

Quality Assurance della emocoltura

A. Conti^a, R. De Rosa^b

^aLaboratorio Analisi cliniche e Microbiologia, Ospedale Orlandi, Ulss 22, Bussolengo (VR)

^bUnità Operativa di Microbiologia e Virologia, AO S.Maria degli Angeli, Pordenone

Riassunto

L'emocoltura è un'indagine microbiologica atta ad individuare la presenza di batteri nel sangue raccolto in flaconi sterili dotati di brodi di coltura con anticoagulanti e successivamente incubati in camere termostate. L'isolamento colturale dei microrganismi dal sangue è una condizione indispensabile per la diagnosi di laboratorio di batteriemia, endocardite infettiva e di molte patologie infettive associate ad una condizione clinica di febbre di origine ignota; l'efficacia e il significato clinico dell'emocoltura dipendono da molteplici aspetti organizzativi, metodologici e interpretativi. Per la rilevazione di batteriemie sono necessarie corrette procedure di prelievo, un buon sistema di emocoltura, buona pratica di laboratorio e un rigoroso protocollo di comunicazione. I fattori che interferiscono con l'isolamento di batteri dal sangue sono rappresentati dal timing del prelievo e dal suo rapporto con l'antibiotico-terapia (caratteristiche del principio attivo, dose, modalità di somministrazione), dalla tecnica di antisepsi della cute per il prelievo, dal numero delle emocolture per evento settico, da eventuali errori di campionamento (volume di campione), dal fattore di diluizione sangue/brodo di coltura e dalla presenza nel brodo di sostanze per la rimozione delle molecole di antibiotico (resine – carbone attivo), dalle condizioni di saggio come temperatura, durata, atmosfera di incubazione e agitazione dei flaconi, dall'esecuzione di sottocolture in cieco (sistemi manuali). A prescindere dalla valutazione del ruolo dei singoli fattori in gioco, l'efficacia complessiva delle emocolture può essere insufficiente, soprattutto in relazione ai falsi negativi, alla possibilità di contaminazioni esogene del campione con conseguenti difficoltà interpretative del risultato, ai tempi di risposta inadeguati rispetto alle condizioni cliniche del paziente. È compito del medico di Laboratorio proporre e condividere corrette procedure di prelievo mentre l'automazione delle procedure analitiche e l'Information Technology gli consentiranno di predisporre flussi di lavoro tali da fornire informazioni diagnostiche tempestive, in base alle quali si possano intraprendere appropriate terapie antimicrobiche, contribuendo in tal modo a ridurre mortalità e tempi di degenza.

Summary

Quality Assurance of blood culture

Blood culture is a microbiologic test used to check for the presence of bacteria in the bloodstream. Blood is collected through sterile vials containing anticoagulated nutritive media; these are then incubated in thermostatic ovens. Isolation of microorganisms by blood culture is the essential pre-requisite to get a diagnosis of bacteriemia, infectious endocarditis and many other infectious diseases associated with the clinical picture of fever of unknown origin. Diagnostic efficiency and clinical significance of the test are strictly dependent from many variables in methodology, logistics, interpretation. The pre-analytical steps are of paramount importance, as long as a reliable culture system, solid laboratory procedures and expertise and a sound and effective communication protocol. Interfering factors in bacterial isolation are: a) timing of the blood drawing, also in relation to the current use of antibiotics (type and pharmacological characteristics); b) antiseptic technique of the skin before blood drawing; c) number of blood culture set for each event; d) sampling errors (blood volume), e) dilution factor by the medium; f) drug neutralisation substances, such as active charcoal or resins; g) test conditions (temperature, oxygen pressure and length of incubation); h) possible blind sub-cultures. Moreover, the influence of exogen contamination increases potential risks for incorrect interpretation of false positive/negative results and affects the therapeutic turn around time. Laboratory physicians must take full responsibility for the optimal clinical use of this test, sharing with their clinical colleagues both information and consistent medical decisions. A powerful aid to this hard task will be guaranteed by an intelligent approach mediated by Information Technology.

Key words: bacteraemia, blood cultures, pre-analytical steps, interpretation, CoNS.

Introduzione

L'isolamento colturale di microrganismi dal sangue è condizione indispensabile per la diagnosi di batteriemia, epifenomeno di molte patologie infettive, tra cui quelle associate al quadro clinico della febbre di origine ignota, nel sospetto di infezione causata da materiale protesico (come giunti articolari e innesti vascolari) e da catetere endovascolare, ed evento significativo anche nel decorso di altre malattie infettive come l'artrite settica e la polmonite. La presenza di batteri nel sangue può essere *transitoria* (della durata di pochi minuti), conseguente a manipolazioni o chirurgia di tessuti infetti, infezioni localizzate (estrazioni dentarie, cateterizzazione delle vie urinarie, spremitura di foruncoli), *intermittente*, spesso associata ad ascessi intra-addominali non drenati, pielonefrite e polmonite o *continua* quando una grave infezione sovrasta le difese dell'ospite, come nel caso della endocardite batterica e della tromboflebite suppurativa¹⁻³. L'invasione massiva del torrente circolatorio da parte di batteri e funghi rappresenta una delle situazioni più rischiose *quoad vitam* nell'ambito della Infettivologia, data la provata capacità dei microrganismi di causare gravi e immediate reazioni sistemiche come shock, insufficienza d'organo multipla, coagulazione intravascolare disseminata, tutte condizioni potenzialmente letali. L'emocoltura rappresenta un esame fondamentale per una diagnosi clinica tempestiva, permettendo l'identificazione dell'agente eziologico e l'instaurazione precoce di una efficace terapia antimicrobica, anche se la sua efficienza diagnostica può variare in relazione al sito di infezione e alle caratteristiche della batteriemia (ad es. le positività attese nel sospetto di polmonite lobare sono del 5-30%, mentre per le endocarditi e nelle infezioni endovascolari balzano all'85-95%)³. Un ulteriore motivo per non indugiare ad eseguire un'emocoltura, al di là della possibile transitorietà della batteriemia, consiste nel considerare il favorevole rapporto beneficio/costo che deriva al paziente a fronte di un rischio intrinseco alla procedura modesto. D'altra parte va ricordato che chi effettua praticamente il campionamento biologico assume una precisa responsabilità nei confronti del successivo percorso diagnostico.

Fattori che interferiscono nell'isolamento dei batteri¹⁻⁵

Il successo dell'emocoltura nel recupero dei batteri circolanti dipende da molti e complessi fattori:

- 1 la tipologia dei pazienti e la patologia di base (la probabilità pre-test di batteriemia);
- 2 la tempistica dei prelievi, in relazione alla sintomatologia del paziente, all'orario e alla modalità di somministrazione della terapia antibiotica, alle caratteristiche della batteriemia (transitoria, intermittente, continua), al distretto anatomico di infezione;
- 3 la farmacocinetica della molecola utilizzata (per i pazienti in terapia);
- 4 la tecnica di antisepsi cutanea per la raccolta del campione;
- 5 il volume di sangue prelevato per evento settico (n.prelievi/die);
- 6 la diluizione sangue/brodo di coltura (errore di campionamento);
- 7 la presenza, nei brodi di coltura, di dispositivi per la

- neutralizzazione degli antibiotici;
- 8 le condizioni di saggio (temperatura, atmosfera e durata dell'incubazione, rotazione/agitazione dei flaconi);
- 9 il sistema di rilevazione della positività (automatico/semiautomatico/manuale);
- 10 l'esecuzione di sottocolture in cieco (sistemi manuali).

I microrganismi più comunemente isolati negli adulti con batteriemia acquisita in comunità includono *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, altre *Enterobacteriaceae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococchi beta-emolitici*. Quelli più frequentemente isolati negli adulti ricoverati, invece, sono in relazione al tipo di paziente, alla presenza di protesi o cateteri vascolari, alla durata della permanenza in ospedale: generalmente vengono isolati *Stafilococchi coagulasi negativi*, *E. coli*, *S. aureus meticillino-resistenti (MRSA)* altre *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococchi*, anaerobi, *S. pneumoniae* e lieviti. Il riscontro di batteriemia e fungemia richiede buona pratica di Laboratorio associata all'utilizzo di un buon sistema analitico per emocoltura, all'interno di un flusso di lavoro efficacemente organizzato e di un sistema di comunicazione che permetta una tempestiva consultazione con il medico di Reparto ai fini del miglioramento dell'outcome clinico².

Il prelievo

Per definizione, la specificità dell'emocoltura dipende dalla percentuale di risultati falsi-positivi, causati nella maggior parte dei casi da contaminazione.

I fattori che sono stati studiati nel tempo per la riduzione della contaminazione includono le procedure di antisepsi della cute, la preparazione dei flaconi di coltura, l'utilizzo di uno o due aghi per l'inoculo dei flaconi, l'uso di personale specializzato per il prelievo (*Phlebotomist*), la scelta della sede di prelievo (catetere venoso o vena periferica), l'utilizzo di kit commerciali per il prelievo^{4,6,7}. Il prelievo va eseguito da vena periferica; è fortemente sconsigliato il prelievo da catetere vascolare (CV), a meno che non si voglia verificare se il catetere è colonizzato e se la batteriemia è dovuta proprio alla presenza del catetere [in quest'ultimo caso è bene procedere ad un prelievo da catetere e ad uno da vena periferica per verificare il tempo differenziale di positività (DTP) che compara il tempo di positivizzazione delle 2 emocolture contemporaneamente incubate in sistemi automatici: la maggiore carica batterica del CV infetto determina una positività precoce rispetto al campione da vena periferica di almeno 120 minuti]⁶.

Preparazione della cute per il prelievo^{6,7}

La sorgente di contaminazione più comune è rappresentata dalla flora batterica cutanea.

Il disinfettante meglio studiato e più frequentemente utilizzato nella raccolta del campione è lo Iodio Povidone, uno iodoforo. Tuttavia, i *Q-Probes* del *College of American Pathologists* (CAP) hanno dimostrato che la media di contaminazioni era significativamente più bassa utilizzando Tintura di Iodio piuttosto che uno iodoforo (2.1% contro 2.6%; $P = 0.036$). Altri lavori indicano una maggiore efficacia degli antisettici a contenuto alcolico, ma con differenze poco significative. Recentemente è stato commercializzato un presidio a base di clorexidina digluconato in alcool etilico 95%, in formulazione *spray*, che consente

un'ottima conservazione, una facile applicazione e una rapidissima evaporazione, permettendo così di ridurre notevolmente il tempo di applicazione e di migliorare l'adesione del personale infermieristico alle corrette procedure di prelievo pur garantendo un'ottima *performance* della fase di detersione/disinfezione.

Il fattore determinante è in realtà rappresentato dal tempo di contatto da rispettare perché l'antisettico possa espletare la sua azione con la massima efficacia.

Procedura

Preliminare e indispensabile è il lavaggio sociale delle mani, secondo le linee guida, e aver indossato la mascherina.

1. Dopo aver identificato con la palpazione il sito della puntura, lavare il tratto di cute sovrastante con acqua e sapone neutro; di solito si sceglie la regione cubitale dell'avambraccio, ma se per mancanza di vene periferiche accessibili si sceglie la vena femorale è indispensabile una disinfezione cutanea particolarmente accurata;
2. Risciacquare con acqua sterile e applicare un impacco antisettico con soluzione di tintura di iodio all'1-2% o uno iodoformo (es. soluzione al 10% di povidone-iodio) o clorexidina in soluzione alcolica, con movimento rotatorio dal centro - la vena prescelta - verso la periferia, per un diametro di 5-6 cm
Nota: Evitare l'utilizzo di benzalconio cloruro o altri derivati dell'ammonio quaternario non in associazione con altri disinfettanti, perché possibile serbatoio di microrganismi resistenti (*Pseudomonas spp*).
3. Lasciare *in situ* l'impacco per tutto il tempo necessario per l'azione antisettica: tintura di iodio e clorexidina in soluzione alcolica = 1 minuto, iodio povidone = 2 minuti;
4. Lavare la cute con impacco di alcool isopropilico od etilico al 70 % per rimuovere lo iodio o la clorexidina in eccesso, agendo dal centro verso la periferia (questo passaggio può essere evitato se si usa lo iodoformo: in questo caso la cute deve essere perfettamente asciutta).
5. Togliere il coperchio di plastica dai flaconi e disinfettare il tappo in gomma.

Per questo passaggio le evidenze della letteratura sono limitate, tuttavia è pratica comune. I *Q-Probes* del CAP hanno dimostrato che, negli ospedali dove non viene eseguita la disinfezione del tappo, la percentuale di emocolture contaminate è significativamente più elevata (3.4%) di quella di ospedali dove tale pratica è routine (2.3%; $p = 0.018$). E' stato tuttavia raccomandato di non usare mai tintura di iodio, in quanto, alterandone la porosità, può costituire una porta d'ingresso ai contaminanti;

6. Indossare guanti sterili; applicare il laccio lontano dal punto di prelievo e introdurre l'ago in vena, senza toccare ancora con le dita la cute disinfettata. Nel caso risulti difficile reperire l'accesso venoso è necessario sostituire l'ago del set prima di riprendere la manovra di prelievo. Scegliere un accesso diverso per ogni successivo prelievo, ma sempre da vasi non precedentemente incannulati, in un luogo ove la cute sia integra (è buona norma non ottenere emocolture da aree cutanee sedi di ustione o malattie dermatologiche). Per la maggior parte dei microrganismi il sangue arterioso non offre alcun

vantaggio rispetto a quello venoso, sebbene come modalità di prelievo questa sia stata segnalata migliore nel rilevamento delle malattie fungine disseminate.

Nota: in epoca pre-AIDS era prassi comune scartare l'ago utilizzato per raccogliere il sangue e usarne uno nuovo, in confezione integra, per inoculare i flaconi (tecnica del doppio ago), nella convinzione che l'ago utilizzato per il prelievo poteva essersi contaminato con la flora cutanea; oggi si preferisce la tecnica dell'ago singolo, per il rischio di danno potenziale per l'operatore nella manipolazione degli aghi e anche sulla scorta dei risultati di numerosi studi che non hanno dimostrato una differenza significativa nelle percentuali di contaminazione utilizzando la tecnica del doppio ago (2.4%) rispetto a quella con ago singolo (2.7%; *Q-Probes* del CAP);

7. Collegare al dispositivo di prelievo in sequenza prima il flacone per anaerobi e poi quello per aerobi;
8. Attaccare su ogni flacone l'etichetta con l'anagrafica del paziente facendo attenzione a non ricoprire il *barcode* del flacone.

Non c'è evidenza che l'uso di flaconi con brodi di coltura specifici per miceti porti vantaggi di costo/beneficio mentre esistono pubblicazioni discordanti circa l'efficacia nell'incrementare la percentuale di isolamenti batterici o fungini mediante l'uso di brodi contenenti dispositivi che neutralizzano gli antibiotici (resine e carbone attivo)².

Dopo il prelievo, è buona norma inviare subito i campioni in Laboratorio; in ogni caso, se questo non è possibile, i flaconi possono essere conservati a temperatura ambiente fino a 24 ore⁸ prima di essere processati, a seconda dello strumento utilizzato, senza che questo influenzi le prestazioni analitiche.

Le linee guida inglesi², tuttavia, propongono una conservazione a 35-37 °C se vi è ritardo nel trasporto al laboratorio e/o nel caricamento nel sistema automatico, sconsigliando fortemente la refrigerazione;

inoltre sottolineano la necessità dell'ispezione di questi flaconi prima dell'inserimento nell'incubatore, per verificare la possibile crescita batterica, nel qual caso è necessario procedere subito alla subcoltura.

Timing, numero dei prelievi, volume di sangue^{1-6,9,10}

Per aumentare l'efficacia diagnostica è importante eseguire il prelievo, tutte le volte che sia possibile, prima dell'inizio della terapia chemioantibiotica o immediatamente prima della somministrazione successiva, procedendo a prelievi multipli ciascuno con un *set da emocoltura* (per set si intende 1 flacone per aerobi + 1 flacone per anaerobi). Effettuare il prelievo prima del rialzo febbrile (60-90 minuti prima è il tempo ideale per intercettare le batteriemie più intense). Se la curva termica non è nota, orientarsi con la clinica: prelevare in coincidenza del rialzo febbrile (brivido), di una variazione termica significativa (> 38.3 °C e < 36 °C), dell'improvvisa comparsa di marezza, da un improvviso cambio di stato neurologico (negli anziani), o ancora per una lattacidemia non altrimenti spiegata. Il volume totale di sangue campionato è un parametro critico per ottenere dall'emocoltura le informazioni che si cercano con l'indagine. Perché un'emocoltura diventi positiva occorre che nel campione siano presenti almeno 3 unità formanti colonie (Ufc) per mL; nei pazienti batteriemici,

la concentrazione per mL di sangue è di norma 0.1 – 1 Ufc/mL; il recupero di batteri dal sangue aumenta del 3% per ogni mL di campione raccolto. Negli adulti sono quindi necessari 7-10 mL per flacone mentre sembra che per neonati e infanti possano bastare 1-2 mL per flacone, data la più alta carica riscontrabile nelle batteriemie di questa fascia di età. Regola fondamentale è non limitarsi mai ad un unico set per evento settico nelle 24 ore (la cosiddetta 'emocoltura solitaria'), dato il carattere intermittente di molte batteriemie che causa un aumento di falsi negativi; inoltre, un maggior numero di set aumenta la possibilità di differenziare i veri dai falsi positivi, nel caso vengano isolati microrganismi comunemente ritenuti contaminanti. Alcuni autori affermano che anche 2 set al giorno siano insufficienti, indicando in 4 il numero corretto. In ogni caso che la percentuale di 'emocolture solitarie' correli inversamente con la qualità dell'assistenza nelle strutture sanitarie è una constatazione unanime. E' possibile migliorare questo indicatore attraverso la standardizzazione e il monitoraggio continuo della fase preanalitica promuovendo l'aggiornamento culturale del personale di reparto e dei clinici attraverso protocolli di prelievo condivisi (2- 3 set/die), e favorendo l'interazione tra reparto di cura e Laboratorio nel caso di ricezione di un solo set di emocoltura per episodio, grazie alle potenzialità offerte dall'Information Technology (IT).

Protocolli di prelievo consigliati

Sepsi-Meningite-Polmonite-Osteomielite ecc.: 2-3 set nell'arco di 30-60 minuti prima della terapia antibiotica.

Endocardite acuta: 3 set nell'arco di 30-60 minuti prima della terapia antibiotica per 3 gg consecutivi.

Endocardite subacuta in pz già in terapia antibiotica: stesso protocollo, eventualmente ripetere il prelievo di 3 (tre) set nella giornata successiva lontano dall'assunzione del farmaco.

Febbre di ndd: 2-3 set di flaconi in 30-60 minuti per 3 gg consecutivi lontano dall'assunzione del farmaco.

Età pediatrica: 1-3 ml per 2 -3 volte al giorno in flaconi pediatrici.

Le apparecchiature e le metodiche per l'esecuzione dell'esame colturale^{3,8,11,12}

L'automazione nelle procedure di esecuzione dell'emocoltura permette di processare un gran numero di campioni in contemporanea. I moderni sistemi automatici hanno un'altissima sensibilità, consentendo rispetto al passato il rilievo precoce della positività dei flaconi per un'ampia gamma di microrganismi (riduzione del tempo di incubazione) e un'elevata specificità (bassa frequenza di risultati falsi positivi strumentali); l'informatizzazione della strumentazione permette di rilevare in modo indiretto (curve di crescita) la carica batterica iniziale e di configurare e controllare il protocollo di esecuzione di tutto il saggio. La coltura cieca o sottocoltura terminale non è raccomandata per emocolture di routine se sono utilizzati i sistemi automatici, mentre possono essere indicate per i sistemi manuali. I sistemi automatizzati per emocoltura presenti in Italia si basano su filosofie analitiche diverse:

- *BACTEC (Becton-Dickinson)* si basa sul rilievo fluorimetrico della produzione di CO₂, utilizza flaconi per aerobi e

anaerobi (con e senza resine), pediatrici (con e senza resine) miceti e micobatteri con un fluorogeno posizionato sul fondo del flacone. In caso di crescita batterica, l'aumento della concentrazione di CO₂ fa abbassare il pH della soluzione brodo-sangue, liberando fluorescenza dal fondello. Un rilevatore registra la variazione di fluorescenza rispetto ad un valore soglia ogni 10 minuti nelle 24 ore, per tutta la durata di incubazione impostata. Dopo il prelievo l'immissione dei flaconi nello strumento può essere ritardata fino a 48 ore senza interferire sul risultato.

- *Bact/ALERT (Biomérieux)* si basa sul rilievo colorimetrico della produzione di CO₂, utilizza flaconi per aerobi e anaerobi (con e senza carboni attivi), pediatrici (con carboni attivi) e micobatteri con un cromogeno sul fondo del flacone. In caso di crescita batterica l'aumento della concentrazione di CO₂ fa abbassare il pH della soluzione brodo-sangue, facendo variare il colore del fondello. Un rilevatore registra la variazione di colore rispetto ad un valore soglia ogni 10 minuti nelle 24 ore, per tutta la durata di incubazione impostata. Dopo il prelievo l'immissione dei flaconi nello strumento può essere ritardata senza interferire sul risultato.

- *Versa TREK (Trek Diagnostic System)* si basa su un metodo omnicomprensivo che misura la variazione di pressione prodotta nello spazio di testa del flacone (legata al consumo di O₂ e la produzione di CO₂, N₂ e H₂) tramite un connettore che lo collega al sensore di crescita, che è posizionato nello strumento e non nel singolo flacone; utilizza due flaconi per tutte le necessità (aerobi e anaerobi in due formati diversi) e micobatteri. Dopo il prelievo l'immissione dei flaconi nello strumento può essere ritardata fino a 24 ore senza interferire sul risultato.

Durata dell'incubazione dei flaconi nei sistemi automatici

La letteratura è concorde nell'affermare che la durata di 5 gg di incubazione dei flaconi in monitoraggio automatico continuo sia sufficiente per rilevare la crescita di più del 95% dei microrganismi clinicamente significativi². Del tutto recentemente studi sistematici su un gran numero di emocolture hanno dimostrato che nei sistemi automatici il 97.5% dei microrganismi presenti in coltura vengono rilevati entro i primi 3 gg di incubazione^{11,13}. E' comunque necessario modulare il tempo di incubazione in relazione al sospetto di infezioni da germi a lenta crescita (es. 14 gg in caso di sospetta Brucellosi, 10 gg per alcuni Miceti ecc.)². A tutt'oggi, comunque, le Aziende costruttrici dei sistemi automatici continuano a consigliare una durata dell'incubazione standard di 5gg, mentre per i sistemi manuali rimane la necessità di periodi di incubazione standard più lunghi (7-10 gg), in relazione al sistema di rilevazione della crescita, alle caratteristiche del medium e alla possibilità di un'agitazione continua dei flaconi.

Valutazione microscopica per l'identificazione dei batteri da emocoltura^{1-4,9,14,15}

In caso di flacone con segnale "positivo", è fondamentale procedere ad una valutazione microscopica di un preparato ottenuto a partire da un'aliquota della brodocoltura strisciata su un vetrino. La colorazione di GRAM è

comunemente utilizzata per classificare i batteri in base alla loro forma, dimensione, arrangiamento e reazione alla colorazione; essa rappresenta uno strumento estremamente utile per il rapido riconoscimento dei microrganismi e può guidare la scelta per una tempestiva terapia antimicrobica. La necessità di fare presto e bene un'identificazione e un antibiogramma (anche guadagnando poche ore rispetto al protocollo colturale di routine) è testimoniata dalle numerose segnalazioni in letteratura che evidenziano come ogni giorno perso per giungere alla diagnosi eziologica di sepsi e per ottenere una valutazione della sensibilità dell'isolato agli antimicrobici aumenta di 1-2 volte la probabilità di decesso del paziente mentre terapie antimicrobiche tempestive e mirate impattino drammaticamente sull'outcome^{2,3,9,14}.

Sfortunatamente, la sensibilità della metodica (60-85%) è legata alla carica microbica del campione, al tipo di germe in esame, alle caratteristiche del brodo, alla presenza di sostanze inibenti, alle condizioni di incubazione, alla tecnica di preparazione del vetrino e a quella di colorazione; infine, in maniera decisiva, all'esperienza dell'operatore. E' noto che i GRAM + possono essere più facilmente colorati in modo differenziale rispetto ai GRAM -, specie se questi ultimi sono presenti in piccole quantità nel campione o frammisti a detriti cellulari o a cellule infiammatorie. Per tali motivi, diverse modifiche sono state apportate alla tecnica di colorazione originale sviluppata da Christian Gram nel 1884; una di queste, particolarmente utile per contrastare meglio i batteri anaerobi Gram - ed altri che si colorano debolmente (*Legionella spp*, *Campylobacter spp*, *Bacteroides spp*, *Fusobacterium spp*, *Brucella spp*) prevede l'utilizzo della carbol-fucsina o fucsina basica al posto della Safranina^{1,2}. Un altro metodo di identificazione dei batteri da un preparato, consigliabile in caso di emocoltura, è quello che prevede l'uso di un fluorocromo, l'Orange Acridinio, e di un microscopio a fluorescenza. La molecola, legandosi agli acidi nucleici di batteri e funghi, emette una fluorescenza arancio ai raggi UV, mentre il DNA delle cellule umane emette una fluorescenza verde.

Numerosi studi mettono in evidenza come questa tecnica, a parità di specificità, sia più sensibile della colorazione di GRAM e diversi autori consigliano l'esecuzione di ambedue le procedure in caso di emocoltura positiva^{3,16}. L'esame microscopico, allestito di regola da tutti i flaconi risultati positivi al rilevamento strumentale, può essere di per sé considerato un test diretto preliminare presuntivo in quanto, oltre a fornire una prima informazione sulla probabile eziologia dell'infezione (bacilli, cocci, miceti), è in grado di orientare sulla presenza di una flora polimicrobica o monomicrobica. Il segnale di flacone positivo va inteso come una vera e propria "urgenza" e il Laboratorio deve essere organizzato in modo tale che sia sempre disponibile un medico per la lettura del Gram ottenuto dal flacone e per la consulenza clinica al medico di reparto, a qualsiasi ora del giorno e della notte, tutti i giorni della settimana; fermo restando che la capacità di interpretare in modo adeguato un vetrino colorato al GRAM deve essere patrimonio culturale di ogni medico che si trovi a svolgere la sua opera professionale in un Laboratorio di Analisi cliniche⁹.

Se si osservano microrganismi è utile registrare:

- l'affinità tintoriale (GRAM pos/GRAM neg),
- la forma (cocchi-coccoidi-coccobacilli-bacilli-filamenti-spore),
- l'arrangiamento (a grappolo, in catenella, a lettera "cinese", in tetradi, ad ali di gabbiano, a "s" ecc.),
- in caso di bacilli, la forma delle estremità (arrotondate, piatte, appuntite, rigonfie), la colorazione del "corpo" del microrganismo, immagini di "minus" di colore al centro o alle estremità della cellula depongono per vacuoli o presenza di spore, marcato pleomorfismo o colorazione irregolare.

Secondo alcuni autori, anche la semplice comunicazione "di cocchi gram-positivi in cluster, cocchi gram-positivi in catene o diplococchi, bacilli gram-positivi, cocchi gram-negativi, bacilli gram-negativi, e lieviti" mostra un valore predittivo positivo da 94.6 a 100% con un valore predittivo negativo da 99.0 a 100%; sensibilità dal 91 al 99% e specificità dal 97 al 99% a seconda dell'affinità tintoriale, della morfologia dei batteri identificati, dell'esperienza dell'operatore. Tuttavia, per il clinico, è molto più utile l'identificazione presuntiva del germe piuttosto che la descrizione della sua morfologia (es. comunicare "Diplococchi gram-positivi, suggestivi di *S. pneumoniae*" piuttosto che semplicemente "Diplococchi gram-positivi") così come sarà molto utile, se è il caso, aggiungere un commento di presuntiva contaminazione rilevando cocchi gram-positivi in cluster o in tetradi¹⁶. E' appena ovvio che l'efficacia della consulenza microbiologica sarà tanto maggiore quanto più saranno disponibili notizie cliniche rilevanti come il sospetto diagnostico (per es. endocardite), eventuali malattie intercorrenti (diabete!), la presenza di cateteri venosi o vescicali, il sospetto patogeno (per es. brucella), la nutrizione parenterale e l'eventuale terapia antibiotica in atto. E' importante sottolineare il fatto che se il reperto non è chiaro o permane incertezza sul riconoscimento morfologico dei microrganismi è meglio non dare alcuna comunicazione per non fuorviare ed attendere l'esito della coltura. In caso contrario il risultato della valutazione microscopica va immediatamente comunicato al medico di reparto, per telefono o via fax, molto meglio se in formato elettronico (come risultato preliminare sul referto), registrando data, ora, identità dell'interlocutore^{2-3,9,14}. Il controllo di qualità (QC) della colorazione di GRAM va eseguito ogni volta contestualmente alla colorazione del vetrino ottenuto dal campione del flacone segnalato positivo.

Materiali: *S. pneumoniae* ceppo ATCC 49619 per GRAM-positivi
H. influenzae ceppo ATCC 49247 per GRAM-negativi

Colonie fresche 18-24 ore ottenute da ritrapianto giornaliero su AS e CHOC 35 °C - CO₂ 5%

Risultati attesi con microscopio obiettivo 100X in immersione

QC GRAM + cocchi (diplococchi) blu-viola
 QC GRAM - cocco-bacilli rossi

Risultati di dubbia interpretazione^{2,3}

Flacone segnalato positivo, con striscio positivo al Gram e sottocoltura negativa

Spesso sono in causa specie di Abiotrophia (variante nutrizionale degli streptococchi),

S. pneumoniae, che a volte presenta il fenomeno dell'auto-lisi e microrganismi con esigenze nutrizionali elevate che non sono in grado di svilupparsi sui normali terreni di coltura.

In questi casi è utile considerare l'utilizzo di terreni addizionali od arricchiti, incubazioni prolungate od atmosfere alternative per la crescita, in relazione alla morfologia riscontrata al microscopio e alle indicazioni cliniche. Se si sospetta *S. pneumoniae* dai rilievi microscopici o clinici, può risultare utile la ricerca diretta dell'antigene sul brodo del flacone con un metodo validato.

Flacone segnalato positivo, con striscio negativo al Gram e sottocoltura negativa

Diverse possono essere le cause della falsa positività: valore soglia stabilito su livelli di crescita troppo bassi, problemi di alimentazione di corrente elettrica, volume di sangue nel flacone in eccesso rispetto al brodo, elevata conta dei leucociti nel campione. Gli strumenti automatici per emocoltura permettono di verificare la curva di crescita dei batteri al fine di escludere la possibilità di una coltura falsamente negativa ancor prima di considerare falsamente positivo il segnale. Nei sistemi manuali, la torbidità può essere dovuta all'aspetto del siero del paziente piuttosto che allo sviluppo di microrganismi.

Comunque, se la curva di crescita evidenzia sviluppo batterico, è opportuno studiare il campione con l'Acridinio orange o con ulteriori colorazioni quali carbol fucsina, o il Giemsa.

I falsi negativi^{2,3}

La causa può essere rappresentata da una terapia antimicrobica in atto o pregressa, un volume di sangue insufficiente o particolari condizioni cliniche come l'uremia. In aggiunta, è possibile che ci si trovi di fronte a batteriemie non rilevabili dai sistemi di emocoltura perché causate da batteri non comuni.

1. Presenza nel campione di germi "difficili" (come quelli del Gruppo HACEK):

Haemophilus (*paraphrophilus*, *aphrophilus*, *parainfluenzae*, *influenzae*),

Actinobac. Actinomycetecomitans, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*,

Kingella (*kingae*, *denitrificans*).

Sono componenti della flora oro-faringea, a crescita lenta, che spesso vengono mobilizzati da procedure chirurgiche nel cavo orale; rappresentano gli agenti etiologici di circa il 3% delle endocarditi (prevalentemente valvola mitrale); tipicamente hanno sviluppo e crescita lenti (superiore a 5-7 gg).

2. Germi con esigenze culturali particolari, che non possono essere coltivati nei medium contenuti nei flaconi per carenza di elementi essenziali: Micobatteri, Legionella spp, Miceti, Bartonella spp, Brucella spp, Borrelia spp, Francisella spp, Bordetella spp, Abiotrofia spp.

3. Germi a localizzazione endocellulare obbligata: Rickettsia spp, Coxiella burnetii, Chlamydia spp.

In queste situazioni più che mai sono indispensabili notizie cliniche e anamnestiche al fine di utilizzare procedure alternative rispetto a quelle standard:

- Prolungare incubazione oltre il protocollo standard (15-

30 gg).

- Inoculare il sangue su terreni e possibilmente su colture cellulari (shell vial).
- Effettuare subcolture su terreni arricchiti ed in varie atmosfere (aerobia, anerobia, CO₂ 5%).
- Utilizzare terreni speciali per le subcolture (es. BCYE nel sospetto di Legionella).
- Passare ad un sistema di lisi/centrifugazione.
- Utilizzare test sierologici per la ricerca di antigeni e anticorpi.
- Utilizzare tecniche di diagnostica molecolare.

Identificazione, antibiogramma, test diretti dal brodo dell'emocoltura^{2-3,9,14,17}

Per migliorare l'impatto clinico del risultato microbiologico una delle esigenze gestionali emergenti di oggi consiste nel produrre risultati in tempi sempre più rapidi: è, infatti, unanimemente riconosciuto che per incidere in maniera consistente nella scelta del farmaco antimicrobico riducendo contestualmente il livello di mortalità e, se possibile, la spesa, è necessario riuscire a fornire un antibiogramma in tempi il più possibile ridotti. E' evidente, tuttavia, che a prescindere dalla tipologia di servizio diagnostico (Servizio autonomo di Microbiologia o Laboratorio generale di Analisi cliniche e Microbiologia), se si hanno a disposizione risorse umane e tecnologiche per effettuare un'emocoltura, l'organizzazione dei turni e del flusso di lavoro deve prevedere la possibilità di processare i flaconi appena segnalati positivi su base 24/7⁹. Nella gestione delle emocolture, gli elementi critici del TAT sono costituiti essenzialmente da: tempo di positivizzazione dei flaconi (o time to detection, TTD); tempo di risposta preliminare (per via telefonica o informatica); tempo di risposta completa. Le variabili che giocano un ruolo fondamentale nel computo del TAT sono essenzialmente: gli orari di apertura del servizio; la disponibilità di metodi per una diagnosi rapida; un efficiente sistema informatico per il collegamento con i reparti di degenza, un valido protocollo di comunicazione dei risultati preliminari. Da vari autori sono stati valutati numerosi metodi rapidi, sebbene nessuno di loro sia stato sottoposto a standardizzazione. Sia per le identificazioni che per i test di sensibilità diretti non esistono allo stato attuale procedure standardizzate e approvate e l'utilizzo dei vari sistemi disponibili viene lasciato alla responsabilità ed esperienza del microbiologo⁹; i test di sensibilità vengono tuttavia fortemente raccomandati in quanto possono fornire indicazioni terapeutiche preliminari di grande importanza, soprattutto per escludere i più importanti meccanismi di resistenza, quali ad esempio l'Oxacillino-resistenza degli stafilococchi, la produzione di β lattamasi a spettro esteso delle Enterobacteriaceae o la resistenza al fluconazolo dei lieviti. Bisogna tra l'altro sottolineare che è ormai dimostrato che gli errori rinvenibili nei test di sensibilità diretti sono per la maggior parte dei casi "minor errors" e numericamente molto ridotti^{2-3,9}. E' appena ovvio ma è opportuno ricordare che tutte queste procedure potranno essere applicate solo se, alla colorazione di Gram, sarà apprezzabile un unico morfotipo batterico. Per l'allestimento dei diversi metodi diretti si procede seguendo alcuni passaggi in sequenza: agitazione del flacone da emocoltura positivo; allestimento del vetrino

per l'esame microscopico con colorazione di Gram; aspirazione di 5-6 ml del campione in una provetta sterile sottovuoto munita di gel separatore; centrifugazione del campione a 3200 giri per 15 minuti; eliminazione del sovrantante; prelievo del pellet microbico al top del gel con una pipetta Pasteur monouso sterile aggiungendo una piccola aliquota di soluzione fisiologica e risospendendo il materiale con delicatezza; sospensione di tutta l'aliquota prelevata in una provetta con fisiologica fino ad ottenere una torbidità di 0,5 Mc Farland per allestire l'identificazione diretta e l'antibiogramma e per eseguire i test diretti⁹. Nel caso dei cocci Gram positivi, alcuni Autori suggeriscono di utilizzare già l'esame microscopico diretto come prima valutazione presuntiva della presenza di *S. aureus* piuttosto che di altri Stafilococchi coagulasi negativi, con una sensibilità riferita dell'89% e una specificità del 98%. In questo caso, vengono suggeriti alcuni principali parametri da considerare, quali: le dimensioni della cellula batterica; il numero delle cellule che costituiscono il tipico grappolo; se il campione proviene da flaconi per aerobi od anaerobi⁹. Sulla base del quadro microscopico, è possibile allestire test diretti per diverse tipologie di microrganismi:

Stafilococchi

- Identificazione: strumento automatico.
- Antibiogramma: strumento automatico o E-test o Kirby Bauer.
- Test della coagulasi: il test è allestito miscelando il pellet ottenuto da flacone con il plasma di coniglio, incubando poi il plasma così inoculato a 37° C per tre ore. In presenza di evidente coagulazione del plasma si identifica il microrganismo presuntivamente come *S. aureus*, in attesa della identificazione definitiva. Gli stafilococchi che non producono coagulazione del plasma sono definiti "coagulasi negativi" e devono essere comunque identificati mediante le reazioni biochimiche strumentali.
- MRSA screen Agar per la rilevazione dell'Oxacillino-Resistenza (si sviluppano solo colonie di stafilococchi resistenti).

Bacilli Gram negativi

- Identificazione: strumento automatico.
- Antibiogramma: strumento automatico o Kirby Bauer.
- E-test ESBL: conferma di produzione di b-lattamasi a spettro esteso.

Lieviti

- Agar cromogenico per lieviti.
 - Identificazione: galleria di identificazione.
 - Sensititre® YeastOne® Fluconazolo/Amfotericina B.
- Nell'esecuzione della procedura di coltura di routine, è opportuno eseguire le sottocolture da tutti i flaconi del set, anche se appare positivo un solo flacone. In assenza notizie cliniche, si propone un protocollo minimo di subcoltura su terreno solido²⁻³:
- Agar Sangue + Agar Cioccolato in CO₂ 24-48 h 35 °C Lettura giornaliera.
- Agar Sangue in Aria 24-48 h 35 °C Lettura giornaliera.
- Agar Schaedler + Metronidazolo 48-72 h Anaerobiosi 35 °C Lettura 3°/4°/5° giornata.
- Agar Sabouraud in aria 30 °C (lettura giornaliera) se so-

spetta fungemia.

L'identificazione va spinta a genere e specie secondo i metodi in uso in laboratorio mentre l'allestimento delle prove di sensibilità va eseguito secondo le linee guida CLSI o EUCAST, utilizzando di volta in volta le metodiche più indicate per la tipologia del microrganismo identificato. L'istituzione di una ceppoteca, costituita da stipiti batterici isolati dal sangue rappresenta una preziosa risorsa del Laboratorio per:

- Studi e reports epidemiologici locali e/o in rete con altri Enti.
- Studi e reports di antibiotico-resistenza.
- Approfondimenti diagnostici.
- Dirimere eventuali problematiche medico-legali.
- Controllo di Qualità e verifica delle procedure operative.
- Eventi didattico-educativi.
- Valutazione di nuovi principi attivi.

La predittività dell'isolato e l'interpretazione dei risultati: i falsi positivi ^{4-7,9,18-20}

Il 50% dei pazienti sottoposti ad emocoltura sono a basso rischio di batteriemia; questa semplice evidenza statistica rende ragione dell'alta percentuale di falsa positività (30-50%) delle emocolture positive che si traduce in un aumento dei costi di laboratorio, dei costi di degenza, della alta percentuale di pazienti sottoposti inutilmente a terapia antimicrobica (con verosimile selezione di cloni resistenti circolanti). Le emocolture solitarie e il livello di contaminazione rappresentano un buon metodo per valutare l'appropriatezza della diagnostica delle sepsi. La corretta identificazione del microrganismo isolato dall'emocoltura fornisce importanti informazioni per l'interpretazione dell'emocoltura. Generalmente vengono considerati contaminanti gli Stafilococchi coagulasi negativi (CoNS), *Corynebacterium* spp, *Bacillus* spp, Streptococchi viridanti, *P. acnes* e *C. perfringens*, con una probabilità di infezione "vera" che va dal 10-15% per i CoNS (in relazione a tipologia del paziente, condizioni predisponenti, presenza di dispositivi protesici), 38% per *S. viridanti*, 23% per *C. perfringens*, 5% per *Corynebacterium* e *Bacillus* spp, *P. acnes*.

Il problema dei CoNS

I CoNS sono commensali in differenti distretti corporei, si comportano da patogeni opportunisti, causando infezioni in presenza di fattori predisponenti e rappresentano un grande reservoir per meccanismi genici di resistenza. Spesso causano batteriemie e infezioni a partire da cateteri vascolari o biomateriali ed è difficile identificarli correttamente con test biochimici di routine. La loro patogenicità si esprime in maniera diversa a seconda dello stipite, della sede di isolamento, della malattia di base del paziente e del suo stato di immunocompetenza, della capacità di aderire sui materiali protesici e colonizzarli. E' importante considerare che, nonostante in molti autorevoli studi e linee guida internazionali sia stato sottolineato che in caso di sospetta contaminazione di una emocoltura con isolamento di CoNS non sia appropriato procedere a terapia antibiotica (*CDC 12 Steps to Prevent Antimicrobial Resistance: Hospitalized Adults: Step 8: Treat infection, not colonization!*), c'è evidenza, in letteratura, che a seguito di una tale identificazione, nella stragrande maggioranza dei casi i clinici trattano il

paziente, con il risultato netto che molti CoNS sono correlati a particolari problemi di resistenza agli antibiotici: spessissimo mostrano resistenza alla Oxacillina e con una certa frequenza ridotta sensibilità alla Teicoplanina. Appare evidente quindi come l'identificazione di un CoNS da flacone positivo di emocoltura pone diversi problemi interpretativi in relazione alla sua significatività come responsabile della sindrome settica del paziente. Diversi aspetti clinici e laboratoristici sono stati presi in considerazione, di volta in volta, per cercare di ridurre in modo efficace il livello di incertezza, nel decidere se il microrganismo isolato dal sangue è da considerarsi patogeno o contaminante. Orientano verso la contaminazione di emocoltura i seguenti elementi, laboratoristici e clinici:

- 1 sola emocoltura positiva su 4-6 flaconi (1 emocoltura positiva seguita o preceduta da emocolture negative),
- 1 sola emocoltura positiva su 2 ottenute simultaneamente,
- 1 solo un flacone positivo (aerobio o anaerobio) di un unico set ottenuto,
- 2 set positivi, ma separati da un intervallo di tempo con più di un set negativo.

Quando vengono eseguite 2 o più emocolture e si sviluppa un germe considerato contaminante, solitamente questo accade in una singola emocoltura positiva; quindi raccogliere più di 1 set di emocolture aiuta nell'interpretazione del significato dell'isolato poiché la probabilità di ritrovare lo stesso microrganismo (come contaminante) in 2 o 3 set di emocolture dello stesso paziente è molto bassa.

- *Emocoltura positiva (con isolamento di CoNS) oltre le 96 ore delle 120 del protocollo standard di incubazione (crescita tardiva).* La crescita di grandi quantità di microrganismi patogeni dovrebbe essere rivelata in tempi più brevi rispetto ai contaminanti, che solitamente sono presenti in quantità più piccole. Tuttavia, pur teoricamente valido, questo concetto si scontra con un notevole grado di sovrapposizione del tempo di positivizzazione tra i veri patogeni e i contaminanti, anche in relazione all'alta sensibilità di rilevazione dei sistemi culturali automatici; quindi questo criterio, come fattore predittivo di una coltura vera-positiva, va utilizzato con estrema cautela.
- *Isolamento di uno Stafilococco di solito colonizzante la cute e non riscontrato in altri sedi campionate né riscontrato in campionamenti successivi.* Gli isolati andrebbero considerati "lo stesso ceppo" se le prove biochimiche e il pattern di sensibilità sono molto simili o identici; raramente ci sono pazienti che hanno vera batteriemia con specie di Stafilococchi coagulasi negativi diverse. Anche questo criterio va utilizzato con estrema cautela, poiché le performances di identificazione dei CoNS mostrate da sistemi automatici o semiautomatici non sono ottimali e sarebbero richieste tecniche molecolari per confermare che isolati multipli sono veramente "identici" o la percentuale di omologia.
- Una sindrome clinica incompatibile con il tempo di crescita del germe isolato.
- Crescita polimicrobica in paziente non operato all'addome e non immunodepresso.
- Decorso clinico non tipico.
- Fattori di rischio assenti per batteriemia correlata al mi-

croorganismo isolato.

- I segni/sintomi dell'infezione non regrediscono con trattamento antibiotico adeguato rispetto al profilo di sensibilità.
- Una sindrome clinica che evolve positivamente senza antibioticotераpia.
- Una sindrome clinica che può essere motivata da ragioni diverse dall'infezione.

Negli anni sono stati proposti approcci diversi per la corretta interpretazione dei possibili falsi positivi da CoNS, in vari studi sono state elaborate regole e algoritmi, a volte anche basati su complesse regole matematiche²¹, che di volta in volta tenevano conto solo di dati di laboratorio o li integravano con dati clinici. Di seguito sono riportati alcuni esempi, tra i più semplici e di più facile applicazione.

Algoritmo di Weinstein 2003¹⁸

- 1.1 risultato positivo per specie inclusa fra i possibili contaminanti su un'unica emocoltura effettuata: significato indeterminato;
- 2.1 risultato positivo su due o più colture inviate: probabile contaminante;
- 3.2 o più colture positive entro 48 h per specie inclusa fra i possibili contaminanti diversi da CoNS: procedere a identificazione e antibiogramma;
- 4.2 o più colture positive entro 48 h per CoNS; procedere a identificazione e antibiogramma;
5. Specie diverse: probabile contaminante;
6. Specie identiche: batteriemia vera.

Algoritmo di Tokars 2004 (pazienti con CVC inserito)¹⁹

- 1.1 risultato positivo su un'unica emocoltura effettuata: risultato indeterminato;
- 2.1 risultato positivo su più di 2 emocolture effettuate: batteriemia da CoNS inverosimile;
3. se risultati positivi su 2/2 o 2-3/3 emocolture effettuate: batteriemia da CoNS molto probabile se almeno un prelievo è stato effettuato da catetere venoso.

Algoritmo di Beekmann 2005²⁰

- 1.1 Emocoltura positiva per CoNS e nessun'altra emocoltura positiva entro 5 gg, con WBC nella norma e BANDS <10%: Contaminazione;
- 2.1 Emocoltura positiva per CoNS e nessun'altra emocoltura positiva entro 5 gg, con WBC <2000 o >12000 e BANDS >10% ma temperatura corporea e pressione sistolica nella norma: Contaminazione;
- 3.1 Emocoltura positiva per CoNS e nessun'altra emocoltura positiva entro 5 gg, con WBC <2000 o >12000 e BANDS >10% ma temperatura corporea <36 °C o >38.5 °C e pressione sistolica <90 mmHg: Isolato significativo;
4. >1 Emocoltura positiva addizionale per CoNS in un periodo di 5 gg: isolato significativo.

Conclusioni

L'emocoltura è sicuramente uno degli esami a più elevata valenza clinica nello studio delle malattie da infezione, eppure è una delle indagini richieste meno frequentemente

di quanto sarebbe necessario. Lo scopo principale dell'esame è quello di rilevare l'agente eziologico dell'infezione e la richiesta d'esame risulterà tanto più appropriata quanto più il risultato sarà in grado di fornire una risposta valida al quesito, consentendo al medico richiedente di prendere una decisione efficace. Per tali motivi essa deve essere eseguita in modo "sapiente" in tutte le fasi (preanalitica, analitica e post-analitica) poiché molti sono i passaggi critici, organizzativi, metodologici, interpretativi che ne possono ridurre l'efficacia. L'interpretazione del risultato e la validazione della risposta non possono limitarsi a criteri "biologici", pure necessari per garantire un elevato standard qualitativo, ma devono strutturarsi sulla "sensibilità clinica" del medico di Laboratorio che, fondata su solide basi culturali, si sviluppa e si affina nel tempo grazie alla frequentazione dei reparti di cura, alla condivisione con i colleghi clinici delle problematiche diagnostiche e terapeutiche dei malati e all'attività consulenziale nei loro confronti. La modernizzazione dei laboratori, con l'applicazione estensiva dell'automazione delle procedure analitiche e dell'IT, consente di trovare un nuovo equilibrio tra rapidità analitica, qualità diagnostica, sfruttamento dei metodi di nuova generazione rispetto a quelli di acquisita validità, in un'ottica di estesa ma razionale riorganizzazione dei servizi, del personale, in un quadro generale di contenimento dei costi gestionali.

Bibliografia

1. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Edition. Washington DC: ASM, 2005.
2. National Public Health BSOP 37 Investigation of blood cultures (for organisms other than Mycobacterium species). Disponibile su URL: <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/bsop/pdf/bsop37.pdf> (data di consultazione: 14.08.2008).
3. Nicoletti P, Pecile P. Il contributo del laboratorio di microbiologia alla diagnosi di sepsi; limiti e potenzialità dell'emocoltura. *Esa Dia* 2006; 24:17-21.
4. Weinstein MP. Current blood culture methods and systems; clinical concepts, technology, and interpretation of results. *Clin Infect Dis* 1996; 23:40-6.
5. Cokerill FR, Wilson JW, Vetter EA, Goodman KM, Torgeson CA, Harmsen WS, et al. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis* 2004; 38:1724-30.
6. Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:788-802.
7. Schiffman RB, Strand CL, Meier FA, Howanitz PJ. Blood culture contamination: a College of American Pathologists Q-Probes study involving 640 institutions and 497134 specimens from adult patients. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122:216-21.
8. Sautter RL, Bills AR, Lang DR, Ruschell G, Heiter BJ, Bourbeau PP. Effects of delayed-entry conditions on the recovery and detection of microorganisms from BacT/ALERT and BACTEC blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1245-9.
9. Grosso S, Camporese A. Valutazione di appropriatezza, efficienza ed efficacia di alcune procedure analitiche per ridurre il turnaround time delle emocolture RIMeL/IJLaM 2007; 3:203-12.
10. Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3546-8.
11. Bourbeau PP, Foltz M. Routine incubation of BacT/ALERT FA and FN blood culture bottles for more than 3 days may not be necessary. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2506-9.
12. Mirret S, Reller LB, Petti CA, Woods CW, Vazirani B, Sivasub 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.
13. 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.
14. Bouza E, Sousa D, Munoz P, Creixem MR, Fron C, Lechuz JG. Bloodstream infections: A trial of the impact of different methods of reporting positive Blood Culture Results. *Clin Infect Dis* 2004; 39:1161-9.
15. Colleen K, Gannon MT. Responsible reporting in Microbiology:improving quality of care through better communication. Clinical issues 2004 <http://www.mlo-online.com> (data di consultazione: 14.08.2008).
16. Adler H, Bauml N, Frei R. Evaluation of Acridine Orange Staining as a Replacement of Subcultures for BacT/ALERT-Positive, Gram Stain-Negative Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5238-9.
17. Ling TKW, Liu ZK, Cheng AFB. Evaluation of the Vitek2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of Gram-Negative Bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4705-7.
18. Weinstein MP. Blood culture contamination: persisting problems and partial progress. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2275-8.
19. Tokars JI. Predictive Value of Blood Cultures Positive for Coagulase negative Staphylococci: Implications for Patient Care and Health Care Quality Assurance. *Clin Infect Dis* 2004; 39:333-41.
20. Beekmann SE, Diekema DJ, Doern GV. Determining the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26:559-66.
21. Trick WE, Zagorsky BM, Tokars JI, Vernon MO, Welbel SF, Wisniewski MF, et al. Computer algorithms to detect Bloodstream infections. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:612-20.