

Diagnosi infezioni del sangue

La presenza di batteri nel sangue si chiama batteriemia.

Le batteriemie possono essere classificate come **transitorie**, **intermittenti** e **continue**

Batteriemia transitoria (bassa carica) è tipicamente asintomatica e ha breve durata (pochi minuti o poche ore). E' un evento frequente e si verifica come conseguenza di un trauma della cute o di superfici mucose o può essere causata da una manipolazione chirurgica dei tessuti orali infetti, da caterizzazione del tratto urinario inferiore infetto, dall'incisione e dal drenaggio di un ascesso, dalla colonizzazione di presidi invasivi, in particolare cateteri venosi centrali e intracardiaci, cateteri uretrali, e presidi per stomie.

La batteriemia **intermittente** si verifica in seguito al rilascio periodico, da un focolaio infettivo, di batteri nel sangue a partire da ascessi extravascolari, cellulite disseminante o infezioni da cavità corporee, la peritonite o l'artrite settica.

La batteriemia **continua**, o **persistente**, insorge quando l'infezione è di natura intravascolare (endocardite infettiva, tromboflebiti suppurative e aneurismi). Inoltre, essa si verifica durante le prime fasi di infezioni sistemiche batteriche, come la brucellosi e la febbre tifoide.

La batteriemia rappresenta un fattore di rischio rilevante per indorgenza di infezioni batteriche gravi. Il rischio è lo sviluppo di sepsi, meningite, polmonite, osteomielite, artrite settica.

Ogni processo infettivo genera una risposta infiammatoria volta a controllarlo.
La risposta infiammatoria può rimanere circoscritta al sito di insorgenza dell'infezione, oppure evolvere verso un coinvolgimento sistemico dell'organismo.

Quando si ha coinvolgimento sistemico, insorge sindrome clinica denominata "sepsi"

La sepsi presuppone la presenza di un focolaio primitivo localizzato in qualsiasi parte dell'organismo (focolaio sepsigeno)

da cui i microrganismi, in attiva fase di replicazione, invadono il torrente circolatorio in gittate successive

La sepsi è quindi sempre associata alla batteriemia

l'invasione microbica della circolazione ematica non è essenziale per lo sviluppo della sepsi, poiché la risposta infiammatoria può essere scatenata anche dalla diffusione di tossine microbiche o di molecole citochine

Le infezioni sistemiche sono associate a tassi di morbilità e mortalità che vanno dal 20% al 70%



Sepsi: Stadi e definizioni

Infezione/ Trauma → SIRS → Sepsi → Sepsi Severa

SIRS = Risposta clinica a seguito di un insulto aspecifico, comprendente ≥2 di quanto segue:

- TC >38,3° o <36°
- FC >90 battiti/min
- FR >20/min
- $PaCO_2$ <32 mmHg
- GB >12x10^9/L, GB <4x10^9/L o >10% di forme immature

SIRS = Sindrome della Risposta Infiammatoria Sistemica

Sepsi = SIRS con segni di infezione presunta o confermata

Sepsi Severa = Sepsi con ≥1 segno di insufficienza d'organo



Alterata coscienza
Confusione
Psicosi

Tachipnea
PaO_2 <70mmHg
SaO_2 <90%
PaO_2/FiO_2 ≤ 300
Acidosi metabolica
inspiratoria

Ittero
↑ Enzimi
↓ Albumina
↑ PT

Tachicardia
Ipotensione
↑↓ CVP
↑↓ PAOP

Oliguria (diuresi <0,5mL/Kg/h a distanza di 2h da un'adeguata fluid resuscitation)
↑ Creatinina

↓ Piastrine
↑ PT/APTT
↓ Proteina C
↑ D-dimero

Bone e coll. Chest. 1992;101:1644 *modificata*

Emocultura: Scopo del test

• Diagnosi eziologica di batteriemia mediante coltura aerobica e anaerobica del sangue, con identificazione e test di sensibilità del/i microrganismo/i isolato/i.

• L'emocoltura deve essere eseguita per i casi con sospetta setticemia, endocardite e batteriemia secondaria a infezioni localizzate (polmonite, ascessi intraddominali, pielonefrite, protesi, meningite). In questo caso l'emocoltura può fornire una diagnosi eziologica dell'infezione localizzata.

Tipi di campioni • Sangue intero

Criteri di rigetto del campione

• Sangue raccolto in provette o flaconi diversi dai flaconi per emocoltura aerobia e anaerobia

• Se le informazioni sull'etichetta non corrispondono a quelle del modulo di richiesta

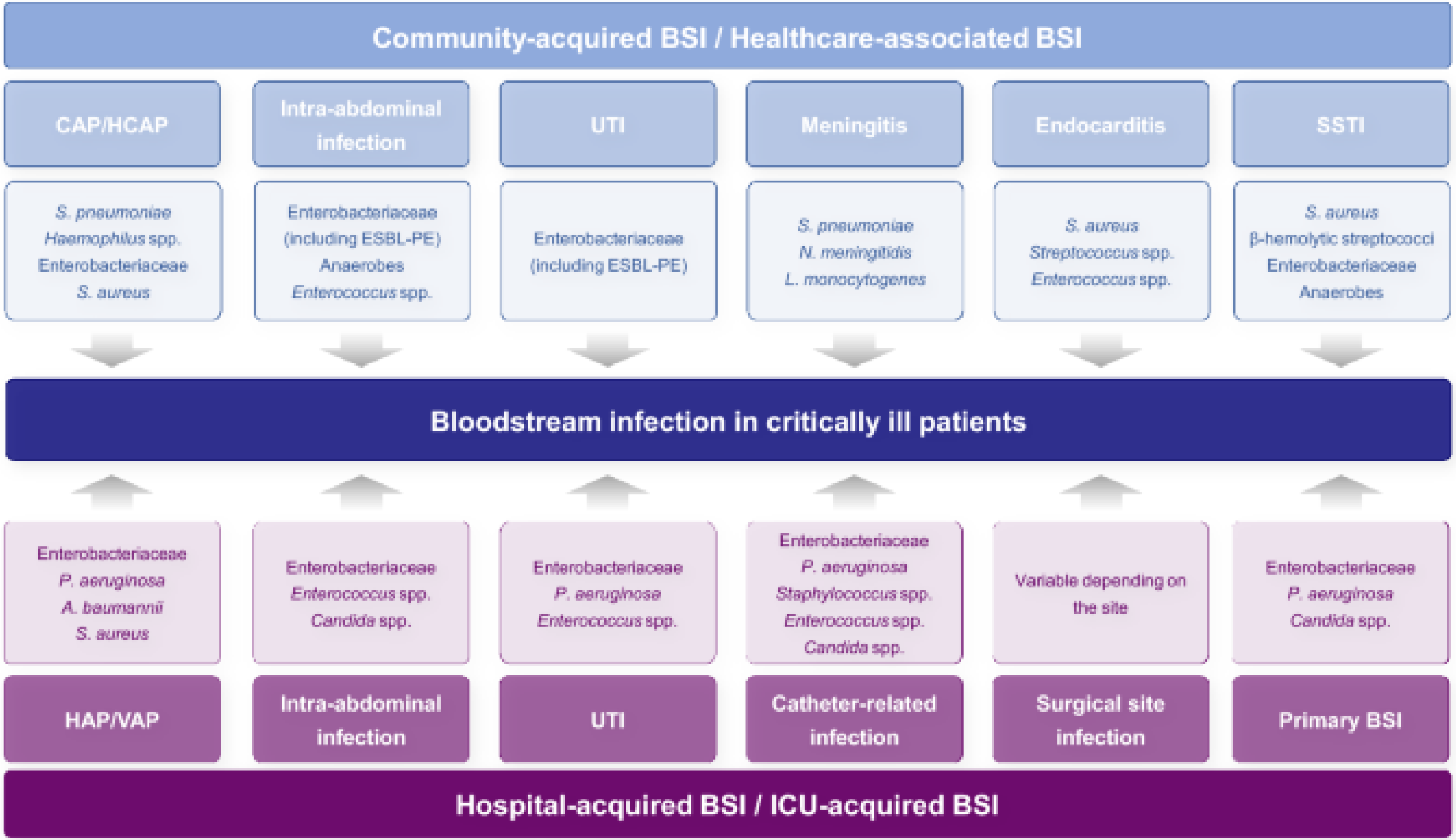
• Campioni per emocoltura anaerobia ricevuti in flaconi aerobi o viceversa.

Pathogen	2013 (*n*=484), *n* (%)	2014 (*n*=621), *n* (%)	2015 (*n*=411), *n* (%)	2016 (*n*=501), *n* (%)
Gram-negative isolates				
Enterobacteriaceae				
Enterobacter species	11 (2)	13 (2)	0	5 (1)
Escherichia coli	24 (5)	25 (4)	28 (7)	26 (5)
Klebsiella species	51 (11)	50 (8)	101 (25)	106 (21)
Proteus species	4 (0.8)	9 (1)	5 (1)	5 (1)
Providencia species	10 (2)	13 (2)	0	3 (0.6)
Salmonella species	6 (1)	6 (1)	0	13 (2.5)
Serratia species	13 (3)	35 (6)	0	35 (7)
Non-*Enterobacteriaceae*				
Acinetobacter species	97 (20)	132 (21)	122 (30)	135 (27)
Aeromonas species	1 (0.2)	0	0	0
Burkholderia species	19 (4)	162 (26)	9 (2)	25 (5)
Stenotrophomonas species	34 (7)	34 (6)	28 (7)	13 (2.5)
Pseudomonas aeruginosa	87 (18)	30 (5)	40 (8)	38 (8)
Other Gram-negative bacteria[#]	19 (4)	19 (3)	0	5 (1)
Gram-positive isolates				
Enterococcus species	34 (7)	26 (4)	28 (7)	37 (7)
Staphylococcus species	74 (15)	67 (11)	50 (12)	54 (11)
Streptococcus species	0	0	0	1 (0.2)

[#] *Morganella* species, *Pantoea* species, *Achromobacter* species, *Chryseobacterium* species, *Elizabethkingia* species, *Ralstonia pickettii*, *Sphingomonas paucimobilis*

Table 1: Frequencies of bacterial species isolated from blood cultures of pediatric patients

Organism Gram Positive	**No. of Isolates**	**% of isolates**
Staphylococcus aureus	45	29.03
Coagulase Negative Staphylococcus	44	28.39
Enterococcus	5	3.23
Streptococcus pneumoniae	2	1.29
Organism Gram Negative	**No. of Isolates**	**% of isolates**
Escherichia coli	15	9.68
Pseudomonas species	6	3.89
Klebsiella species	23	14.83
Acinetobacter species	12	9.74
Citrobacter species	2	1.29


Community-acquired BSI / Healthcare-associated BSI
CAP/HCAP
Intra-abdominal infection
UTI
Meningitis
Endocarditis
SSTI
S. pneumoniae
Haemophilus spp.
Enterobacteriaceae
S. aureus
Enterobacteriaceae (including ESBL-PE)
Anaerobes
Enterococcus spp.
Enterobacteriaceae (including ESBL-PE)
S. pneumoniae
N. meningitidis
L. monocytogenes
S. aureus
Streptococcus spp.
Enterococcus spp.
S. aureus
β-hemolytic streptococci
Enterobacteriaceae
Anaerobes
Bloodstream infection in critically ill patients
Enterobacteriaceae
P. aeruginosa
A. baumannii
S. aureus
Enterobacteriaceae
Enterococcus spp.
Candida spp.
Enterobacteriaceae
P. aeruginosa
Enterococcus spp.
Enterobacteriaceae
P. aeruginosa
Staphylococcus spp.
Enterococcus spp.
Candida spp.
Variable depending on the site
Enterobacteriaceae
P. aeruginosa
Candida spp.
HAP/VAP
Intra-abdominal infection
UTI
Catheter-related infection
Surgical site infection
Primary BSI
Hospital-acquired BSI / ICU-acquired BSI

Tipi di batteriemia

- La batteriemia può essere transitoria, continua o intermittente.

- Le due principali categorie di infezioni sono

intravascolari : quelle che hanno origine all'interno del sistema cardiovascolare

extravascolari quelle che dipendono da batteri che entrano nella circolazione sanguigna attraverso il sistema linfatico da un altro sito di infezione

Raccolta dei campioni

• I campioni per emocoltura devono essere raccolti prima dell'inizio della terapia antimicrobica, se viene ordinata più di una coltura, i campioni devono essere prelevati separatamente a non meno di 30 minuti di distanza per escludere la possibilità di batteriemia transitoria dovuta ad azione del paziente che si gratta

• Il numero di batteri è generalmente più alto nella fase iniziale acuta che nella fase successiva della malattia, i bambini piccoli di solito hanno un numero più elevato di batteri nel sangue rispetto agli adulti. La batteriemia è maggiore quando si ha anche il rialzo febbrile (cala al calare della febbre)

• Per i pazienti da cui ci si attende disseminazione intermittente, l'80% di questi viene rilevato con la prima coltura e il 99% all'interno delle tre colture

Tempo di raccolta

- Prima di iniziare la terapia antibiotica
- se il tempo lo consente, in genere si consiglia di prelevare i primi due set di emocolture a distanza di un'ora e il terzo dopo 3-6 ore.

La consuetudine di far trascorrere 30-60 minuti da un prelievo e l'altro è arbitraria; se c'è bisogno di iniziare la terapia empirica **i prelievi possono essere effettuati anche a distanza di 5-10 minuti**.
Alcuni autori propongono, quando via sia la necessità clinica di iniziare la terapia antibiotica, la strategia "**single-sampling strategy**", ovvero prelevare l'intero volume di sangue da un singolo prelievo e suddividerlo in 4-6 flaconi.
Questa tecnica permette di ridurre il numero di prelievi, limitare il carico di lavoro, ridurre il **rischio biologico per gli operatori** e ridurre il disagio per i pazienti.
Solo in caso di endocardite è preferibile effettuare i prelievi a distanza di 30-60 minuti (per documentare la batteriemia continua). Trascorse le prime 24h, se i primi due-tre set risultano negativi, ripetere la campionatura.

- Attenzione al picco febbrile

Raccolta di sangue per l'emocoltura

Durante la raccolta del campione, è necessario al minimo la possibilità di contaminazione.

Per ridurre la possibilità di contaminare con gli organismi presenti sulla pelle, il sito di entrata dell’ago dovrebbe idealmente essere preparato come segue:

- Lavare con sapone, risciacquare con acqua sterile o soluzione salina
- Applicare l'1-2% di tintura di iodio o povidone-iodio e lasciare asciugare per 1-2 minuti
- Rimuovere lo iodio con lavaggio con alcool al 70%, se il sito viene nuovamente palpato dopo la preparazione con iodio e alcool, il dito deve essere disinfettato o devono essere indossati guanti sterili
- Un laccio emostatico viene applicato alla parte superiore del braccio sopra il sito di puntura della vena


ARN004SH
BacT/ALERT® FA Plus
Aerobic
BIOMÉRIEUX, INC.
IVD
NRGTGDBH
BacT/ALERT
BIOMÉRIEUX, INC.

Il volume di sangue da prelevare nel paziente adulto

Insieme all'antisepsi cutanea, il volume di sangue messo in coltura è la variabile più importante per migliorare la sensibilità del prelievo.

La densità microbica nel sangue è molto bassa nella maggior parte dei pazienti con infezione del sangue.

Utilizzando un modello teorico si è stimato che la concentrazione batterica media per paziente con infezione del flusso sanguigno è di 0,25 UFC/ml. Perché il campione possa risultare positivo occorrono almeno 3 UFC. Per questo le linee guida raccomandano di prelevare, in totale, almeno 20-30 ml di sangue.

Il volume di sangue da prelevare nei neonati e bambini

Pochi studi affrontano l'argomento. I criteri fanno riferimento al volume totale del sangue in relazione al peso del paziente e al risultato dell'ematocrito. É stato suggerito che il volume di sangue da prelevare nell'arco delle 24 ore non debba superare l'1-4,5% del volume totale del sangue.

Quanti flaconi per emocoltura devono essere raccolti ?

È stato osservato che il rendimento cumulativo di patogeni da tre set di emocolture (2 flaconi per set), con un volume di sangue di 20 ml in ciascun set (10 ml per flacone), era del 73,1% con il primo set, 89,7% con i primi due set e il 98,3% con i primi tre set.

Effettuare un quarto set di emocolture non è indicato, perché la sensibilità del campione aumenta solo del 7% rispetto ai costi ed ai rischi di anemizzazione.

La scelta di prelevare 2-3 set facilita l'interpretazione dei risultati in caso di germi di dubbio significato clinico (es. microrganismi normalmente contaminanti).

Non effettuare mai un solo prelievo nell'adulto: il volume di sangue è insufficiente e potrebbe dare risultati falsamente negativi oppure, in caso di positività, può essere difficile stabile se il microrganismo sia un patogeno o un contaminante.

Raccolta del sangue per la coltura

- Rimuovere i tappi a scatto dalle parti superiori dei flaconi di coltura selezionati. Disinfettare i setti delle bottiglie con alcol o preparato a base di iodio e lasciare asciugare.
- Eseguire la venipuntura con la siringa e raccogliere la quantità di sangue desiderata. Se la vena viene persa, deve essere utilizzato un nuovo ago.
- Trasferire la quantità di sangue consigliata nei flaconi di coltura utilizzando una tecnica asettica, se lo si desidera. Per prima cosa riempi la bottiglia aerobica. Non riempire eccessivamente le bottiglie! L'eventuale sangue rimanente può essere utilizzato per ulteriori test.
- Etichettare i flaconi secondo la procedura di routine. Quando si utilizza un adesivo, non coprire la sezione a strappo dell'etichetta con codice a barre.

Nota: il rapporto sangue/brodo da 1:5 a 1:10 è il rapporto appropriato da ottenere, questa diluizione riduce al minimo gli effetti degli inibitori microbici presenti nel sangue e diluisce eventuali agenti antimicrobici.

Con quale sequenza devono essere riempiti i flaconi di emocoltura?

- È pratica comune che il prelievo di sangue serva a riempire almeno due flaconi per set, uno per la ricerca di microrganismi aerobi e uno per la ricerca di microrganismi anaerobi. È necessario che nel flacone per anaerobi non venga immessa dell'aria.
- Se si sceglie di utilizzare per la raccolta del sangue direttamente nei flaconi (es. vacutainer®) è necessario prima riempire il flacone per aerobi e poi quello per anaerobi (per evitare che l'aria presente nel raccordo venga introdotta nel campione).
- Se si sceglie di prelevare il campione con siringa e ago è necessario che il primo flacone da riempire sia quello per anaerobi (per evitare che l'aria presente nella siringa venga introdotta nel campione per anaerobi).

Processamento del campione

- Il flacone è stato incubato per 24 ore prima della piastratura per migliorare la crescita dei batteri, la piastra del flacone aerobico su agar sangue, MacConkey e il cioccolato nell'incubatore a CO2 per 24 ore, l'incubazione anaerobica anaerobica su agar sangue per 48 ore e il flacone negativo devono essere reincubate e testate dopo 10 giorni prima di essere eliminate come coltura negativa.

- Se si sospettano microrganismi a crescita lenta come Brucella spp. deve essere chiaramente indicato sul modulo di richiesta e le bottiglie di coltura devono essere ulteriormente incubate per 2-4 settimane prima di essere dichiarate negative.

Esempi di ingredienti dei Terreni di coltura contenuti nelle bottiglie

- Brodo di soia tritico (TSB)
- Digerito pancreatico di caseina.
- Digerito enzimatico di soia.
- Cloruro di sodio.
- Fosfato dipotassico.
- Destrosio.
- Sodio polianetolsolfonato (SPS)
- Mezzo fluido tioglicolato (FTM)
- Tioglicolato di sodio

- L'anticoagulante nel terreno di emocoltura non deve danneggiare i batteri e deve impedire la coagulazione del sangue, che intrappola i batteri e ne impedisce il rilevamento.
- La preparazione più comunemente usata nei mezzi di sangue è da 0,025% a 0,05% SPS.
- Oltre alle sue proprietà anticoagulanti, SPS è anche anticomplementare, antifagocitico e interferisce con l'attività di alcuni agenti antimicrobici. (SPS)

Elaborazione successiva al campione

Fattori di interferenza

- Paziente in terapia antibiotica Refertazione dei risultati Eventuali microrganismi isolati verranno refertati. La sensibilità agli antibiotici sarà inclusa nel rapporto.
- I risultati iniziali dell'emocoltura verranno riportati non appena si vede crescita.
- I risultati finali con sensibilità verranno emessi dopo 24-48 ore dal rapporto iniziale
- I risultati negativi verranno emessi dopo 10 giorni dall'invio della coltura.

Interpretazione delle emocolture positive

- Praticamente qualsiasi organismo, inclusa la flora normale, può causare batteriemia.
- Un risultato negativo della coltura non esclude necessariamente la batteriemia; risultati falsi negativi si verificano quando i patogeni non riescono a crescere.
- Un risultato positivo della coltura non indica necessariamente una batteriemia; risultati falsi positivi si verificano quando i contaminanti crescono.
- I bacilli Gram-negativi, gli anaerobi ei funghi devono essere considerati patogeni fino a prova contraria.
- Il problema di interpretazione più difficile è determinare se un organismo che di solito è considerato normale flora cutanea sia un vero patogeno.

Limitazioni

• Di solito sono sufficienti tre serie negative di emocolture in assenza di terapia antimicrobica per escludere la presenza di batteriemia.

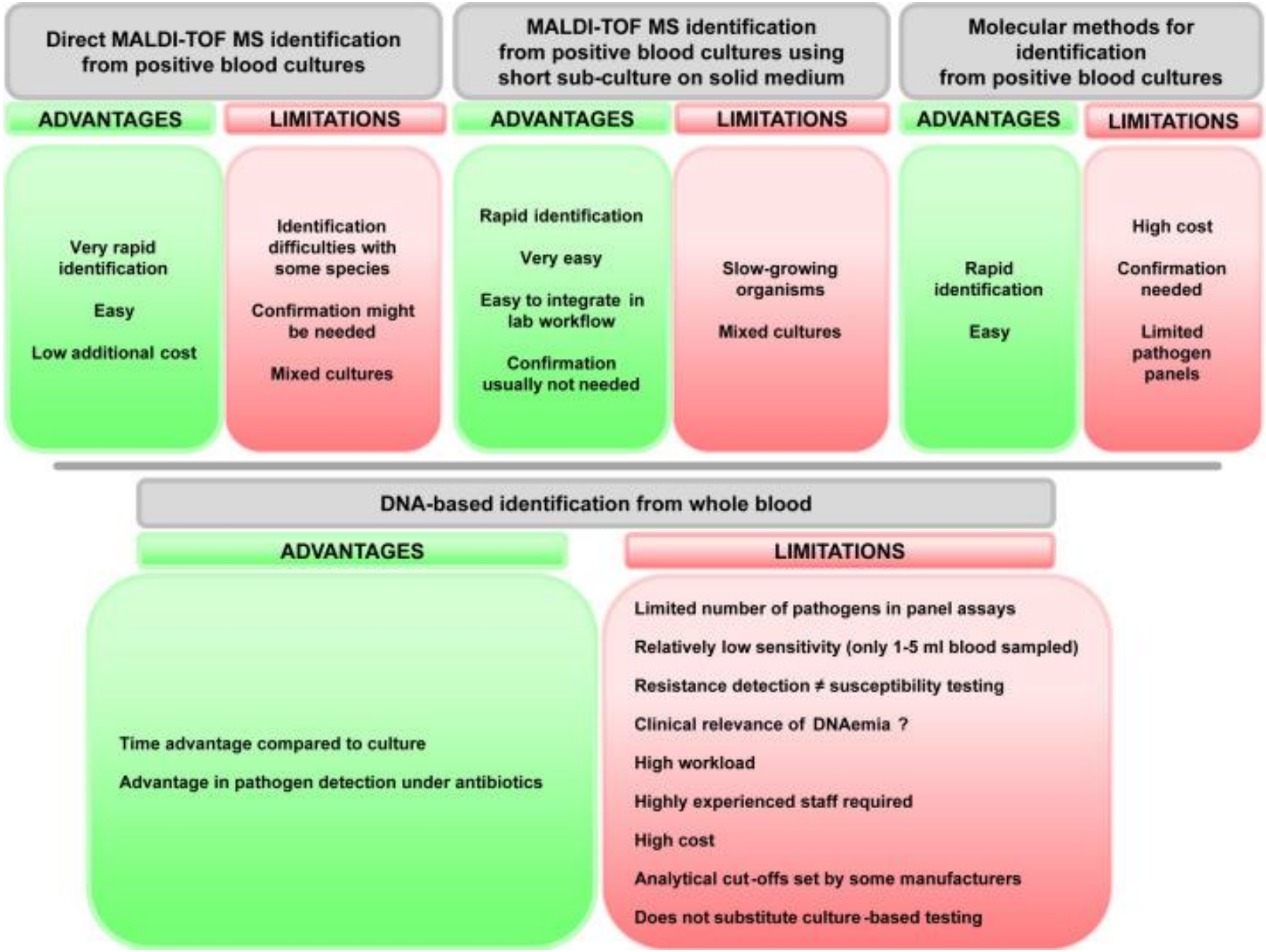
• Un set raramente è sufficiente.

• Una precedente terapia antibiotica può causare emocolture negative o crescita ritardata.

• Le emocolture di pazienti sospettati di avere Brucella o Leptospira devono essere richieste come colture speciali. Si raccomanda la consultazione con il laboratorio per le procedure di coltura speciali per il recupero di questi microrganismi prima della raccolta del campione.

• I lieviti sono spesso isolati da emocolture di routine. Tuttavia, se si sospetta in modo specifico lievito o altri funghi, è necessario prelevare un'emocoltura fungina separata insieme a ciascuno dei campioni di emocoltura di routine.

• Il Mycobacterium avium complex (MAC) viene spesso recuperato dal sangue di pazienti immunocompromessi, in particolare quelli con sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Sono necessarie procedure speciali per il recupero di questi microrganismi.


Direct MALDI-TOF MS identification from positive blood cultures
ADVANTAGES
Very rapid identification
Easy
Low additional cost
LIMITATIONS
Identification difficulties with some species
Confirmation might be needed
Mixed cultures
MALDI-TOF MS identification from positive blood cultures using short sub-culture on solid medium
ADVANTAGES
Rapid identification
Very easy
Easy to integrate in lab workflow
Confirmation usually not needed
LIMITATIONS
Slow-growing organisms
Mixed cultures
Molecular methods for identification from positive blood cultures
ADVANTAGES
Rapid identification
Easy
LIMITATIONS
High cost
Confirmation needed
Limited pathogen panels
DNA-based identification from whole blood
ADVANTAGES
Time advantage compared to culture
Advantage in pathogen detection under antibiotics
LIMITATIONS
Limited number of pathogens in panel assays
Relatively low sensitivity (only 1-5 ml blood sampled)
Resistance detection ≠ susceptibility testing
Clinical relevance of DNAemia ?
High workload
Highly experienced staff required
High cost
Analytical cut-offs set by some manufacturers
Does not substitute culture-based testing

Sistema BD BACTEC™ 9000



LO STRUMENTO : CARATTERISTICHE TECNICHE

Il Sistema BD BACTEC™ 9000 / F, con tecnologia di rilevazione in Fluorescenza, per l'esame delle Emocolture, e' costituito da un modulo strumentale completamente automatico, con le caratteristiche combinate di :

Incubatore
Agitatore
Lettore

La incubazione continua dei Flaconi in esame è consentita da una struttura a stazioni termostatata (a 35 °C +/- 1.5), nella quale le stazioni sono disposte in file orizzontali di 20 all'interno di rack indipendenti da 40 stazioni ciascuno

L'agitazione programmata e' legata al movimento degli stessi rack.

I campioni sono mantenuti in agitazione da un sistema meccanico di inclinazione (da orizzontale a 20°).
Ogni rack effettua 30 movimenti completi al minuto.

La lettura in continuo, per la quale ogni Flacone risulta letto ogni 10 minuti, è legata ad un meccanismo su base ottica che sfrutta la produzione di CO2 del metabolismo batterico

Lo Strumento ha un software dati.

La informazione sulla situazione dei Flaconi all'interno dello Strumento è continua e avviene attraverso la visualizzazione a monitor dello schema dei rack con i vari numeri di stazione e lo stato dei relativi Flaconi

La segnalazione dei Flaconi Positivi e' immediata e avviene attraverso segnali ottici e acustici
Il Sistema presenta meccanismi di controllo del corretto svolgersi dell'esame con segnalazioni specifiche nel caso di errori dell'utente, situazioni ambientali sfavorevoli o alterazioni di altro genere

LA TECNOLOGIA DI LETTURA

La rilevazione della crescita batterica in fase liquida avviene mediante un metodo fluorimetrico.
Il sensore, posto sul fondo del Flacone e incorporato in una matrice solida protettiva, contiene composti fluorescenti che reagiscono in presenza di CO_2. Tale matrice solida consente la diffusione selettiva della CO2 dal brodo di coltura
Con un diodo ad emissione luminosa, un rivelatore di fotodiodi e filtri adeguati, il BD BACTEC™ 9000 misura la fluorescenza proveniente dal sensore fluorimetrico

La luce che colpisce il rilevatore è solo quella proveniente dalla fluorescenza del sensore e non quella riflessa da altre superfici.

La tecnologia della fluorescenza nel Sistema BD BACTEC™ 9000, utilizzando un segnale ad emissione di fondo molto bassa, consente al Computer di gestione la costruzione di curve di crescita molto precise e quindi l'applicazione di sofisticati parametri di positività per determinare le condizioni di crescita dei microorganismi in tempi abbreviati.

MECCANISMI DI CONTROLLO DI QUALITA'

Il Software di gestione controlla continuamente e contemporaneamente la performance elettrica ed ottica di tutte le stazioni

Tale funzione BIT verifica l'attività di ogni stazione ogni 10 minuti

Il controllo si basa sull'accertamento che l'emissione del segnale per ogni stazione si mantenga entro i limiti predeterminati ; cio' include sia le stazioni vuote che le stazioni con i Flaconi in protocollo

La funzione BIT verifica inoltre che tutti i rack comunichino correttamente con il Computer

I Flaconi BD BACTEC™ , nelle varie tipologie :

•sono pronti all’uso e non richiedono alcuna ricostituzione, diluizione o altri trattamenti

•Si conservano a 2 - 25 °C e senza precauzioni particolari

•sono dotati di etichetta e codice a barre identificativi

•riportano sull’etichetta il quantitativo di sangue da inoculare

•contengono brodo di crescita nella formulazione e nel quantitativo specifico e adeguato al tipo di ricerca (Flaconi e terreno per Aerobi, Anaerobi, Miceti, Micobatteri)

Il volume di inoculo :

•per i Flaconi non Pediatrici e’ 3 - 10 ml

•per i Flaconi Pediatrici e’ 0.1 - 3 ml

Dopo il prelievo, entro limiti di tempo possibilmente non superiori alle 48 ore (ritardo consentito dalle specifiche funzioni kDVE e comunque il prima possibile, i Flaconi BD BACTEC™ possono essere inseriti nello Strumento per il loro monitoraggio in continuo, secondo il protocollo di lavoro piu’ adeguato

L’inserimento del Flacone avviene mediante identificazione con Codice a barre. Lo Strumento segnala automaticamente il posizionamento del campione da introdurre. I campioni possono essere inseriti in ogni momento della giornata (Random access)

Il Sistema segnala costantemente i campioni ancora negativi e in lettura, i campioni negativi definitivi e i campioni positivi.
Il Flacone del campione positivo viene tolto dallo Strumento per l'effettuazione degli esami batteriologici appropriati e puo'essere eventualmente reinserito per ulteriori verifiche senza alcun pregiudizio per la curva di crescita batterica precedentemente determinata.

Dal Flacone positivo possono essere effettuati vetrini e sottocolture senza difficoltà e controindicazioni.

L'allestimento di vetrini facilmente leggibili non è ostacolata da alcuno dei componenti il brodo di crescita
Per facilitare la sottocoltura, senza rischi operativi, è disponibile un sistema con cappuccio protettivo e ago tronco
Nel caso di esami batterioscopici e/o colturali negativi, il Flacone può essere reinserito nello Strumento per ulteriori verifiche.
Una particolare funzione di Re-Entry consente , entro 3 ore, di reinserire il Flacone nella medesima Stazione a dare continuita' alla curva di crescita in corso.

Il Sistema BD BACTEC™ 9000 / F comprende una ampia gamma di Flaconi, valida per soddisfare , nel modo ottimale, tutte le esigenze cliniche

Tale gamma comprende :

Flaconi per Aerobi	con Resine / vers.KDVE BACTEC Plus / F Aerobi
Flaconi per Anaerobi	con Resine / vers. KDVE BACTEC Plus / F Anaerobi
Flaconi Pediatrici	con Resine BACTEC Peds Plus / F
Flaconi per Miceti	BACTEC Mycosis-IC/F
Flaconi per Micobatteri	BACTEC Myco / F Lytic

La versione dei Flaconi con resine KDVE (Kinetic Delayed Vial Entry)
si adatta alle situazioni in cui l'invio dei Flaconi in Laboratorio raggiunge ritardi fino a 48 ore.
Sono cosi'in gradodi supportare, senza controindicazioni, ritardi nell'ordine delle 24-48 ore (48 ore se conservati a T.A.)
I Flaconi Pediatrici sono Flaconi Aerobi con Resine adatti a prelievi di tipo pediatrico
I Flaconi per Miceti sono formulati per ottimizzare il rilevamento dei Miceti rispetto ai normali Flaconi Aerobi
I Flaconi per Micobatteri consentono di effettuare l'emocoltura dei Micobatteri direttamente su sangue intero

LE RESINE

Flaconi BD BACTEC™ Aerobi e Anaerobi, , nonché' i Flaconi Pediatrici, contengono **Resine cationiche** e non ioniche per l'assorbimento degli Antibiotici eventualmente presenti nel campione e consentono quindi la eliminazione del loro effetto inibitore nella crescita dei microorganismi presenti.

I risultati di numerosi studi clinici effettuati dimostrano che questi terreni aumentano significativamente l'isolamento di microorganismi, particolarmente in pazienti sottoposti a terapia, diminuendo il rischio di falsi negativi.

E' da sottolineare l'effetto negativo, sia in termini di salute del paziente, sia in termini di spreco di risorse dovuto ad una piu' lunga spedalizzazione, legato ad una Emocoltura dal risultato falsamente negativo

Le stesse Resine, inoltre, non interferiscono in alcun modo nella preparazione e nella qualita' dei vetrini allestiti da Flaconi positivi

Ogni Unità operativa il il suo protocollo approvato e revisionato periodicamente: vediamo un esempio

MODALITÀ OPERATIVE

1) A CHI ESEGUIRE UNA EMOCOLTURA

L'emocoltura deve essere eseguita solo in risposta a un bisogno clinico, nei pazienti con una sospetta batteriemia, mentre l'esecuzione di emocolture di routine è generalmente sconsigliata.
Vi sono numerosi segni e sintomi che possono suggerire una batteriemia, i quali andranno sempre integrati all'interno di un giudizio clinico complessivo.
Nell'identificazione del paziente con sospetta batteriemia/fungemia per il quale è indicata l'esecuzione di una emocoltura, accanto alla febbre e al brivido devono essere presi in considerazione altri parametri, fra i quali:

- segni focali di infezione;
- anomalie della frequenza cardiaca (aumentata), della pressione arteriosa (ridotta o aumentata) o della frequenza respiratoria (aumentata);
- numero di leucociti (aumentati o ridotti) e altri marcatori biologici di infiammazione quali Proteina C Reattiva, lattati e procalcitonina (PCT);
- comparsa di confusione mentale.

La febbre non è assolutamente un fattore determinante di per sé, poiché alcuni pazienti possono essere normo o ipotermici anche nella fase batteriemica[(6)].

Va sempre tenuto presente però che i segni di sepsi possono essere minimi o assenti nei bambini molto piccoli e nei pazienti anziani[(4)].

2) MOMENTO IN CUI ESEGUIRE IL PRELIEVO

Sulla scelta del momento più adatto in cui eseguire il prelievo, al fine di ottimizzare la probabilità di isolare dei patogeni dal sangue, le indicazioni sperimentali in letteratura sono limitate.

E' stato comunque dimostrato che la pratica di eseguire una emocoltura alla comparsa del brivido e del rialzo termico rapido non incrementa il tasso di positività dell'esame[7], dato giustificato dall'osservazione che, dopo l'ingresso dei batteri in circolo, vi è una latenza di circa un'ora prima della comparsa di brivido o febbre[8].

Anche la pratica, comune, di ottenere campioni di sangue per emocoltura a intervalli di 30-60 minuti non è supportata dall'evidenza, poiché non sono state osservate differenze in termini di capacità di isolamento microbiologico se tutti i campioni vengono prelevati contemporaneamente o a intervalli prestabiliti nell'arco delle 24 ore[9].

Per queste ragioni, la maggior parte delle linee guida esistenti raccomanda l'esecuzione di tutte le emocolture simultaneamente o entro un breve intervallo di tempo [5, 6, 10].

Fanno eccezione i pazienti con sospetta endocardite batterica subacuta o altre infezioni endovascolari (ad es. infezioni del CVC), nei quali l'esecuzione a intervalli regolari di emocolture per un periodo di 24 ore (eventualmente ripetuto in caso di negatività) può essere utile per documentare una batteriemia continua [5, 6].

In ogni caso, tutte le raccomandazioni concordano nel fatto che l'emocoltura vada eseguita prima dell'inizio della terapia antibiotica empirica: il mancato isolamento nelle colture può avvenire entro minuti oppure ore dopo la prima dose di antibiotico. Diversi studi retrospettivi suggeriscono che l'ottenimento di emocolture prima dell'inizio del trattamento antibiotico è associato a un migliore esito dei pazienti[10].

3) NUMERO DI CAMPIONI E VOLUME DI SANGUE DA PRELEVARE

Più importante della tempistica, ai fini dell'isolamento di germi patogeni, è stato dimostrato essere il **volume di sangue prelevato**, che appare la variabile maggiormente determinante in numerosi studi condotti in pazienti adulti con batteriemia e fungemia.

E' stato dimostrato [11] che l'incremento da 20 ml a 40 ml del volume di sangue posto in coltura, aumenta la resa diagnostica del 20%, mentre l'incremento da 40 a 60 ml porta un ulteriore aumento del 10%, indipendentemente dalle modalità di raccolta del campione (simultanea o con prelievi seriali entro 24 ore).

Generalmente, negli adulti con sospetta batteriemia viene raccomandato di eseguire da un minimo di 2 a un massimo di 3 o 4 set (4-6-8 flaconi) a intervalli ravvicinati. L'esecuzione di un solo set nei pazienti adulti è fortemente sconsigliata a causa dell'insufficienza del volume di sangue analizzato, con conseguente aumento dei risultati falsi negativi e difficoltà nell'identificazione dei falsi positivi.

Le linee guida esistenti raccomandano il prelievo di 20-30 ml di sangue per ogni set.
Ogni set si compone di:

- **1 FLACONE BACTEC AEROBIC (TAPPO GRIGIO)**
- **1 FLACONE BACTEC ANAEROBIC (TAPPO ARANCIO)**

in aggiunta su richiesta

- **1 FLACONE BACTEC MYCOSIS (TAPPO VERDE) PER MICETI**

Nei pazienti con sospetta fungemia per la ricerca di miceti/funghi utilizzare il flacone specifico solo su indicazione del medico da raccogliere con il 1° prelievo.

Per la ricerca di micobatteri eseguire la raccolta di numero 3 flaconi (30 ml di sangue)**:**

BACTEC MYCO/F LYTIC (TAPPO ROSSO SCURO) PER RICERCA MICOBATTERI TUBERCOLARI.

4) SEDE DI PRELIEVO

Il prelievo da **sangue venoso periferico**, compatibilmente con le condizioni cliniche, rimane comunque il *gold standard* per l'esecuzione corretta di emocolture.

Il prelievo per emocoltura dovrebbe essere effettuato da sangue venoso poiché l'utilizzo di sangue arterioso non aggiunge niente alla sensibilità dell'esame [5, 6]. In mancanza di un accesso venoso periferico adeguato, è possibile utilizzare sangue arterioso che non presenta svantaggi dimostrati rispetto a quello venoso in termini di contaminazione e sensibilità.

Nei pazienti portatori di catetere venoso centrale, le linee guida indicano unanimemente che questi **non dovrebbero essere utilizzati per prelevare il sangue**, tranne che in pazienti nei quali si sospetti una infezione associata al catetere stesso (*catheter related bloodstream infection*, CR-BSI): in questo caso devono essere eseguiti un prelievo periferico e uno da catetere in parallelo e un ulteriore prelievo da vena periferica [5, 6]. Tuttavia non sempre è possibile accedere a una vena periferica e pertanto si deve ricorrere al prelievo da CVC anche al di fuori delle sospette CR-BSI.
Non prelevare da cateteri venosi periferici (aghi cannula o midline) già in sede.

Il prelievo non va eseguito da linee/cannule già presenti e possibilmente va scelto un sito di venipuntura che non sia stato utilizzato in precedenza.
Non è raccomandato utilizzare un agocannula anche se è stato posizionato al momento.

5) ACCETTAZIONE DELL'ESAME SU *DNWEB*

I programmi gestionali del LIS di Laboratorio, *DnWEB*, DnTerritotio, *PsWEB* e il programma PHI permettono di richiedere gli esami in regime sia di ***Routine*** sia di **Emergenza**, generando in automatico una **ID Richiesta**, di effettuare la stampa delle etichette di prelievo e di stampare direttamente in reparto i referti validati dal laboratorio.

- Selezionare le richieste di Test presenti nel *Software* DN-Web nella pagina web dedicata alla Microbiologia.
- Selezionare la voce Emocoltura che comprende un set di prelievo aerobio e anaerobio, **il sistema richiede l'ora e i minuti del prelievo.**
- Se vengono effettuati prelievi per la ricerca di miceti o micobatteri, selezionare rispettivamente la voce Emocoltura per miceti oppure Emocoltura per micobatteri.
- Aggiungere le note, come ad esempio: antibioticoterapia se in atto, oppure raccolta di sangue da una unica sede di prelievo, prelievo da vena periferica, prelievo da CVC ecc.
- Salvare la richiesta
- "Riprendere" la richiesta per trasferirla in modo che possa essere presa in carico dal LIS di Laboratorio DnLab.
- Stampare l'etichetta di accettazione e apporla sul contenitore del campione biologico da esaminare
- **Ripetere l'accettazione per ogni set da prelevare.**

PRELIEVO DA VENA PERIFERICA NELL'ADULTO

Materiale occorrente:

Eseguire un'azione di igiene delle mani con gel idroalcolico prima di preparare il materiale necessario:

- DPI: visiera oppure occhiali, mascherina chirurgica, guanti (l'uso dei guanti sterili è necessario solo se si deve palpare di nuovo la cute dopo aver eseguito l'antisepsi. Si possono usare guanti non sterili avendo cura di utilizzare la tecnica No-Touch, ANTT).
- Soluzione antisettica **Clorexidina soluzione alcolica al 2% per cute con applicatore ml.1,5**
- Soluzione disinfettante **Clorexidina soluzione alcolica al 2% per dispositivi medici per trattamento elastomeri** dei flaconi per emocoltura**.**
- Confezione di compresse in TNT sterili per disinfezione degli elastomeri dei flaconi.
- Confezione di compresse in TNT sterili per tamponare la sede di prelievo.
- Laccio emostatico.
- 2-3 set per emocoltura ogni set è composta da: **Aerobio (tappo colore grigio), Anaerobio (tappo colore arancione)** ed eventuale flacone per miceti se prescritto (**tappo colore** verde).
- Contenitore a parete rigida per lo smaltimento di aghi.
- 2-3 Aghi a farfalla con sistema di sicurezza *SAFETY LOCK* e con connettore *vacutainer*.
- 2-3 camicie vacutainer.
- Cerotti medicati.

PROCEDURA di prelievo

Individuare un piano d'appoggio utilizzabile, pulito e libero da ingombri, ove collocare il materiale necessario. Informare il paziente

- ✓ **Indicare con un pennarello il punto esatto di riempimento del flacone (seconda tacca dopo brodo coltura) corrispondente a 10 ml.**
- ✓ **Applicare le etichette con codice a barre in verticale, lungo la bottiglia e nello spazio dedicato**
- ✓ Indossare le protezioni per il volto ed eseguire un'azione di igiene mani.
- ✓ Applicare il laccio emostatico e reperire la vena da utilizzare per il prelievo. Nella ricerca di un sito periferico per prelievo per emocolture, scegliere sempre un vaso a valle della linea infusionale eventualmente presente.
- ✓ Togliere il laccio emostatico.
- ✓ Effettuare l'igiene delle mani con gel idroalcolico, indossare i guanti e procedere con l'antisepsi cutanea del sito di prelievo nel seguente modo:
  - tenendo la spugna dell'applicatore di Clorexidina soluzione alcolica al 2% rivolta verso il basso, premere delicatamente **SOLO UNA VOLTA** sulle alette dell'applicatore per rompere la fiala contenente la soluzione antisettica, che sarà rilasciata nella spugna con un flusso controllato. Non schiacciare ripetutamente le alette nel tentativo di accelerare la saturazione della spugna.
  - appoggiare la spugna sulla cute del paziente e premere delicatamente per applicare l'antisettico, quando la soluzione sarà visibile sulla cute, procedere all'antisepsi con un movimento **delicato in avanti e indietro per 30 secondi**. L'area trattata deve essere lasciata asciugare completamente.
- ✓ Eliminare il tappo di copertura dai flaconi delle emocolture e disinfettarle, effettuando un movimento *a spremitura di limone* **per 15 secondi** per ogni singolo flacone e lasciare la compressa di TNT appoggiata sul flacone stesso.
- ✓ Assemblare il sistema vacutainer.
- ✓ Riapplicare il laccio emostatico facendo attenzione a non toccare l'area di venipuntura.
- ✓ Effettuare la venipuntura, nel caso in cui sia necessario effettuare una nuova palpazione per reperire la vena è necessario sostituire il guanto della mano che effettuerà la palpazione, con un guanto sterile.
- ✓ Effettuare il prelievo del primo set, raccogliendo il campione di sangue per aerobi e subito dopo quello per anaerobi.
- ✓ Mantenere il flacone verticale al di sotto del braccio del paziente per meglio visualizzare il livello di riempimento. Si consiglia di **mescolare delicatamente i flaconi, capovolgendoli** per evitare la formazione di coaguli.
- ✓ Al termine del prelievo attivare la protezione gialla di sicurezza del *Safety-Lok* seguendo le indicazioni per attivare il sistema di sicurezza
- ✓ Tenere premuto il punto di prelievo con una compressa di TNT e applicare cerotto medicato.
- ✓ Togliere i guanti, eliminarli ed effettuare l'igiene delle mani.
- ✓ Effettuare il prelievo successivo da una sede differente ripetendo la stessa procedura.

7) TRASPORTO CAMPIONI IN LABORATORIO

- ✓ Inviare in laboratorio immediatamente (24 ore su 24) a temperatura ambiente senza coprire con garze o cerotti l'elastomero.
- ✓ I flaconi devono essere trasportati in sicurezza utilizzando gli appositi contenitori.
- ✓ In caso di impossibilità a consegnare immediatamente i flaconi, è possibile conservarli in reparto a temperatura ambiente per un massimo di 2 ore.
- ✓ Non refrigerare.

8) ARRIVO IN LABORATORIO E INSERIMENTO IN MACCHINA

Nei Laboratori dell'ASL VCO sono in funzione strumenti *Bactec* (BD), per l'incubazione delle emocolture con un sistema di rilevazione in fluorescenza con incubazione continua in stazioni termostatate con continua agitazione dei flaconi allocati in appositi *rack*.
E' possibile monitorare a distanza e in tempo reale la situazione di ciascun flacone (in corso, negativo, positivo) mediante il sistema informatico Epicenter.

- ✓ Il personale tecnico del laboratorio controlla i flaconi per verificarne r la conformità: volume di inoculo adeguato, etichettatura corretta.
- ✓ Procede quindi all'inserimento del flacone nel rack di incubazione mediante lettura del codice a barre del flacone.
- ✓ Una volta in postazione, il flacone è sottoposto ad agitazione e a lettura continua: quest'ultima è legata a un meccanismo su base ottica che sfrutta la produzione di anidride carbonica del metabolismo batterico.
- ✓ **I flaconi per emocoltura aerobia e anaerobia hanno un periodo di incubazione di 5 giorni.**
- ✓ **I flaconi di emocoltura per miceti hanno un periodo di incubazione di 14 giorni.**
- ✓ **I flaconi di emocoltura per micobatteri hanno un periodo di incubazione di 40 giorni.**

- ✓ Da Epicenter viene trasmesso automaticamente al LIS, e quindi a referto, il risultato di negatività per i campioni ove non vi è stata crescita microbica al termine del periodo di incubazione.
- ✓ La segnalazione di flaconi positivi è immediata e avviene tramite segnali ottici e acustici.
- ✓ Anche in questo caso Epicenter manda il risultato positivo al LIS, ma la cartella del paziente rimane aperta per permettere le successive azioni di identificazione e antibiogramma.
- ✓ Attenzione perché in caso di pazienti con spiccata leucocitosi si possono avere dei falsi positivi.

9) SEGNALE POSITIVO

Le emocolture positive vengono seminate alla loro positivizzazione

- In caso di flacone positivo, esso viene tolto dall'incubatore e sottoposto ad analisi.
- Si esegue uno striscio per la colorazione di Gram e la semina su terreni non selettivi per batteri aerobi e anaerobi.
- In caso di una positività per batteri Gram positivi o negativi o spore (appurata dall'esame microscopico), si aggiungono terreni selettivi e terreni cromogeni per la determinazione fenotipica delle principali resistenze agli antibiotici: ESBL, CPE, VRE, MRSA.
- Il risultato microscopico viene comunicato telefonicamente al Medico del Reparto e aggiunto in calce alla cartella informatica in forma di commento scritto.
- Il giorno stesso o il giorno successivo, se si osserva una patina di crescita batterica sui terreni, si procede all'identificazione batterica e all'esecuzione dell'antibiogramma partendo dalle colonie (Sistema *Vitek* e *Walk Away*).

10) SEGNALE POSITIVO EMOCOLTURA MICOBATTERI:

- In caso di positività di un flacone per micobatteri, verrà eseguito uno striscio per la colorazione di Gram, e verrà valutata l'eventuale presenza di batteri o spore.
- Il personale della Microbiologia esegue l'accettazione delle analisi per la ricerca di micobatteri in biologia molecolare e in coltura che verranno eseguite a Novara, nel seguente modo:
    - Aprire la pagina Microbiologia
    - Nella sezione Micobatteriosi digitare le voci
        - BK mic colt. materiali vari
        - Micobatteri test PCR
- Procedere alla spedizione del flacone alla Microbiologia di Novara

11) REFERTAZIONE

POSITIVI

Per il primo flacone positivo di ciascun set vengono refertati:

- identificazione del microrganismo;
- antibiogramma.

Per gli altri flaconi dello stesso set, verificata la crescita batterica e valutato che si tratta dello stesso stipite batterico, viene indicata a referto **solo** l'identificazione di genere e specie batterica.

Stessa modalità in caso di emocoltura positiva per più ceppi batterici, per il primo flacone che si sia positivizzato.

POSITIVO PER BK

A conclusione della procedura, il referto in formato digitale inviato dal laboratorio di Novara sarà caricato in *DnWEB* come allegato da parte del personale di laboratorio. La cartella con l'esame accettato in origine in reparto verrà chiusa e sarà apposta la sigla *vedi allegato*
In caso di negatività la cartella verrà chiusa dopo 40 giorni.

CONTAMINAZIONI

Nel caso di positività di un solo flacone di un set di prelievo, dove si riscontri la crescita di cocchi Gram positivi coagulasi negativi, **non si procede** all'identificazione e all'antibiogramma dei batteri isolati, ma si referterà il campione **come una probabile contaminazione**, indicando a referto il genere *Stafilococcus species*.

Per i campioni **pediatrici** viene fatto un unico prelievo da 4 ml

La crescita viene monitorata per 5 giorni

La bottiglia è una sola che vale per aerobi, anaerobi e funghi

Viene piastrato, identificato e fatto l'antibiogramma di tutto quello che cresce

Vengono seminate Agar sangue, cioccolato e sabouraud (aerobiosi e anaerbiosi)

Nel referto vengono inseriti anche gli stafilo couagulasi negativi

Non è possibile distinguere tra reale positivizzazione e contaminazione

La crescita viene monitorata per 5 giorni