

|                                                     |                                                |           |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------|
| ASL N. 4 L'Aquila Ospedale San Salvatore            | Procedura Operativa Standard                   | Rev 1.0   |
| Dip. Patologia Clinica U.O. Medicina di Laboratorio | <b>Esame culturale del sangue (emocoltura)</b> | Ott. 2002 |
| Settore Batteriologia tel 0862 368688               |                                                |           |

## 1- Principio del test

Inoculazione del campione di sangue in mezzi di coltura definiti per l'isolamento dei batteri patogeni nel torrente circolatorio.

## 2- Applicazione clinica

La coltura del sangue è realizzata per identificare batteri o altri microorganismi coltivabili (lieviti, funghi filamentosi). Una semplice presenza di tali microorganismi nel sangue è denominata batteriemia (o fungemia) ed è generalmente patologica. In individui sani, il sangue è sterile.

Esistono alcune eccezioni: la batteriemia transitoria occorre frequentemente poco tempo dopo la estrazione di denti, o altri trattamenti odontologici o chirurgici delle membrane mucose contaminate, nella broncoscopia o cateterizzazione uretrale. Questo tipo di batteriemia transitoria generalmente è causata da batteri commensali e, in genere, si risolve spontaneamente con la fagocitosi dei batteri nel fegato o milza. Setticemia è un termine clinico per descrivere una batteriemia con manifestazioni cliniche di infezione severa, o che include brividi, febbre, indisposizione, tossicità e ipotensione, essendo lo shock settico la sua forma estrema. Lo shock può essere causato da endotossine prodotte da bastoncelli Gram negativi.

## 2- Campione sangue

## 4- Standard, Controlli, Reagenti

Sono cinque i flaconi di coltura che accompagnano l'apparecchio BacT/Alert® (Organon/Teknika): aerobio e anaerobio adulto standard, aerobio e anaerobio adulto con FAN (fattore di neutralizzazione degli antibiotici) e pediatrico.

I flaconi sono mezzi di coltura liquidi di composizione definita e permettono un ottimo sviluppo dei patogeni infettanti. Nel fondo di ciascun flacone c'è un sensore colorimetrico che indica la positività o negatività del campione (verde negativo, amaranto positivo). Utilizziamo nella routine i flaconi aerobi standard e FAN, anaerobio adulto standard e pediatrico. Il flacone FAN è composto del mezzo BHI addizionato da una sostanza chiamata Ecosorb che fra gli altri componenti presenta carbone assorbente usato per aumentare il rilevamento di organismi fastidiosi (*Neisseria*, pneumococchi, *Haemophilus*, *Brucella* ecc.) indicato per pazienti sotto terapia antibiotica.

| Elaborazione                                                     | Verifica                    |                             | Approvazione                          |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Settore: Batteriologia<br>Nome: <b>Gianfranco Bruno</b><br>Firma | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Dirigente II liv.:<br>Nome:<br>Firma. |

Prima dell'uso i flaconi devono essere controllati. Non usare flaconi che presentino tracce di contaminazione , flaconi deteriorati, flaconi scaduti. Non aprire mai i flaconi prima delle sub culture.

## 5- Strumenti:

Nella routine delle emocolture utilizziamo lo strumento BacT/Alert® (Organon/Teknika), Lo strumento ha come principio la rilevazione colorimetrica della produzione di CO<sub>2</sub> da parte dei microorganismi. Lo strumento è molto agile data la sua alta sensibilità. Ha un modulo di incubazione (termostato ) con capacità di monitorare fino a 60 flaconi simultaneamente, agitando continuamente i campioni, facendo una lettura con raggio laser ogni 10 minuti e trasmettendo al computer , attraverso un software che valuta le letture e elabora grafici di crescita del germe , oltre a gestire i dati del paziente e fornire statistiche epidemiologiche.

L' identificazione biochimica dei microorganismi isolati, come la realizzazione degli antibiogrammi è realizzato con il sistema automatico Microscan Walk/ away Dade Behring).

## 6- Procedimento Dettagliato

### ASEPSI DELLA PELLE

La contaminazione delle emocolture durante la raccolta deve essere ridotta al minimo , preferibilmente meno del 3% di tutti i flaconi raccolti. La pelle va preparata meticolosamente nel posto della puntura venosa usandosi antisettico battericida (tintura di iodio, soluzione di iodio polividone al 10% , alcool al 70% o clorexidina allo 0.5% in alcool al 70%).L'NCCLS raccomanda dopo palpazione :

- 1) Disinfettare la zona con alcool isopropilico al 70% o alcool etilico ;
- 2) attraverso movimenti concentrici e dall'interno all'esterno , procedere alla pulizia utilizzando soluzione di tintura di iodio all' 1-2% o una soluzione di polividona-iodio al 10% (PV.P.I);
- 3) nel caso di pazienti con ipersensibilità allo iodio , applicare di nuovo alcool al 70%;
- 4) lasciare asciugare l'alcool prima di effettuare la puntura;
- 5) Togliere il cappuccio a strappo dai flaconi selezionati. Disinfettare le membrane dei flaconi con alcool o preparato allo iodio e fare asciugare;
- 6) Introdurre l'ago della siringa in vena e prelevare la quantità di sangue desiderata:

| Tipo di flacone                           | Sangue (ml) |
|-------------------------------------------|-------------|
| Flacone di coltura aerobi anaerobi        | 5-10 ml     |
| Flaconi di coltura Pedi-Bact Aerobi       | 0.5-4 ml    |
| Flaconi di coltura FAN aerobi ed anaerobi | 10 ml       |

7)trasferire la quantità di sangue raccomandata nei flaconi di coltura .Utilizzare un nuovo ago per ogni flacone. Riempire per prima il flacone per anerobi. Controllare che la quantità di sangue non superi i 10 ml.

| Elaborazione                                                     | Verifica                    |                             | Approvazione                          |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Settore: Batteriologia<br>Nome: <b>Gianfranco Bruno</b><br>Firma | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Dirigente II liv.:<br>Nome:<br>Firma. |

Se una nuova palpazione è necessaria durante la raccolta, il guanto dovrà essere nuovamente disinfettato. Se la pelle dei pazienti presentano ipersensibilità allo iodio, la asepsi potrà essere realizzata con una duplice applicazione dell'alcool a 70%. Anche dopo una attenta preparazione della pelle, alcuni batteri permangono negli strati più profondi e possono raggiungere il sangue come per esempio: *S.epidermidis*, *Propionibacterium acnes* e anche spore di *Clostridium*). La pseudobatteriemia (coltura di sangue falso positivo) possono risultare dall'uso di soluzioni antisettiche, siringhe o aghi contaminati. L'isolamento reiterato di un microorganismo poco comune (per esempio *Serratia spp.*) in ospedale deve aumentare il sospetto di una infezione ospedaliera e provocare una attenta indagine microbiologico-epidemiologica. Altra fonte di infezione è il contatto dell'ago con flaconi (o soluzioni) non sterili.

### **RACCOLTA DI SANGUE:**

Precauzioni universali: le norme internazionali di sicurezza raccomandano l'uso di guanti, come precauzione nella manipolazione del sangue o altri materiali potenzialmente contaminati. Per le emocolture, si raccomanda l'uso di guanti sterili, prima della palpazione della vena. Le medesime cure osservate per la asepsi della pelle dei pazienti devono essere seguite si devono seguire per la disinfezione dei guanti, dopo la palpazione. La raccolta deve essere realizzata attraverso il metodo tradizionale (siringa e ago) o con il sistema di raccolta vacutainer. Una attenzione speciale è da darsi al sistema di vuoto, rispetto al volume di sangue inoculato.

### **MOMENTO DELLA RACCOLTA:**

Sempre che sia possibile il sangue deve essere raccolto prima della somministrazione di antibiotici. Il momento della raccolta di sangue è quando il paziente comincia ad avere una elevazione della temperatura e mai al picco febbrile.

### **QUANTITA' DI SANGUE:**

Per il rilevamento della batteriemia e fungemia, è necessario che almeno 1 microorganismo vitale sia presente nel campione raccolto. Siccome il numero di batteri per mL di sangue è piccolo, è importante ottenere quantità ragionevoli di sangue. Il volume del campione è dipendente dalla quantità del mezzo di coltura presente nel flacone. Pertanto, la relazione sangue/mezzo deve essere obbligatoriamente rispettata e incontrarsi fra 1:5 a 1:10.

Studi internazionali hanno dimostrato che quanto maggiore è il volume inoculato, maggiore è la probabilità di recupero dei microorganismi. Da ciò si raccomanda sempre se sia possibile l'inoculo del volume massimo, sempre rispettando il rapporto sangue/mezzo. In pazienti sotto terapia antibiotica, se non si usano flaconi che contengono agenti inibitori, è raccomandato l'inoculo di volumi minori del massimo, per aversi un tentativo di diluire la quantità di antimicrobici del campione nel mezzo, promuovendo così un maggiore recupero dei microorganismi.

### **NUMERO DI CAMPIONI:**

Si raccomanda di ottenere da 2 a, preferibilmente, 3 culture di sangue, separate da intervalli di approssimativamente 1 ora (o meno nel caso che il trattamento antibiotico non possa

| Elaborazione                                                     | Verifica                    |                             | Approvazione                          |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Settore: Batteriologia<br>Nome: <b>Gianfranco Bruno</b><br>Firma | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Dirigente II liv.:<br>Nome:<br>Firma. |

essere rinviato) .Raramente si raccomandano piu' di 3 emocolture al giorno.I vantaggi delle colture ripetute sono i seguenti:

si riduce la possibilità di non trovare una batteriemia transitoria;

eventuali saprofiti isolati come *Staphylococcus epidermidis* devono essere presi in considerazione nel caso siano recuperati da vari prelievi venosi;

La terapia empirica degli antibiotici deve essere iniziata, di preferenza, dopo la raccolta di campioni di sangue.In caso di neccesità , la scelta dell'antibiotico puo' essere aggiustata quando i risultati del test di suscettibilità diventano disponibili.

Raccomandazioni specifiche sono realizzate per le infezioni sistemiche e localizzate, quali:

- a) sospetto di setticemia acuta, meningite, osteomielite, artrite e polmonite batterica acuta non trattata: raccogliere, nello stesso momento , 2 flaconi di emocoltura, provenienti da zone differenti (per esempio, in un braccio e nell'altro);
- b) per febbri di origine sconosciuta: raccogliere inizialmente 2 flaconi, da due parti differenti. Dopo un intervallo di 24-36 ore, raccogliere altri due flaconi;
- c) nel caso si sospetti l'endocardite sub acuta :raccogliere 3 campioni , da punti differenti nel primo giorno, con un intervallo ideale fra le raccolte di 15 minuti.Se tutte sono negative dopo 24 ore , raccogliere piu' di 3 flaconi;
- d) nel caso di una endocardite non diagnosticata, nella quale il paziente stia sotto antibiotici per 1 o 2 settimane prima della ammissione in ospedale; raccogliere 2 flaconi separati ogni giorno, durante 3 giorni consecutivi

## ANTICOAGULANTI

Si raccomanda l'uso del polianetol-sulfonato di sodio (SPS) come anticoagulante perché inibisce anche l'effetto antibatterico del siero e dei fagociti, oltre a possedere la proprietà di inattivare in certo modo l'azione degli aminoglicosidi , quando siano presenti nel campione di sangue.

Quando i flaconi di coltura non sono disponibili , il sangue deve essere trasportato in laboratorio in provette contenenti soluzione sterile di anticoagulante (citrato, eparina, SPS).Quando il sangue raggiunge il laboratorio , il campione deve essere immediatamente trasferito ai flaconi di emocoltura.

## INOCULAZIONE DI SANGUE:

Procedere alla disinfezione delle membrane dei flaconi di emocoltura prima della inoculazione del materiale.Questo puo' essere fatto con l'ausilio della soluzione di alcool acetone (del metodo di Gram).Studi attuali hanno dimostrato che non esistono differenze significative negli indici di contaminazione fra le colture di sangue inoculate direttamente con lo stesso ago utilizzato nel prelievo e un ago di sostituzione.

Se i flaconi utilizzati sono in doppio per il recupero di batteri aerobi e anaerobi, si procede all'inoculazione nei flaconi per anaerobi , questa routine nel procedere evita l'entrata di aria nell'interno di questi flaconi.

## TEMPO DI INCUBAZIONE:

| Elaborazione                                                     | Verifica                    |                             | Approvazione                          |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Settore: Batteriologia<br>Nome: <b>Gianfranco Bruno</b><br>Firma | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Dirigente II liv.:<br>Nome:<br>Firma. |

Il tempo della incubazione delle bottiglie è dipendente dalla metodologia usata .Per i metodi tradizionali (manuali) , incubati a 35-37°C , i flaconi vanno ispezionati 2 volte al giorno (almeno durante i primi 3 giorni) per verificare se ci sono segni di crescita microbica. Una cultura negativa generalmente evidenzia uno strato di cellule rosse sedimentate coperte da un brodo trasparente giallo pallido. La crescita è evidenziata da: deposito di materiale flocculato sopra lo strato di sangue, torbidità uniforme o sotto la superficie , emolisi, coagulazione del mezzo, pellicola in superficie e produzione di gas.

Nella metodologia automatizzata , lavori internazionali dimostrano che è possibile la diminuzione del tempo del test che va da 5 a 6 giorni , senza la perdita di microorganismi clinicamente significativi questo per una maggiore sensibilità del metodo dovuta probabilmente alla costante agitazione dei flaconi e al loro precoce rilevamento per mezzo di sensori.Solo nel caso si sospetti germi a lenta crescita o difficili quali *Brucella spp.* *Cardiobacterium*, *Actinobacillus* o *Bartonella spp.* Le emocolture possono essere incubate per tempi di almeno 10 giorni.

## PROCESSAMENTO FINALE

Dopo il rilevamento della sospetta positività di uno o più flaconi, i medesimi sono trattati per l'isolamento dell'eventuale batterio .Si disinfetta il cappuccio con una soluzione alcool-acetone (50% v.v.).Dopo che si asciuga, si aspira (per mezzo di siringa da insulina) una piccola quantità di liquido (0,5 a 1,5 ml).Questo volume preso dal flacone serve per la preparazione di vetrini (che saranno colorati con il metodo di Gram) e seminati nei rispettivi mezzi selettivi e non selettivi , dipendendo dalla morfologia incontrata.I mezzi di coltura per le subculture di routine dei flaconi positivi sono:agar sangue (o cioccolato) e agar selettivi per i Gram negativi (agar EMB secondo Levine o agar Mac Conkey)

## SICUREZZA DELL'OPERATORE

Non si può escludere che i campioni di sangue contengano agenti patogeni. Occorre pertanto attenersi alle comuni precauzioni previste per la manipolazione di prodotti contaminati da sangue o da altri liquidi biologici. I flaconi inoculati, i dispositivi di prelievo e gli aghi utilizzati per il prelievo devono essere messi in appositi contenitori e autoclavati prima di procedere al loro smaltimento.

In caso di versamento di brodo inoculato, eliminare con cura il liquido versato attenendosi alle raccomandazioni d'uso.

## METODOLOGIA ALTERNATIVA MANUALE.I FLACONI HEMOLINE® DUO (Biomérieux)

Se per qualche motivo, i campioni di sangue per emocoltura non si possono inoculare nei flaconi dello strumento BacT/Alert®, esso si può fare nei flaconi comuni di emocoltura. a quantità di sangue che si deve inoculare nel flacone deve corrispondere sempre al 10% del volume di brodo della coltura. Le precauzioni di asepsi , disinfezione dei cappucci dei flaconi e subculture sono le stesse descritte prima .Il flacone Hemoline è un terreno difasico che contiene due terreni di coltura caratterizzati da formule arricchiti di fattori di crescita al fine di consentire

| Elaborazione                                                     | Verifica                    |                             | Approvazione                          |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Settore: Batteriologia<br>Nome: <b>Gianfranco Bruno</b><br>Firma | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Dirigente II liv.:<br>Nome:<br>Firma. |

la ricerca di batteri aerobi obbligati o aerobi-anaerobi. Come per i flaconi Bact/Alert esiste un metodo di prelievo con cannula .A tal fine i flaconi hanno una pressione interna ridotta rispetto alla pressione atmosferica .

#### **prelievo**

- 1)Inoculare fino a 10 ml di sangue
- 2)Misurare il volume di sangue prelevato servendosi delle graduazioni stampate sulla etichetta di ciascun flacone (ogni graduazione equivale a 5 ml).
- 3)riposizionare la capsula di protezione.
- 4)Omogenizzare il sangue e il brodo agitando il flacone almeno 3 volte.

Nel caso non si possano inviare tempestivamente al laboratorio, i flaconi vanno conservati a 35-37°C fino al momento del trasferimento.

#### **Lettura ed interpretazione**

Leggere i flaconi ogni giorno per 7-10 giorni , agitando il flacone per favorire l'inondazione dello strato di agar. La comparsa di opacità o di emolisi nel brodo, la produzione di gas, la formazione di eventuali depositi sulla superficie del brodo o lo sviluppo di colonie sull'agar sono indice di positività del campione.

#### **7- Calcoli**

Non applicati

#### **8- Controllo di Qualità**

E' possibile controllare le performances dei terreni utilizzando ceppi microbici di riferimento. Consultare le norme NCCL M22.

#### **9- Valori di Riferimento, Interpretazione, Valori critici**

Valori di Riferimento: Non sviluppo di batteri o lieviti

#### **10- Linearità e limite di rilevamento**

E' risaputo che quanto maggiore è la quantità di sangue prelevato, tanto maggiori sono le possibilità di isolamento dei microorganismi. Il sangue puo' contenere degli inibitori della crescita microbica (fattori del sangue o antibiotici) che è opportuno diluire. Per questo motivo i risultati migliori si ottengono con volumi di sangue compresi fra 5 e 10 ml per flacone. I campioni possono contenere dei microorganismi particolarmente esigenti che non si sviluppano sui terreni di isolamento utilizzati. In tal caso, conviene utilizzare terreni speciali e/o opportunità tecniche di identificazione basate sulla ricerca di antigeni specifici.

#### **11- Limitazioni del metodo**

Paziente sotto antimicrobici , raccolta di sangue impropria, mancata osservanza delle regole descritte anteriormente.

| Elaborazione                                                     | Verifica                    |                             | Approvazione                          |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Settore: Batteriologia<br>Nome: <b>Gianfranco Bruno</b><br>Firma | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Dirigente II liv.:<br>Nome:<br>Firma. |

## 12- Referenze Bibliografiche

**Auckenthaler , R., D.M. Ilstrup, and J.A. Washington II.**1982.Comparison of recovery of organisms from blood cultures diluted 10% (volume/volume) and 20% (volume/volume).J. Clin. Microbiol. 15:860-865

**Jorgensen , J. H., S. Mirrett, L.C., Mc Donald , P.R. Murray, M.P., Weinstein J. Fune, C.W. Trippy, M. Masterson, and L.B. Reller.**1997.Controlled clinical laboratory comparison of BACTEC Plus Aerobic/F resin medium with Bact/Alert aerobic FAN medium for detection of bacteremia and fungemia.J. Clin. Microbiol. 35:53-58.

**Kellogg, J.A., F.L. Ferrentino, J. Liss, S.L.Shapiro, and D.A.Bankert.**1994.Justification and implementation of a policy requiring two blood cultures whrn one is ordered.Lab. Med. 25:323-330.

**Lombardi , D.P., and N.C. Engleberg.**1992.Anaerobic bacteremia:incidence,patient charachteristics, and clinical significance.Am.J.Med..92:53-60.

**Mermel, L. A., and D.G. Maki.**1993.Detection of bacteremia in adults:consequences of culturing an inadquate volume of blood. Ann. Intern.Med. 119:270-272.

**Murray, P.R., P. Traynor, and H. Hopson.**1992.Critical assesment of blood cultures techniques:analysis of recovery of obligate and facultative anaerobes, strict aerobic bacteria, and fungi in aerobic and anaerobic blood culture bottles.J. Clin. Microbiol. 30:1462-1468.

**Reimer, L.G.** 1994.Catheter –related infections and blood cultures..Clin.Lab. Med. 14:51-58.

**Reimer L.G., M.L. Wilson, and M.P. Weinstein.**1997.Update on detection of bacteremia and fungemia .Clin.Microbiol. Rev. 10:444-465.

**Salventi, J.F. T.A. Davies, E.L. Randall, S. Whitaker, and J.R. Waters.**1979. Effect of blood dilution on recovery of organisms from clinical from clinical blood in medium containing sodium polyanethol sulfonate.J.Clin. Microbiol., 9:248-252.

**Seigman –Igra, Y. , A.M. Anglim, D.E. Shapiro, K.A., Adal, B.A. Strain, and B.M. Farr.**1997 Diagnosis of vascular catheter-related blood stream infection:a meta-analysis.J. Clin. Microbiol. 35:928-936.

**Szymczak., E.G., J.T. Barr, W.A. Durbin, and D.A. Goldmann.**1979. Evaluation of blood culture procedures in a pediatric hospital .J.Clin.Microbiol. 9:88-92.

**Washington , J.A..II.**1975. Blood cultures:principles and techniques.Mayo Clin. Proc. 50:91-98.

**Wilson, M.L. , and M.P. Weinstein .**1994. General principles in the laboratory detection of bacteremia and fungemia.Clin. Lab. Med. 14:69-82.

| Elaborazione                                                     | Verifica                    |                             | Approvazione                          |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Settore: Batteriologia<br>Nome: <b>Gianfranco Bruno</b><br>Firma | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Dirigente II liv.:<br>Nome:<br>Firma. |

**Chien J. W.** 1998. Making the most of blood cultures. Tips for optimal use of this time-honored test. Post graduate medicine. Blood cultures. Vol 104 N. 1 119-127

| Elaborazione                                                     | Verifica                    |                             | Approvazione                          |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Settore: Batteriologia<br>Nome: <b>Gianfranco Bruno</b><br>Firma | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Sezione:<br>Nome:<br>Firma. | Dirigente II liv.:<br>Nome:<br>Firma. |