169,170}.

4 Processo/Procedura sul Campione^{167,168}

4.1 Selezione della Prova

N/D

4.2 Aspetto

Controllare visualmente i flaconi per rilevare segni di crescita microbica.

4.3 Preparazione del Campione

4.3.1 Pretrattamento

N/D

4.3.2 Procedura sul campione

Standard

Flaconi positivi da tutti i sistemi

Disinfettare il setto del flacone di emocultura strofinandolo con appropriato disinfettante e lasciare asciugare.

Con un dispositivo di pre-areazione parziale o con una pipetta di plastica, in funzione del tipo di flacone utilizzato, rimuovere alcune gocce della miscela sangue/brodo (o di sopranatante) e inoculare una goccia su ciascuna piastra di agar.

Per l'isolamento di singole colonie diffondere l'inoculo con un'ansa sterile ([Q 5 – Inoculation of Culture Media for Bacteriology](#)).

Eseguire sottocolture per la prova diretta di sensibilità. Se non si ottiene un inoculo appropriato la prova dovrà essere ripetuta.

Nota: Al fine di minimizzare il rischio di autolisi di alcuni organismi come *S. pneumoniae*, i flaconi e dovrebbero essere posti in subcoltura il più presto possibile dopo il rilievo del segnale di positività¹⁷³

Flaconi positivi da sistemi manuali

Eseguire le sottocolture da tutti i flaconi del set, come descritto in precedenza, anche se appare positivo un solo flacone

Flaconi negativi da sistemi di monitoraggio continuo

Sottocoltura cieca dei flaconi di pazienti, se clinicamente indicato.

Flaconi negativi da sistemi manuali

Eseguire sottocoltura cieca per ogni flacone aerobico negativo dopo 24 – 48 ore¹⁹¹.

Prove supplementari

Segnale/aspetto positivo ma esame colturale negativo – tutti i sistemi automatizzati

Controllare la curva di crescita.

Se possibile escludere i falsi positivi correlati da elevati conteggi di globuli bianchi.

In relazione al quadro clinico e ai risultati dello striscio colorato con Gram, considerare la possibilità di una dipendenza nutrizionale, crescita lenta o microrganismo esigente. Eseguire sottocolture su terreni appropriati, o se sussiste incertezza sulla possibile eziologia, eseguire sottocolture supplementari come riportato nella Sezione 4.5.1. Fare riferimento a Informazioni Tecniche/Limitazioni per ulteriori indicazioni.

4.4 Microscopia

Flaconi positivi - tutti i sistemi

Eseguire l'esame microscopico su brodo da ogni flacone che attiva il "segnale", positivo o che è visivamente positivo (setto arcuato, sangue lisato o cambiamento di colore dell'indicatore).

Se si utilizza un terreno difasico, preparare uno striscio colorato con Gram dal sopranatante e dalla superficie dell'agar.

1. Miscelare il flacone delicatamente per capovolgimento, se questo non è già stato fatto automaticamente.

Nota: Alcuni sistemi possono non richiedere la miscelazione, ma i produttori possono raccomandare la sottocultura del sopranatante.

2. Disinfettare il tappo del flacone di emocultura con un prodotto appropriato e lasciare asciugare.
3. Con un'unità di sub-ventilazione o pipetta di plastica, secondo il tipo di flacone, rimuovere alcune gocce di miscela sangue/brodo (o sopranatante), e porlo su un vetrino da microscopio pulito.

Nota: Fare riferimento alle istruzioni del produttore per quanto riguarda la preparazione di strisci da bottiglie contenenti carbone.

4. Diffondere con un'ansa sterile per ottenere uno striscio sottile per la colorazione di Gram.

Nota: I microrganismi Gram-negativi possono essere osservati più facilmente se come contrasto si usano Sandiford o carbolfucsina¹⁷⁴. ([TP 39 --- Staining procedures](#)).

Se non si rilevano microrganismi al microscopio:

- 1 Verificare la curva di crescita (sistemi automatici). Se i parametri di crescita indicano sviluppo microbico positivo, può essere utile la preparazione di altri strisci con colorazioni alternative.
- 2 Eseguire sottocolture in piastre di agar (consultare 4.5.1) e reinserire il flacone nel sistema automatico, seguendo le istruzioni del produttore per la successiva incubazione e accertamenti.
- 3 Considerate specie *Mycobacterium* [B 40 – Investigation of Specimens for *Mycobacterium* species](#).

Nei sistemi automatizzati i segnali falsi positivi possono essere causati da eccesso di volume di sangue o da elevato numero di globuli bianchi.

4.5 Coltura e Ricerca

Semiare ciascuna piastra usando una pipetta sterile ([Q 5 - Inoculation of Culture Media for Bacteriology](#)).

Per l'isolamento di colonie separate diffondere l'inoculo con ansa sterile

4.5.1 Terreni di coltura, condizioni e microrganismi

Aspetti clinici/ condizioni	Campio ne	Terreni standard	Incubazione			Lettura colture	Microrganismo(i) ricercati
			Temp °C	Atmos	Tempo		
Qualsiasi condizione clinica	Sangue	Agar sangue†	35 -37	5 – 0% CO ₂	40-48 ore*	Giornalie ra	Ogni organismo considerato significativo
		Agar per anaerobi esigenti	35 –37	anaero bica	40-48 ore*	≥40 ore e fino a 5g	Ogni organismo Considerato significativo
Per queste situazioni aggiungere:							
Aspetti clinici/ condizioni	Campio ne	Terreni supplementar i	Incubazione			Lettura Culture	Microrganismo(i) ricercati
			Temp C°	Atmosf .	Tempo		
Sospetta meningococcemia o meningite Piccoli bastoncini Gram negativi i o diplococchi osservati al microscopio	Sangue	Agar† cioccolato	35-37	5-10% CO ₂	40-48 ore	Giornalie ra	Specie <i>Haemophilus</i> <i>N. meningitidis</i> <i>N. gonorrhoeae</i>
Bastoncini Gram negativi osservati al microscopio	Sangue	Agar MAc/Conkey/ CLED o agar cromogeno	35-37	air	16-24 ore	≥16 ore	Enterobacteriaceae Microrganismi non non–fermentanti Specie <i>Pseudomonas</i>
Esame microscopico indicativo di infezione mista o anaerobica	Sangue	Agar neomicina per anaerobi esigenti con disco di metronidazolo da 5µg	35-37	anaero bica	5-7d	≥40 ore e a 5g	Anaerobi
Infezioni fungine sistemiche	Sangue	Agar Sabouraud	28-30	aria	5g	2 e a 5g	Fungi Muffe
Coltura primaria negativa e curva di crescita positiva‡ Sottocolture da tutti i flaconi	Sangue	Agar sangue	35 -37	micro- aerobica	5 g	≥3 g e 5 g	Specie <i>Campylobacter</i> Specie <i>Helicobacter</i>
		Agar sangue con semina strisciata di <i>S.</i> <i>aureus</i> (NCTC 6571)	35-37	5-10% CO ₂	40-48 ore	≥40 ore	Specie <i>Abiotrophia</i>
		Agar anerobi esigenti	35-37	anaero bic	5d	≥40hr and at 5d	Microrganismi cisteina-dipendenti
		Agar Mac Conkey/ CLED	35-37	air	16-24 ore	≥16 ore	Microrganismi cisteina-dipendenti

Altri microrganismi da considerare – *Mycobacterium* (B 40) e specie *Brucella*: considerare anche microrganismi che possono essere coinvolti nella diffusione volontaria.

† Si può aggiungere un disco di optochina se al microscopio sono stati osservati Streptococchi

* il periodo di incubazione può essere prolungato a 5 giorni per presunti falsi negativi o se richiesto per sospetto clinico; in questi casi le piastre dovrebbero essere lette a ≥ 40 ore e lasciate nell'incubatore/termostato fino al 5° giorno

#ove clinicamente indicato, l'emocoltura può richiedere un'incubazione prolungata fino a tre settimane per specie *Cryptococcus* e fino a sei settimane per specie *Histoplasma*^{19,192-194}.

‡ si possono eventualmente considerare altri microrganismi.

4.6 Identificazione

Per l'identificazione del microrganismo fare riferimento alle singole SMI.

Livello minimo di identificazione in laboratorio

Tutti gli isolati clinicamente significativi devono essere identificati a livello di specie.

Nota: Qualsiasi microrganismo considerato come contaminante potrebbe non richiedere l'identificazione a livello di specie.

Si raccomanda che gli isolati clinicamente significativi siano conservati per almeno una settimana. Conservare gli isolati su becchi di clarino di terreni appropriati o a temperatura da – 20 a – 80°C in caso di periodi più prolungati, se è probabile che possano essere richiesti successivi accertamenti (quali la tipizzazione degli isolati da infezione nosocomiale).

4.7 Prova di Sensibilità agli Antimicrobici

Per ridurre i tempi di consegna, si raccomanda che i saggi di sensibilità diretti siano eseguiti su tutti gli isolati da emocoltura quando appropriato.

Fare riferimento alle linee guida della [British Society for Antimicrobial Chemotherapy \(BSAC\)](#) e/o [EUCAST](#)

4.8 Invio per Ricerche su Focolaio Epidemico

N/D

4.9 Invio ai Laboratori di Riferimento

Per informazioni sulle prove disponibili, tempi di risposta, procedure per il trasporto e altre richieste al laboratorio di riferimento, [click here for user manuals and request forms](#).

Microrganismi con resistenze insolite o inattese, o qualora sussista un problema clinico o di laboratorio, o anomalie che richiedano approfondimenti devono essere inviati agli appropriati laboratori di riferimento.

Contattare l'appropriato laboratorio nazionale di riferimento per informazioni sulle prove disponibili, tempi di consegna, procedure di trasporto ed eventuali altre richieste per l'invio del campione:

Inghilterra e Galles

<https://www.gov.uk/specialist-and-reference-microbiology-laboratory-tests-and-services>

Scozia

<http://www.hps.scot.nhs.uk/reflab/index.aspx>

Irlanda del Nord

<http://www.publichealth.hscni.net/directorate-public-health/health-protection>

5 Procedura di Refertazione

Le modalità concordate in sede locale per il rilascio dei risultati devono essere scritte in base ai requisiti del LIMS locale. (Laboratory Information Management Systems) e alle richieste dell'utilizzatore.

5.1 Microscopia

Colorazione di Gram

Refertare il microrganismo rilevato.

Altre colorazioni supplementari

Segnalazione verbale dei microrganismi rilevati se significativi (oltre a referti scritti se richiesti dai protocolli locali).

5.1.1 Tempo di refertazione Microscopia

I risultati positivi dovrebbero essere trasmessi immediatamente, entro due ore, secondo la direttiva locale. La refertazione scritta o computerizzata successiva alle informazioni preliminari/segnalazione verbale entro 24 ore.

5.2 Coltura

Refertare tutti i risultati nel modo seguente:

- Tutti gli organismi che sono stati isolati (con commento se l'isolato è di dubbio significato).
- Assenza di crescita.
- Risultati delle prove supplementari.

5.2.1 Tempo refertazione della coltura

I referti culturali preliminari positivi devono essere trasmessi per via telefonica o informatica, segnalando, se appropriato, che sarà inviata una nuova refertazione. I referti finali scritti o generati dal computer devono seguire le informazioni preliminari/verbalizzati nello stesso giorno, come conferma, ove possibile, ed entro un massimo di 24 ore²⁴.

I risultati preliminari negativi devono essere inviati dopo 36 ore dal prelievo per neonati e dopo 48 ore per tutti gli altri pazienti (o come da accordi locali)^{18,20}. E' previsto che i referti preliminari negativi siano generati automaticamente per evidenziare in modo preciso il tempo reale d'incubazione. Le refertazioni finali devono essere generate entro cinque giorni dal ricevimento in laboratorio (con un tempo maggiore se l'incubazione è stata protratta, o se gli isolati sono stati

inviati a un laboratorio di riferimento per la conferma), il più presto possibile, e comunque entro un massimo di 48 ore dopo il referto preliminare.

Risultati clinicamente urgenti devono essere inviate per via telefonica o informatica secondo i protocolli locali.

5.3 Sensibilità agli Antimicrobici

Refertare le sensibilità come clinicamente suggerito. Usare in modo prudente gli antibiotici secondo i protocolli locali e nazionali raccomandati

6 Notifica al PHE^{195,196} o Equivalente⁸⁸⁻⁹¹

Le Norme di Denuncia del 2010 rendono obbligatorio ai laboratori diagnostici di denunciare alla Public Health England (PHE) tutti i casi nei quali s'identificano gli agenti causali elencati nella Scheda 2 della Direttiva. Le denunce devono pervenire per scritto, su carta o per via elettronica, entro sette giorni. I casi urgenti devono essere notificati il più presto possibile verbalmente: si raccomanda entro le 24 ore. Questi stessi devono essere in seguito denunciati in forma scritta entro sette giorni.

Secondo la Notification Regulations il laboratorio ricevente la notifica è l'ufficio locale della PHE. Se il caso è già stato notificato da un professionista medico abilitato, al laboratorio diagnostico è ancora richiesta la denuncia del caso qualora si riscontrino evidenze d'infezione imputabili ad agenti causali soggetti a tale disposizione.

La denuncia secondo la Direttiva dell'Health Protection (Notification) Regulations 2010 non sostituisce l'informazione volontaria alla PHE. La maggior parte dei laboratori del NHS segnala spontaneamente al PHE gran parte delle diagnosi di laboratorio sostenute da vari agenti eziologici e molte sezioni della PHE hanno definito accordi con i laboratori locali per segnalazioni urgenti di alcuni tipi d'infezione. Queste iniziative devono continuare.

Nota: La linea guida dell'Health Protection Legislation Guidance (2010) include la segnalazione per Human Immunodeficiency Virus HIV & Sexually Transmitted Infections STIs, Healthcare Associated Infections e HCAs e Creutzfeldt–Jakob disease CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non al 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories'.

<https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/our-governance#health-protection-regulations-2010>

Esistono accordi diversi in [Scotland](#)^{88,89}, [Wales](#)⁹⁰ e [Northern Ireland](#)⁹¹.

Traduzione a cura di Roberto Rescaldani, già primario del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A. O. San Gerardo dei Tintori - Monza.

I testi originali e le traduzioni sono disponibili sul Web APSI - www.apsi.it - Webmaster Sergio Malandrini, Dirigente di primo livello del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori di Monza

Appendice 1: Punti Critici di Controllo nella Ricerca con Emocultura

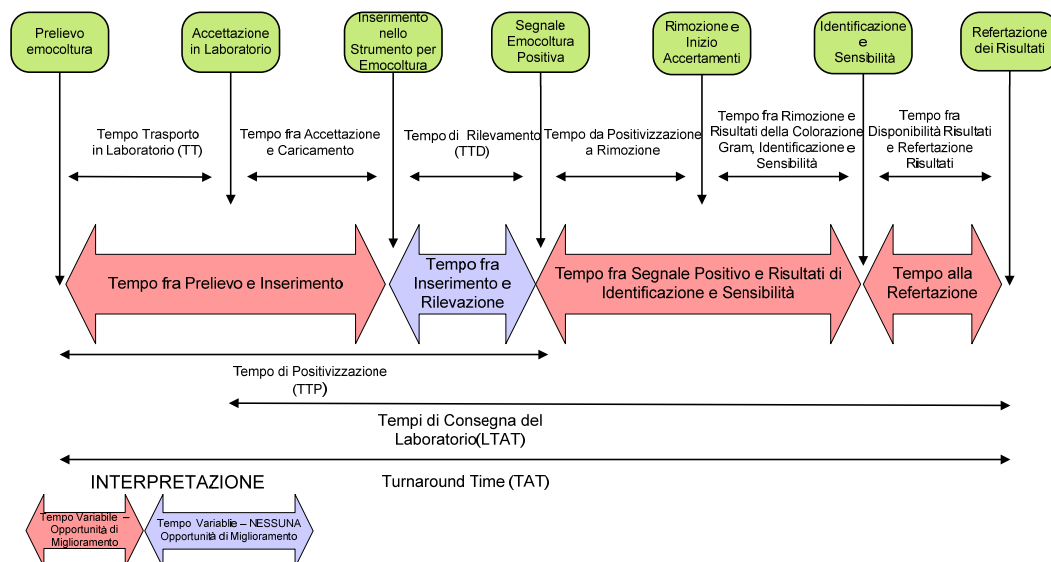
Suddividendo le fasi della procedura dell'emocultura è possibile identificare i punti critici di controllo in cui si possono verificare ritardi o la possibilità di migliorare i tempi di consegna dei risultati (TAT)².

Il termine TAT in questo contesto si riferisce al tempo impiegato dal prelievo dell'emocultura al momento della refertazione. Il TAT di Laboratorio è riferito al tempo compreso fra ricevimento del campione in laboratorio e la refertazione dei risultati. Il tempo necessario per raggiungere ciascuna delle seguenti fasi del processo ha un effetto complessivo sul TAT.

- Tempo dal prelievo al ricevimento in laboratorio - Tempo di trasporto^{2,6} (TT).
- Tempo dal ricevimento all'inserimento dell'emocultura nello strumento².
- Tempo fra inserimento e registrazione della positività^{97,197} - Tempo di rilevamento TTD
- Tempo fra rilevamento della positività e risultati dell'identificazione e della sensibilità^{4,24}.
- Tempo fra risultati dell'identificazione e della sensibilità alla refertazione.

Escluso il tempo dall'inserimento dell'emocultura nello strumento per il rilevamento (TTD), ciascuna fase del processo dipende da molteplici fattori esterni, comprese le infrastrutture di trasporto, priorità e velocità della procedura da parte del personale, tempo di consegna oltre le ore di servizio e tempestiva comunicazione dell'identificazione positiva e dei risultati di sensibilità al personale medico. Una volta che la coltura è inserita nello strumento, poco può essere fatto per accelerare la procedura fino alla comparsa di una crescita nel flacone sufficiente a produrre un segnale positivo. Il tempo che intercorre fra la comparsa del segnale positivo e la disponibilità dei risultati d'identificazione e di suscettibilità può essere ulteriormente suddiviso in due fasi; il tempo dalla comparsa del segnale positivo e la rimozione della coltura dallo strumento e quello fra la rimozione del campione e i risultati della colorazione Gram, l'identificazione e la sensibilità. I risultati preliminari possono essere trasmessi verbalmente prima della generazione del referto finale.

Cronologia – Punti Critici di Controllo²



La riduzione del TAT consente migliori risultati clinici perché le emoculture positive offrono una seconda opportunità con la refertazione e il collegamento clinico per ottimizzare il trattamento antibiotico quando la terapia empirica iniziale ha ottenuto effetto subottimale^{25,35}.

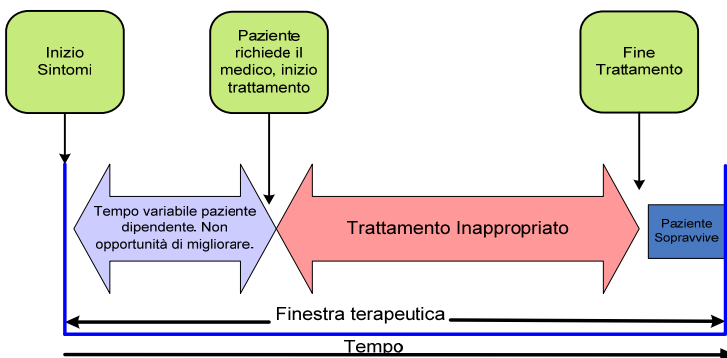
Appendice 2: Finestra Terapeutica^{25,28,35}

Per ciascun paziente si dispone di un periodo entro il quale l'infezione e il paziente possono essere entrambi trattati con successo. Questo lasso di tempo può essere considerato come 'Finestra Terapeutica'. Esiste peraltro un punto esterno al periodo finestra in cui, anche se l'infezione può essere posta sotto controllo o eradicata, il paziente non sopravvivere in conseguenza dell'attivazione di cascate infiammatorie o danneggiamenti d'organo andati oltre la fase di reversibilità²⁶. L'obiettivo è quindi quello di fornire una terapia adeguata, compresi gli antibiotici, entro il periodo finestra. La dimensione della finestra terapeutica varia in modo considerevole e può essere molto breve o lungo senza limiti, dipendendo dai microrganismi e dai pazienti coinvolti. L'approccio ottimale comprende la prescrizione precoce di antibiotici ad ampio spettro, seguito da risposte tempestive dei risultati microbiologici e clinici come e quando divengono disponibili²⁵.

Le seguenti quattro situazioni dimostrano la potenziale influenza dei risultati dell'emocoltura sulla prognosi del paziente²⁸:

1. Trattamento appropriato ricevuto all'interno della finestra terapeutica e sopravvivenza del paziente

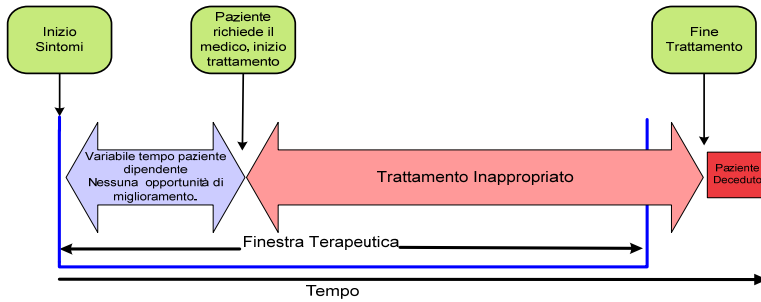
La finestra terapeutica definisce un periodo entro cui l'infezione e il paziente possono essere trattati con successo. La dimensione della finestra terapeutica varia in modo consistente. Per esempio, in un giovane paziente con cistite, la finestra può essere lunga in modo indefinito. Per contro, nel paziente gravemente settico, "la finestra terapeutica" può essere molto breve. Qualsiasi ritardo a un trattamento iniziale adeguato oltre questo periodo è associato a prognosi sfavorevole. Gli andamenti delle sepsi riconoscono l'importanza della terapia antibiotica tempestiva considerandoli d'importanza fondamentale.



2. Il paziente riceve terapia antibiotica empirica inappropriata durante tutta la finestra terapeutica e non sopravvive.

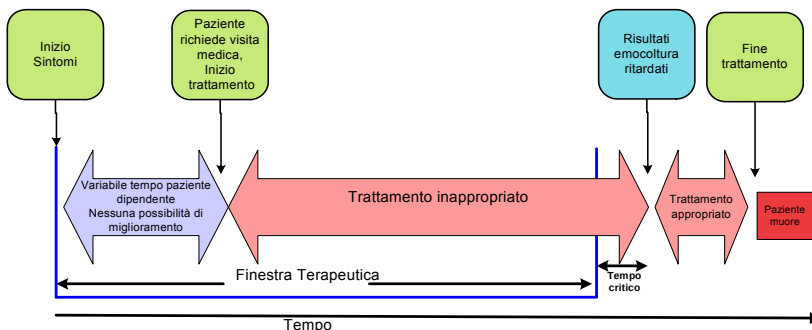
La durata della "finestra terapeutica" può in questo caso essere stata molto breve, estesa per alcuni giorni. La sepsi evolve oltre questo periodo. Così, quando il paziente è stato visitato la prima volta, la sua condizione avrebbe potuto essere stabile, con un periodo di "finestra terapeutica" relativamente lungo. E' stata prescritta una terapia antibiotica non corretta e nelle prime 24 – 48 ore si è perso tempo per valutare la sua efficacia. Per una serie di motivi il trattamento appropriato non è stato prescritto e il paziente è muore.

Ricerca con Emocultura (per Microrganismi diversi da specie *Mycobacterium*)



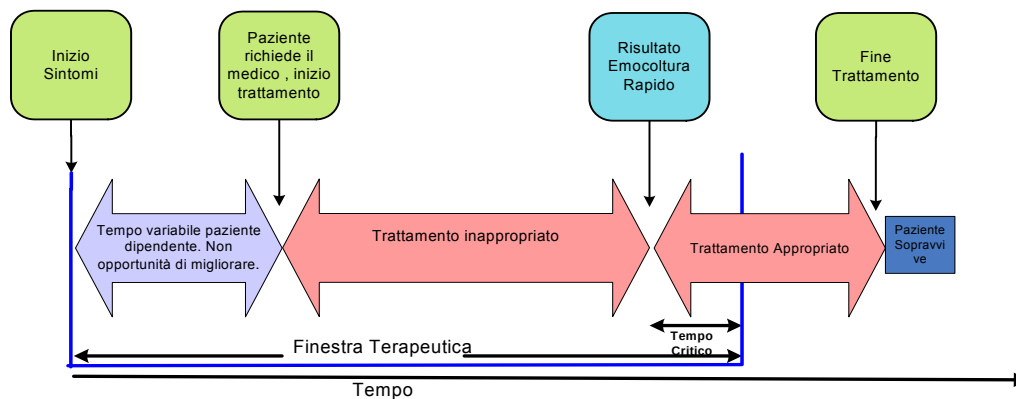
3. Il paziente riceve un trattamento appropriato all'esterno della finestra terapeutica e non sopravvive.

I risultati di una dell'emocultura identificano che il paziente sta ricevendo un trattamento inappropriato. Tuttavia, il risultato dell'emocultura è stato ricevuto troppo tardi, al di fuori della 'finestra di opportunità'. Anche se si inizia un trattamento adeguato la prognosi del paziente è già definita. Mentre l'infezione batterica può essere eliminata con antibiotici, l'effetto dell'infezione sul paziente è divenuto irreversibile.



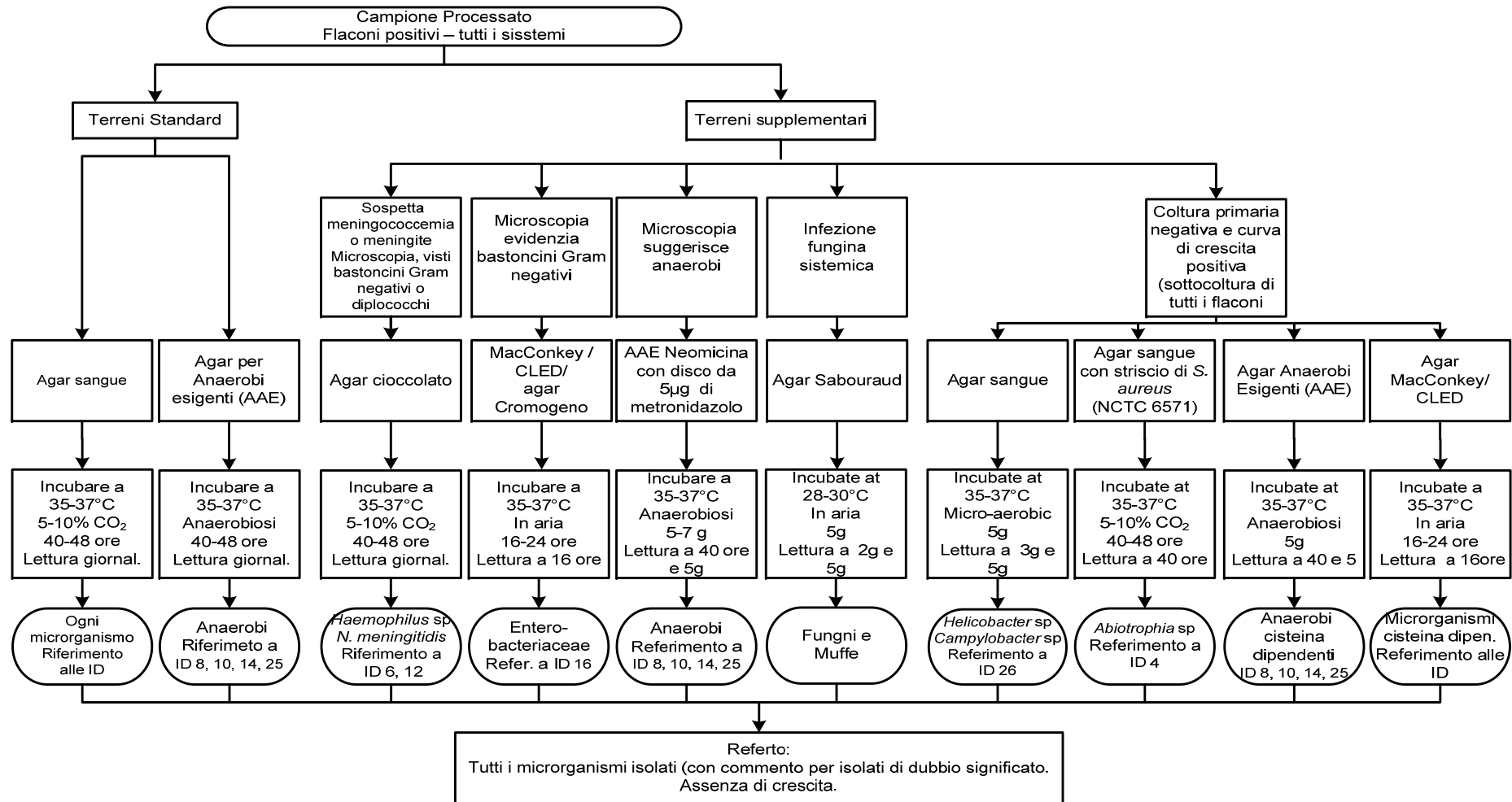
4. Il paziente riceve un trattamento appropriato all'interno della finestra terapeutica e sopravvive.

Il risultato dell'emocultura è stato ricevuto all'interno della finestra terapeutica con conseguente somministrazione di una terapia appropriata e un esito positivo. La condizione clinica del paziente è risultata stabile al momento del ricovero, ma è peggiorata rapidamente con il trattamento inappropriato avvicinandosi alla fine della finestra terapeutica.



Nelle illustrazioni tre e quattro sono illustrati 'periodi critici', il tempo che intercorre tra la fine della finestra e la disponibilità del risultato dell'emocultura. Il periodo critico è molto variabile, ma è anche noto che potrebbe essere molto breve per alcuni pazienti. Diversamente, la procedura rapida dell'emocultura (illustrazione quattro) può accelerare un risultato di 24 o più ore, in modo sufficiente per spostare per alcuni pazienti la somministrazione di un'appropriata terapia all'interno del periodo finestra.

Appendice 3: Ricerca con Emocolture (per Microrganismi diversi da specie *Mycobacterium*)



Bibliografia

1. Saito T, Iinuma Y, Takakura S, Nagao M, Matsushima A, Shirano M, et al. Delayed insertion of blood culture bottles into automated continuously monitoring blood culture systems increases the time from blood sample collection to the detection of microorganisms in bacteremic patients. *J Infect Chemother* 2009;15:49-53.
2. van der Velden LB, Vos FJ, Mouton JW, Sturm PD. Clinical impact of preincubation of blood cultures at 37 degrees C. *J Clin Microbiol* 2011;49:275-80.
3. Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd. Standards for the Medical Laboratory. 2010.
4. Janapatla RP, Yan JJ, Chien ML, Chen HM, Wu HM, Wu JJ. Effect of overnight storage of blood culture bottles on bacterial detection time in the BACTEC 9240 blood culture system. *J Microbiol Immunol Infect* 2010;43:126-32.
5. Lemming L, Holt HM, Petersen IS, Ostergaard C, Bruun B. Bactec 9240 blood culture system: to preincubate at 35 degrees C or not? *Clin Microbiol Infect* 2004;10:1089-91.
6. Ronnberg C, Mildh M, Ullberg M, Ozenci V. Transport time for blood culture bottles: underlying factors and its consequences. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76:286-90.
7. Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, Hakkaart-van Roijen L, Goessens W, Verbrugh HA, et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:428-35.
8. Kerremans JJ, Goessens WH, Verbrugh HA, Vos MC. Accuracy of identification and susceptibility results by direct inoculation of Vitek 2 cards from positive BACTEC cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:892-8.
9. Edelmann A, Pietzcker T, Wellinghausen N. Comparison of direct disk diffusion and standard microtitre broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates. *J Med Microbiol* 2007;56:202-7.
10. Dark P, Dunn G, Chadwick P, Young D, Bentley A, Carlson G, et al. The clinical diagnostic accuracy of rapid detection of healthcare-associated bloodstream infection in intensive care using multipathogen real-time PCR technology. *BMJ Open* 2011;1:e000181.
11. Paolucci M, Landini MP, Sambri V. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36 Suppl 2:S6-16.
12. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:444-65.
13. Masterson KC, McGowan JE, Jr. Detection of positive blood cultures by the Bactec NR660. The clinical importance of five versus seven days of testing. *Am J Clin Pathol* 1988;90:91-4.
14. Hardy DJ, Hulbert BB, Migneault PC. Time to detection of positive BacT/Alert blood cultures and lack of need for routine subculture of 5- to 7-day negative cultures. *J Clin Microbiol* 1992;30:2743-5.
15. Kurtoglu MG, Bozkurt H, Tuncer O, Kesli R, Berktaş M. Distribution, optimum detection time and antimicrobial susceptibility rates of the microorganisms isolated from blood cultures over a 4-year time period in a Turkish university hospital and a review of the international literature. *J Int Med Res* 2008;36:1261-72.
16. Ozkurt Z, Erol S, Tasyaran MA, Kaya A. Detection of *Brucella melitensis* by the BacT/Alert automated system and *Brucella* broth culture. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:749-52.

17. Sumerkan B, Gokahmetoglu S, Esel D. Brucella detection in blood: comparison of the BacT/Alert standard aerobic bottle, BacT/Alert FAN aerobic bottle and BacT/Alert enhanced FAN aerobic bottle in simulated blood culture. Clin Microbiol Infect 2001;7:369-72.
18. National Institute for Healthcare and Clinical Excellence. Antibiotics for early-onset neonatal infection: antibiotics for the prevention and treatment of early-onset neonatal infection. 2012.
19. Labarca JA, Wagar EA, Grasmick AE, Kokkinos HM, Bruckner DA. Critical evaluation of 4-week incubation for fungal cultures: is the fourth week useful? J Clin Microbiol 1998;36:3683-5.
20. Kumar Y, Qunibi M, Neal TJ, Yoxall CW. Time to positivity of neonatal blood cultures. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2001;85:F182-F186.
21. Stefani S. Diagnostic techniques in bloodstream infections: where are we going? Int J Antimicrob Agents 2009;34 Suppl 4:S9-12.
22. Rowther FB, Rodrigues CS, Deshmukh MS, Kapadia FN, Hegde A, Mehta AP, et al. Prospective comparison of eubacterial PCR and measurement of procalcitonin levels with blood culture for diagnosing septicemia in intensive care unit patients. J Clin Microbiol 2009;47:2964-9.
23. Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. Int J Antimicrob Agents 2007;30 Suppl 1:S7-15.
24. Hautala T, Syrjala H, Lehtinen V, Kauma H, Kauppila J, Kujala P, et al. Blood culture Gram stain and clinical categorization based empirical antimicrobial therapy of bloodstream infection. Int J Antimicrob Agents 2005;25:329-33.
25. Deresinski S. Principles of Antibiotic Therapy in Severe Infections: Optimizing the Therapeutic Approach by Use of Laboratory and Clinical Data. Clinical Infectious Diseases 2007;45:S177-S183.
26. Berild D, Mohseni A, Diep LM, Jensenius M, Ringertz SH. Adjustment of antibiotic treatment according to the results of blood cultures leads to decreased antibiotic use and costs. J Antimicrob Chemother 2006;57:326-30.
27. Sprung CL. Definitions of sepsis--have we reached a consensus? Crit Care Med 1991;19:849-51.
28. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G, et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. Clin Infect Dis 1997;24:584-602.
29. Jumaa PA, Chattopadhyay B. Pseudobacteraemia. J Hosp Infect 1994;27:167-77.
30. Noskin GA, Suriano T, Collins S, Sesler S, Peterson LR. Paenibacillus macerans pseudobacteremia resulting from contaminated blood culture bottles in a neonatal intensive care unit. Am J Infect Control 2001;29:126-9.
31. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Intensive Care Med 2008;34:17-60.
32. Al MM, Darouiche RO. Sepsis syndrome, bloodstream infections, and device-related infections. Med Clin North Am 2012;96:1203-23.
33. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. Lancet 2005;365:63-78.
34. Cohen J. Sepsis. Medicine 2009;37:562-5.

35. Kerremans JJ, van der Bij AK, Goessens W, Verbrugh HA, Vos MC. Immediate incubation of blood cultures outside routine laboratory hours of operation accelerates antibiotic switching. *J Clin Microbiol* 2009;47:3520-3.
36. Daniels R. Surviving the first hours in sepsis: getting the basics right (an intensivist's perspective). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011;66:ii11-ii23.
37. Paolucci M, Landini MP, Sambri V. How can the microbiologist help in diagnosing neonatal sepsis? *Int J Pediatr* 2012;120:39.
38. Edmond K, Zaidi A. New approaches to preventing, diagnosing, and treating neonatal sepsis. *PLoS Med* 2010;7:e1000213.
39. Brook I. The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe* 2010;16:183-9.
40. Finelli L, Livengood JR, Saiman L. Surveillance of pharyngeal colonization: detection and control of serious bacterial illness in low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 1994;13:854-9.
41. Lee PY, Holliman RE, Davies EG. Surveillance cultures on neonatal intensive care units. *J Hosp Infect* 1995;29:233-6.
42. Guerti K, Devos H, Ieven MM, Mahieu LM. Time to positivity of neonatal blood cultures: fast and furious? *J Med Microbiol* 2011;60:446-53.
43. Ispahani P, Pearson NJ, Greenwood D. An analysis of community and hospital-acquired bacteraemia in a large teaching hospital in the United Kingdom. *Q J Med* 1987;63:427-40.
44. Plummer M, Schoch PE. *Rothia dentocariosa* bacteremia. *Clinical Microbiology Newsletter* 1995;17:22-4.
45. Auzias A, Bollet C, Ayari R, Drancourt M, Raoult D. *Corynebacterium freneyi* bacteremia. *J Clin Microbiol* 2003;41:2777-8.
46. Roberts FJ. Nontyphoidal, nonparatyphoidal salmonella septicemia in adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:205-8.
47. Wilks D, Jacobson SK, Lever AM, Farrington M. Fatal melioidosis in a tourist returning from Thailand. *J Infect* 1994;29:87-90.
48. Collazos J, de Miguel J, Ayarza R. *Moraxella catarrhalis* bacteremic pneumonia in adults: two cases and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:237-40.
49. Wenzel RP. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1995;20:1531-4.
50. Warnock EW, III, MacMath TL. Primary *Vibrio vulnificus* septicemia. *J Emerg Med* 1993;11:153-6.
51. Khan AM, Albert MJ, Sarker SA, Bhattacharya MK, Azad AK. Septicemia due to *Vibrio cholerae* 0139 Bengal. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;22:337-8.
52. Bonatti H, Rossboth DW, Nachbaur D, Fille M, Aspöck C, Hend I, et al. A series of infections due to *Capnocytophaga* spp in immunosuppressed and immunocompetent patients. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:380-7.
53. Fenner L, Widmer AF, Straub C, Frei R. Is the incidence of anaerobic bacteremia decreasing? Analysis of 114,000 blood cultures over a ten-year period. *J Clin Microbiol* 2008;46:2432-4.

54. Mylotte JM, Tayara A. Blood cultures: clinical aspects and controversies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:157-63.
55. Riley JA, Heiter BJ, Bourbeau PP. Comparison of recovery of blood culture isolates from two BacT/ALERT FAN aerobic blood culture bottles with recovery from one FAN aerobic bottle and one FAN anaerobic bottle. *J Clin Microbiol* 2003;41:213-7.
56. Paisley JW, Lauer BA. Pediatric blood cultures. *Clin Lab Med* 1994;14:17-30.
57. Jaffe DM. Occult bacteremia in children. [Review] [100 refs]. *Adv Pediatr Infect Dis* 1994;9:237-60.
58. Bouza E, Burillo A, Munoz P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:265-74.
59. Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:788-802.
60. Garcia X, Sabatier C, Ferrer R, Fontanals D, Duarte M, Colomina M, et al. Differential time to positivity of blood cultures: a valid method for diagnosing catheter-related bloodstream infections in the intensive care unit. *Med Intensiva* 2012;36:169-76.
61. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;49:1-45.
62. O'Grady NP, Alexander M, Burns LA, Dellinger EP, Garland J, Heard SO, et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Am J Infect Control* 2011;39:S1-34.
63. Kaasch AJ, Rieg S, Hellmich M, Kern WV, Seifert H. Differential time to positivity is not predictive for central line-related *Staphylococcus aureus* bloodstream infection in routine clinical care. *J Infect* 2014;68:58-61.
64. Guembe M, Rodriguez-Creixems M, Sanchez-Carrillo C, Martin-Rabadan P, Bouza E. Differential time to positivity (DTTP) for the diagnosis of catheter-related bloodstream infection: do we need to obtain one or more peripheral vein blood cultures? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:1367-72.
65. Beekmann SE, Diekema DJ, Huskins WC, Herwaldt L, Boyce JM, Sherertz RJ, et al. Diagnosing and reporting of central line-associated bloodstream infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012;33:875-82.
66. Janakiraman V. Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment, and prevention. *Rev Obstet Gynecol* 2008;1:179-85.
67. Mylonakis E, Paliou M, Hohmann EL, Calderwood SB, Wing EJ. Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:260-9.
68. Fitzsimmons K, Bamber AI, Smalley HB. Infective endocarditis: changing aetiology of disease. *Br J Biomed Sci* 2010;67:35-41.
69. Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *Lancet* 2004;363:139-49.
70. Fefer P, Raveh D, Rudensky B, Schlesinger Y, Yinnon AM. Changing epidemiology of infective endocarditis: a retrospective survey of 108 cases, 1990-1999. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:432-7.
71. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:177-207.

72. McDonald JR. Acute Infective Endocarditis. *Infect Dis Clin North Am* 2009;23:643-64.
73. Kohler W. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int J Med Microbiol* 2007;297:133-50.
74. Hogevis H, Alestig K. Fungal endocarditis--a report on seven cases and a brief review. *Infection* 1996;24:17-21.
75. Tacke D, Koehler P, Cornely OA. Fungal endocarditis. *Curr Opin Infect Dis* 2013;26:501-7.
76. Petti CA, Bhally HS, Weinstein MP, Joho K, Wakefield T, Reller LB, et al. Utility of extended blood culture incubation for isolation of *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, and *Kingella* organisms: a retrospective multicenter evaluation. *J Clin Microbiol* 2006;44:257-9.
77. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. *Clin Infect Dis* 2005;41:1677-80.
78. Petti CA, Zaidi AK, Mirrett S, Reller LB. Comparison of Isolator 1.5 and BACTEC NR660 aerobic 6A blood culture systems for detection of fungemia in children. *J Clin Microbiol* 1996;34:1877-9.
79. Holliman R. The immunocompromised patient: infection in cancer and transplantation. *Medicine* 2009;37:522-4.
80. Varani S, Stanzani M, Paolucci M, Melchionda F, Castellani G, Nardi L, et al. Diagnosis of bloodstream infections in immunocompromised patients by real-time PCR. *J Infect* 2009;58:346-51.
81. Algar V, Novelli V. Infections in the immunocompromised host. *Paediatr Child Health* 2007;17:132-6.
82. Beebe JL, Koneman EW. Recovery of uncommon bacteria from blood: association with neoplastic disease. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:336-56.
83. Kauffman CA. Diagnosis of histoplasmosis in immunosuppressed patients. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:421-5.
84. Lobmaier IV, Vege A, Gaustad P, Rognum TO. Bacteriological investigation--significance of time lapse after death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:1191-8.
85. Silver H, Sonnenwirth AC. A practical and efficacious method for obtaining significant postmortem blood cultures. *Am J Clin Pathol* 1969;52:433-7.
86. Pryce JW, Roberts SE, Weber MA, Klein NJ, Ashworth MT, Sebire NJ. Microbiological findings in sudden unexpected death in infancy: comparison of immediate postmortem sampling in casualty departments and at autopsy. *J Clin Pathol* 2011;64:421-5.
87. Wilson SJ, Wilson ML, Reller LB. Diagnostic utility of postmortem blood cultures. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:986-8.
88. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
89. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
90. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
91. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).

92. Kanj SS, Kanafani ZA. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clin Proc* 2011;86:250-9.
93. Ammerlaan HS, Harbarth S, Buiting AG, Crook DW, Fitzpatrick F, Hanberger H, et al. Secular trends in nosocomial bloodstream infections: antibiotic-resistant bacteria increase the total burden of infection. *Clin Infect Dis* 2013;56:798-805.
94. Huttunen R, Syrjanen J, Vuento R, Aittoniemi J. Current concepts in the diagnosis of blood stream infections. Are novel molecular methods useful in clinical practice? *Int J Infect Dis* 2013;17:e934-e938.
95. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, de Cueto M, Rios MJ, et al. Bacteremia due to extended-spectrum beta -lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis* 2006;43:1407-14.
96. Worth LJ, Slavin MA. Bloodstream infections in haematology: Risks and new challenges for prevention. *Blood Rev* 2009;23:113-22.
97. Vigano EF, Vasconi E, Agrappi C, Clerici P. Use of simulated blood cultures for time to detection comparison between BacT/ALERT and BACTEC 9240 blood culture systems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44:235-40.
98. Rohner P, Pepey B, Auckenthaler R. Comparison of BacT/Alert with Signal blood culture system. *J Clin Microbiol* 1995;33:313-7.
99. Wilson ML, Mirrett S, McDonald LC, Weinstein MP, Fune J, Reller LB. Controlled clinical comparison of bioMerieux VITAL and BACTEC NR-660 blood culture systems for detection of bacteremia and fungemia in adults. *J Clin Microbiol* 1999;37:1709-13.
100. Spanjaard L, Kuijper EJ, Dankert J. Clinical comparison of two commercial blood culture systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:881-5.
101. Krisher KK, Gibb P, Corbett S, Church D. Comparison of the BacT/Alert PF pediatric FAN blood culture bottle with the standard pediatric blood culture bottle, the Pedi-BacT. *J Clin Microbiol* 2001;39:2880-3.
102. McDonald LC, Fune J, Gaido LB, Weinstein MP, Reimer LG, Flynn TM, et al. Clinical importance of increased sensitivity of BacT/Alert FAN aerobic and anaerobic blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 1996;34:2180-4.
103. Department of Health. Taking blood cultures. 2011.
104. Stohl S, Benenson S, Svirj A, Avidan A, Block C, Sprung CL, et al. Blood cultures at central line insertion in the intensive care unit: comparison with peripheral venipuncture. *J Clin Microbiol* 2011;49:2398-403.
105. Dwivedi S, Bhalla R, Hoover DR, Weinstein MP. Discarding the initial aliquot of blood does not reduce contamination rates in intravenous-catheter-drawn blood cultures. *J Clin Microbiol* 2009;47:2950-1.
106. Byard RW. Arterial blood cultures in disseminated fungal disease. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:728-9.
107. Krumholz HM, Cummings S, York M. Blood culture phlebotomy: switching needles does not prevent contamination. *Ann Intern Med* 1990;113:290-2.
108. Leisure MK, Moore DM, Schwartzman JD, Hayden GF, Donowitz LG. Changing the needle when inoculating blood cultures. A no-benefit and high-risk procedure. *JAMA* 1990;264:2111-2.

109. Spitalnic SJ, Woolard RH, Mermel LA. The significance of changing needles when inoculating blood cultures: a meta-analysis. Clin Infect Dis 1995;21:1103-6.
110. Washington JA, Ilstrup DM. Blood cultures: issues and controversies. Rev Infect Dis 1986;8:792-802.
111. Li J, Plorde JJ, Carlson LG. Effects of volume and periodicity on blood cultures. J Clin Microbiol 1994;32:2829-31.
112. Connell TG, Rele M, Cowley D, Buttery JP, Curtis N. How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital. Pediatrics 2007;119:891-6.
113. Mermel LA, Maki DG. Detection of bacteremia in adults: consequences of culturing an inadequate volume of blood. Ann Intern Med 1993;119:270-2.
114. Patel R, Vetter EA, Harmsen WS, Schleck CD, Fadel HJ, Cockerill FR, III. Optimized pathogen detection with 30- compared to 20-milliliter blood culture draws. J Clin Microbiol 2011;49:4047-51.
115. Kaditis AG, O'Marcaigh AS, Rhodes KH, Weaver AL, Henry NK. Yield of positive blood cultures in pediatric oncology patients by a new method of blood culture collection. Pediatr Infect Dis J 1996;15:615-20.
116. Gonsalves WI, Cornish N, Moore M, Chen A, Varman M. Effects of volume and site of blood draw on blood culture results. J Clin Microbiol 2009;47:3482-5.
117. Kellogg JA, Manzella JP, Bankert DA. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. J Clin Microbiol 2000;38:2181-5.
118. Mirrett S, Reller LB, Petti CA, Woods CW, Vazirani B, Sivadas R, et al. Controlled clinical comparison of BacT/ALERT standard aerobic medium with BACTEC standard aerobic medium for culturing blood. J Clin Microbiol 2003;41:2391-4.
119. Roh KH, Kim JY, Kim HN, Lee HJ, Sohn JW, Kim MJ, et al. Evaluation of BACTEC Plus aerobic and anaerobic blood culture bottles and BacT/Alert FAN aerobic and anaerobic blood culture bottles for the detection of bacteremia in ICU patients. Diagn Microbiol Infect Dis 2012;73:239-42.
120. Flayhart D, Borek AP, Wakefield T, Dick J, Carroll KC. Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. J Clin Microbiol 2007;45:816-21.
121. Miller NS, Rogan D, Orr BL, Whitney D. Comparison of BD Bactec Plus blood culture media to VersaTREK Redox blood culture media for detection of bacterial pathogens in simulated adult blood cultures containing therapeutic concentrations of antibiotics. J Clin Microbiol 2011;49:1624-7.
122. Ziegler R, Johnscher I, Martus P, Lenhardt D, Just HM. Controlled clinical laboratory comparison of two supplemented aerobic and anaerobic media used in automated blood culture systems to detect bloodstream infections. J Clin Microbiol 1998;36:657-61.
123. Wilson ML, Mirrett S, Meredith FT, Weinstein MP, Scotto V, Reller LB. Controlled clinical comparison of BACTEC plus anaerobic/F to standard anaerobic/F as the anaerobic companion bottle to plus aerobic/F medium for culturing blood from adults. J Clin Microbiol 2001;39:983-9.
124. Knepper JG, Anthony BF. Diminished growth of *Pseudomonas aeruginosa* in unvented blood-culture bottles. Lancet 1973;2:285-7.
125. Gantz NM, Medeiros AA, Swain JL, O'Brien TF. Vacuum blood-culture bottles inhibiting growth of *Candida* and fostering growth of *Bacteroides*. Lancet 1974;2:1174-6.

126. Mirrett S, Everts RJ, Reller LB. Controlled comparison of original vented aerobic fan medium with new nonvented BacT/ALERT FA medium for culturing blood. J Clin Microbiol 2001;39:2098-101.
127. Waites KB, Canupp KC. Evaluation of BacT/ALERT system for detection of *Mycoplasma hominis* in simulated blood cultures. J Clin Microbiol 2001;39:4328-31.
128. Eng J, Holten E. Gelatin neutralization of the inhibitory effect of sodium polyanethol sulfonate on *Neisseria meningitidis* in blood culture media. J Clin Microbiol 1977;6:1-3.
129. Davies S, Eggington R. Recovery of *Mycoplasma hominis* from blood culture media. Med Lab Sci 1991;48:110-3.
130. Courcol RJ, Durocher AV, Roussel-Delvallez M, Fruchart A, Martin GR. Routine evaluation of BACTEC NR-16A and NR-17A media. J Clin Microbiol 1988;26:1619-22.
131. Smith SM, Eng RH. Effectiveness of antibiotic removal by the antibiotic-binding blood culture systems. Diagn Microbiol Infect Dis 1985;3:201-12.
132. Wright AJ, Thompson RL, McLimans CA, Wilson WR, Washington JA. The antimicrobial removal device. A microbiological and clinical evaluation. Am J Clin Pathol 1982;78:173-7.
133. Jessamine PG, Hoban DJ, Forward KR. Positive Bactec resin cultures do not influence antimicrobial selection. Diagn Microbiol Infect Dis 1990;13:281-4.
134. Kim TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. Clin Microbiol Infect 2013;19:513-20.
135. Washington JA. Collection, transport, and processing of blood cultures. Clin Lab Med 1994;14:59-68.
136. Hawkins BL, Peterson EM, de la Maza LM. Improvement of positive blood culture detection by agitation. Diagn Microbiol Infect Dis 1986;5:207-13.
137. Prag J, Nir M, Jensen J, Arpi M. Should aerobic blood cultures be shaken intermittently or continuously? APMIS 1991;99:1078-82.
138. Yagupsky P, Peled N, Press J, Abramson O, Abu-Rashid M. Comparison of BACTEC 9240 Peds Plus medium and isolator 1.5 microbial tube for detection of *Brucella melitensis* from blood cultures. J Clin Microbiol 1997;35:1382-4.
139. Herne V, Nelovkov A, Kutt M, Ivanova M. Diagnostic performance and therapeutic impact of LightCycler SeptiFast assay in patients with suspected sepsis. Eur J Microbiol Immunol (Bp) 2013;3:68-76.
140. Sullivan KV, Turner NN, Roundtree SS, McGowan KL. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) using the KeyPath MRSA/MSSA blood culture test and the BacT/ALERT system in a pediatric population. Arch Pathol Lab Med 2013;137:1103-5.
141. Buchan BW, Ginocchio CC, Manii R, Cavagnolo R, Pancholi P, Swyers L, et al. Multiplex identification of gram-positive bacteria and resistance determinants directly from positive blood culture broths: evaluation of an automated microarray-based nucleic acid test. PLoS Med 2013;10:e1001478.
142. Martiny D, Debaugnies F, Gateff D, Gerard M, Aoun M, Martin C, et al. Impact of rapid microbial identification directly from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on patient management. Clin Microbiol Infect 2013;19:E568-E581.
143. Yossepowitch O, Dan M, Kutchinsky A, Gottesman T, Schwartz-Harari O. A cost-saving algorithm for rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* and susceptibility to oxacillin directly from positive blood

culture bottles by combined testing with BinaxNOW(R) *S. aureus* and Xpert MRSA/SA assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014.

144. Lagace-Wiens PR, Alfa MJ, Manickam K, Karlowsky JA. Thermostable DNase is superior to tube coagulase for direct detection of *Staphylococcus aureus* in positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2007;45:3478-9.
145. Qian Q, Eichelberger K, Kirby JE. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by use of the direct tube coagulase test. *J Clin Microbiol* 2007;45:2267-9.
146. Myrick BA, Ellner PD. Evaluation of the latex slide agglutination test for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1982;15:275-7.
147. Davies S, Gear JE, Mason CM, McIntyre SM, Hall L. Streptococcus grouping latex kits: evaluation of five commercially available examples. *Br J Biomed Sci* 2003;60:136-40.
148. McDonald CL, Chapin K. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture bottles by a classic 2-hour tube coagulase test. *J Clin Microbiol* 1995;33:50-2.
149. Enoch DA, Cooke FJ, Guha S, Brown NM. Thermostable nuclease: a study of clinical impact. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:754-5.
150. Speers DJ, Olma TR, Gilbert GL. Evaluation of four methods for rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood cultures. *J Clin Microbiol* 1998;36:1032-4.
151. Jin WY, Jang SJ, Lee MJ, Park G, Kim MJ, Kook JK, et al. Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:442-7.
152. Mittman SA, Huard RC, Della-Latta P, Whittier S. Comparison of BD Phoenix to Vitek 2, Microscan MICroSTREP, and Etest for antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2009;47:3557-61.
153. Carrara L, Navarro F, Turbau M, Seres M, Moran I, Quintana I, et al. Molecular diagnosis of bloodstream infections with a new dual priming oligonucleotide-based multiplex PCR assay. *J Med Microbiol* 2013.
154. Lyle N, Boyd J. The potential for PCR based testing to improve diagnosis and treatment of sepsis. *Curr Infect Dis Rep* 2013;15:372-9.
155. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem* 2011;44:104-9.
156. Klein S, Zimmermann S, Kohler C, Mischnik A, Alle W, Bode KA. Integration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in blood culture diagnostics: a fast and effective approach. *J Med Microbiol* 2012;61:323-31.
157. Wuppenhorst N, Consoir C, Lorch D, Schneider C. Direct identification of bacteria from charcoal-containing blood culture bottles using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012.
158. Dekker JP, Branda JA. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter* 2011;33:87-93.
159. Schmidt V, Jarosch A, Marz P, Sander C, Vacata V, Kalka-Moll W. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:311-7.

160. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2013.
161. Coyle MB, McGonagle LA, Plorde JJ, Clausen CR, Schoenknecht FD. Rapid antimicrobial susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation and early reading of disk diffusion tests. J Clin Microbiol 1984;20:473-7.
162. Mushtaq S, Warner M, Cloke J, Afzal-Shah M, Livermore DM. Performance of the Oxoid M.I.C.Evaluator Strips compared with the Etest assay and BSAC agar dilution. J Antimicrob Chemother 2010;65:1702-11.
163. NHS Quality Improvement Scotland. Blood Culture: Driver Diagram, Implementation Framework, Priority Elements Checklist, Data Measurement Tool and Measurement Plan Working Draft. 2011.
164. Harvey DJ, Albert S. Standardized definition of contamination and evidence-based target necessary for high-quality blood culture contamination rate audit. J Hosp Infect 2013;83:265-6.
165. Freeman JT, Chen LF, Sexton DJ, Anderson DJ. Blood culture contamination with Enterococci and skin organisms: implications for surveillance definitions of primary bloodstream infections. Am J Infect Control 2011;39:436-8.
166. Roth A, Wiklund AE, Palsson AS, Melander EZ, Wullt M, Cronqvist J, et al. Reducing blood culture contamination by a simple informational intervention. J Clin Microbiol 2010;48:4552-8.
167. European Parliament. UK Standards for Microbiology Investigations (SMIs) use the term "CE marked leak proof container" to describe containers bearing the CE marking used for the collection and transport of clinical specimens. The requirements for specimen containers are given in the EU *in vitro* Diagnostic Medical Devices Directive (98/79/EC Annex 1 B 2.1) which states: "The design must allow easy handling and, where necessary, reduce as far as possible contamination of, and leakage from, the device during use and, in the case of specimen receptacles, the risk of contamination of the specimen. The manufacturing processes must be appropriate for these purposes".
168. Official Journal of the European Communities. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. 7-12-1998. p. 1-37.
169. Klaerner HG, Eschenbach U, Kamereck K, Lehn N, Wagner H, Miethke T. Failure of an automated blood culture system to detect nonfermentative gram-negative bacteria. J Clin Microbiol 2000;38:1036-41.
170. Seegmuller I, Eschenbach U, Kamereck K, Miethke T. Sensitivity of the BacT/ALERT FA-medium for detection of *Pseudomonas aeruginosa* in pre-incubated blood cultures and its temperature-dependence. J Med Microbiol 2004;53:869-74.
171. Narasimhan SL, Weinstein AJ. Infective endocarditis due to a nutritionally deficient streptococcus. J Pediatr 1980;96:61-2.
172. McCarthy LR, Bottone EJ. Bacteremia and endocarditis caused by satelliting streptococci. Am J Clin Pathol 1974;61:585-91.
173. Casetta A, Derouin V, Boussougant Y. Absence of spontaneous autolysis of *Streptococcus pneumoniae* in aerobic fan culture bottles in a commercial blood culture system. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15:616-7.
174. Davis JC. A gram stain for smears of blood cultures, body fluids and tissues. Am J Med Technol 1976;42:417-23.

Ricerca con Emocoltura (per Microrganismi diversi da specie *Mycobacterium*)

175. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
176. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
177. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
178. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
179. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
180. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
181. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
182. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological Agents: Managing the Risks in Laboratories and Healthcare Premises. Appendix 1.2 Transport of Infectious Substances - Revision. Health and Safety Executive. 2008.
183. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. MMWR Surveill Summ 2012;61:1-102.
184. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed. HSE Books; 2002.
185. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
186. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
187. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
188. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
189. British Standards Institution (BSI). BS 5726:2005 - Microbiological safety cabinets. Information to be supplied by the purchaser and to the vendor and to the installer, and siting and use of cabinets. Recommendations and guidance. 24-3-2005. p. 1-14
190. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB, Jr., et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Clin Infect Dis 2013;57:e22-e121.
191. Kelly MT, Roberts FJ, Henry D, Geere I, Smith JA. Clinical comparison of isolator and BACTEC 660 resin media for blood culture. J Clin Microbiol 1990;28:1925-7.
192. Bosshard PP. Incubation of fungal cultures: how long is long enough? Mycoses 2011;54:e539-e545.

193. Morris AJ, Byrne TC, Madden JF, Reller LB. Duration of incubation of fungal cultures. J Clin Microbiol 1996;34:1583-5.
194. Bhatti S, Vilenski L, Tight R, Smego RA, Jr. Histoplasma endocarditis: clinical and mycologic features and outcomes. J Infect 2005;51:2-9.
195. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.
196. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
197. Lai CC, Wang CY, Liu WL, Huang YT, Liao CH, Hsueh PR. Time to positivity in blood cultures of staphylococci: clinical significance in bacteremia. J Infect 2011;62:249-51.