

PROCEDURA OPERATIVA PER L'ESECUZIONE DELL'EMOCOLTURA



REDATTO		
Dott.ssa V. delli Carri	Dirigente Medico - SSVD Microbiologia e Virologia	<i>Valeria delli Carri</i>
Dott.ssa T. Rollo	Dirigente Biologo - SSVD Microbiologia e Virologia	<i>Tiziana Rollo</i>
Dott. L. Micelli	Dirigente Biologo - SSVD Microbiologia e Virologia	<i>L. Micelli</i>
Dott. D. Cedola	Dirigente Biologo - SSVD Microbiologia e Virologia	<i>Domenico Cedola</i>
VERIFICATO		
Prof. F. Arena	Dirigente Medico - SSVD Microbiologia e Virologia	<i>F. Arena</i>
Prof. A. Cotoia	Dirigente medico UOC Anestesia e Rianimazione	<i>A. Cotoia</i>
Dott. G. Villone	Dirigente Medico - Direzione Sanitaria	<i>G. Villone</i>
Dott.ssa G. Martino	Coll. Prof. Sanitario Infermiere - Direzione Sanitaria	<i>G. Martino</i>
Prof. T. Santantonio	Direttore S.C. Malattie Infettive	<i>T. Santantonio</i>
Dott.ssa A. Carretta	Dirigente Medico S.C. Malattie Infettive	<i>A. Carretta</i>
Dott.ssa E. Quitadamo	Dirigente Farmacista S.C. di Farmacia	<i>E. Quitadamo</i>
Prof. L. Cipolloni	Direttore S.C. Medicina Legale	<i>L. Cipolloni</i>
APPROVATO		
Dott. L. Miscio	Direttore Sanitario	<i>L. Miscio</i>

Sommario

DEFINIZIONI ED ACRONIMI	3
1. INTRODUZIONE.....	4
2. SCOPO ED OBIETTIVI.....	5
5. MODALITA' OPERATIVE	6
6. TRASPORTO DEI CAMPIONI IN LABORATORIO	12
7. ARRIVO IN LABORATORIO E INSERIMENTO IN MACCHINA	13
8. GESTIONE DEI CAMPIONI POSITIVI	14
9. REFERTAZIONE.....	15
10. RACCOMANDAZIONI	15
11. BIBLIOGRAFIA	16
Allegato: BUNDLE EMOCOLTURA.....	17

DEFINIZIONI ED ACRONIMI

- **CPE/CRE:** Enterobatteri Produttori di Carbapenemasi/ *Carbapenemasi Resistent Enterobacter*
- **CR/BSI:** *Catheter Related Bloodstream Infection* (batteriemia catetere correlata)
- **CVC:** Catetere venoso centrale
- **ESBL:** *Extended Spectrum Beta-Lactamase* (Enterobatteri produttori di beta-lattamasi a spettro allargata)
- **MRSA:** Stafilococco aureo resistente alla meticillina
- **VRE:** Enterococchi resistenti alla vancomicina
- **Antisettico:** una sostanza che inibisce lo sviluppo dei microrganismi senza necessariamente ucciderli
- **Batteriemia:** presenza di batteri nel circolo ematico. Può essere transitoria, intermittente o continua
- **SEPSI:** disfunzione d' organo potenzialmente letale causata da una risposta sregolata dell'ospite ad una infezione (ESICM/SCCS)
- **Shock settico:** condizione clinica di sepsi aggravata da alterazioni del circolo, cellulari e metaboliche, associata ad un rischio di mortalità più alto
- **Fungemia:** presenza di lieviti o miceti nel sangue
- **Contaminante:** microrganismo isolato da una emocoltura e che non è responsabile dell'infezione
- **DPI:** dispositivi protezione individuale
- **Set di emocolture:** almeno due flaconi (es. aerobio+ anaerobio) per emocoltura in cui un singolo prelievo di sangue è inoculato
- **Vacutainer:** sistema di prelievo sottovuoto

1. INTRODUZIONE

L'emocoltura rappresenta un esame primario per contribuire a definire, insieme ad una più generale valutazione clinico-diagnostica, l'origine della malattia infettiva, e per tale motivo è considerata il "gold standard" per la diagnosi delle infezioni del torrente circolatorio.

Consente l'isolamento del microrganismo patogeno, rendendone possibile l'identificazione e l'esecuzione dei saggi di sensibilità in vitro ai principali chemioterapici, così da adeguare e modulare la terapia antimicrobica, secondo regole condivise di appropriatezza terapeutica ⁽¹⁾. Da un punto di vista prognostico, la crescita incontrollata del microrganismo patogeno sottende l'incapacità delle difese immunitarie dell'ospite e della terapia medica a contenere la malattia.

L'incidenza di sepsi è elevata in tutto il mondo con un'elevata mortalità che causa circa 50 milioni di nuovi casi per anno ed 11 milioni di morti ⁽²⁾. Circa l'80% dei casi sono di origine comunitaria, mentre la quota di sepsi-correlata all'assistenza, seppure non stimabile in maniera accurata, è di circa il 20% ⁽¹⁴⁾. È possibile tuttavia che questi dati siano sottostimati, a causa di un ricorso alle emocolture non sempre ottimale per ragioni culturali e organizzative.

Dal punto di vista eziologico, negli ultimi anni, si è assistito a una riduzione delle sepsi da Gram positivi ed a una parallela ascesa delle infezioni da Gram negativi (*E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*) e da *Candida* (in particolare *C. parapsilosis*, *glabrata* e *krusei*).

Le infezioni del tratto respiratorio rappresentano la più comune origine della sepsi.

L'origine urinaria appare in riduzione pur rappresentando circa un quarto dei casi. Una quota minore di episodi settici è a partenza dal tratto gastrointestinale o dalla cute e tessuti molli (11 % ognuno) ^(3,4).

Dunque al fine di una tempestiva e corretta identificazione del patogeno responsabile della sepsi e dell'eventuale sito primario è fortemente raccomandato l'invio, insieme all'emocoltura, di altri campioni microbiologici quali broncolavaggio, urine, ecc, e l'eventuale integrazione con biomarcatori (Procalcitonina, Endotossina, etc).

Nei pazienti settici, la diagnosi veloce e accurata della batteriemia e fungemia ha un impatto critico sulla prognosi perché l'avvio tempestivo di una terapia antibiotica mirata (entro 48 ore) aumenta significativamente le possibilità di sopravvivenza (la letalità correlata all'infezione si riduce del 20-30%), oltre a prevenire l'uso indiscriminato di farmaci antinfettivi che si assocerebbe ad una riduzione della comparsa di resistenza batterica.

In caso di sospetto clinico di sepsi, l'emocoltura rappresenta quindi il miglior strumento per la diagnosi, da eseguire il più precocemente possibile con accorgimenti di ordine tecnico, metodologico e organizzativo, in grado di ridurre i tempi di esecuzione e di trasmissione dei risultati al clinico.

Le linee guida generalmente sconsigliano l'esecuzione di routine di singole emocolture come coltura di sorveglianza perché considerate di scarso valore clinico e associate a un aumento dei costi ⁽⁶⁾. Tuttavia, nell'ambito della gestione di un paziente critico soprattutto se in Terapia Intensiva o Ematologia, può essere opportuno privilegiare il valore clinico di una emocoltura positiva che potenzialmente potrebbe non essere rilevata. Raccomandano, invece, di ottenere emocolture (2 o più set) e colture microbiologiche da tutti i siti sepsigeni potenziali prima dell'inizio della terapia antimicrobica, quando ciò non comporti un ritardo sostanziale (>45 minuti) nell'inizio della terapia stessa ⁽¹⁵⁾. Tale raccomandazione è rimasta immutata nelle linee guida del 2021⁽¹⁶⁾.

In particolare quando vi sia la necessità clinica di iniziare una terapia antibiotica empirica, il razionale per l'utilizzo di una "single-sampling strategy" (prelevare cioè l'intero volume di sangue da

un singolo prelievo e suddividerlo in 4-6 flaconi) si basa sulla possibilità di ridurre il tasso di contaminazione limitando il numero dei prelievi, limitare il carico di lavoro e il rischio occupazionale degli operatori, diminuire i costi e iniziare una terapia antibiotica empirica più precocemente, ragioni per le quali questa strategia è stata proposta come modalità di scelta da alcuni autori ⁽⁹⁾.

L'esecuzione di corrette procedure di antisepsi della cute e di inoculo del campione sono indicate per ridurre il rischio di introdurre nella coltura i più comuni contaminanti (*Bacillus spp*, *Corynebacterium spp*, *Propionibacterium spp*, *Stafilococchi coagulasi negativi*, *Micrococcus spp*): la frequenza di contaminazioni delle emocolture, definite come isolamento di un microrganismo introdotto nella coltura durante il prelievo e/o il processamento del campione e che non era presente nel sangue del paziente al momento del prelievo o comunque non implicato nella infezione in atto, dovrebbe essere inferiore al 3% ⁽⁵⁾.

Quindi gli elementi critici che possono condizionare questa procedura diagnostica sono molti per cui devono essere standardizzati e correttamente eseguiti.

2. SCOPO ED OBIETTIVI

La presente procedura ha lo scopo, oltre che a definire i criteri clinici che determinano la necessità di effettuare un'emocoltura, di standardizzare le modalità di gestione dell'analisi dei campioni ematici ed ottimizzare la tecnica di esecuzione della emocoltura al fine di facilitare la diagnosi di sepsi /shock settico, quindi:

- la fase preanalitica: richiesta, esecuzione del prelievo, invio in laboratorio del campione;
- la fase analitica: qualità dell'esame e tempi di refertazione;
- la fase interpretativa dei risultati.

3. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il documento è rivolto a tutte le U.O. del Policlinico Riuniti di Foggia impegnate nel percorso di identificazione e trattamento del paziente con sepsi/shock settico.

4. RESPONSABILITA'

Un corretto processo dell'esecuzione dell'emocoltura prevede la seguente matrice di responsabilità:

- la prescrizione e l'effettuazione della richiesta dell'esame è responsabilità medica;
- L'identificazione dei flaconi per emocoltura, la corretta esecuzione del prelievo (sede del prelievo e quantità di flaconi) e l'invio dei campioni alla SSVD Microbiologia e Virologia è responsabilità infermieristica;
- Il personale sanitario di supporto è responsabile del trasporto dei campioni microbiologici;
- l'accettazione e la lavorazione immediata dei flaconi da emocoltura (disponibile h24) è di responsabilità del personale della SSVD Microbiologia e Virologia (lunedì-sabato 08-20, domenica 08-14) e del personale della Sezione d' Urgenza - SC Patologia clinica (turno notturno 20-8 e festivi 14-08).

5. MODALITA' OPERATIVE

5.1 A CHI ESEGUIRE UNA EMOCOLTURA

Nei pazienti con una sospetta batteriemia, l'emocoltura deve essere eseguita subito dopo la comparsa del sospetto clinico e, accanto alla febbre e al brivido, devono essere presi in considerazione altri parametri:

- anomalie della frequenza cardiaca (aumentata), della pressione sanguigna (ridotta o aumentata) e della frequenza respiratoria (aumentata)
- numero dei leucociti (aumentati o ridotti) ed altri marcatori biologici di infiammazione quali Proteina C Reattiva (PCR), Procalcitonina (PCT) e lattati
- comparsa di confusione mentale

La febbre NON è assolutamente un fattore discriminante di per sé, poiché alcuni pazienti possono essere normo- o ipotermici anche nella fase batteriémica ⁽⁶⁾.

Inoltre va sempre considerato che i segni di sepsi possono essere minimi o assenti nei bambini molto piccoli e nei pazienti anziani ⁽⁴⁾.

5.2 MOMENTO IN CUI ESEGUIRE IL PRELIEVO

E' stato dimostrato che l'esecuzione dell'emocoltura alla comparsa del brivido e del rialzo termico 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 effettuare prelievi per emocoltura ad intervalli di 30-60 minuti non è supportata dall'evidenza, poiché non sono state osservate differenze in termini 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 l'emocolture simultaneamente o entro un breve intervallo di tempo ^(5,6,10).

Fanno eccezione i pazienti con sospetta endocardite batterica sub acuta o altre infezioni endovascolari (ad es. infezioni del CVC), nei quali l'esecuzione ad intervalli regolari di emocolture può servire a documentare una batteriemia continua ^(5,6): tre set di emocolture a intervalli di 15-30' e, in caso di negatività, altri 3 set dopo le prime 24h.

In ogni caso, tutte le raccomandazioni concordano nel fatto che l'emocoltura deve essere eseguita prima dell'inizio della terapia antibiotica empirica: il mancato isolamento nelle colture può avvenire entro minuti o ore dopo la prima dose di antimicrobico. Diversi studi suggeriscono che l'ottenimento di emocolture prima dell'inizio del trattamento antibiotico è associato ad un migliore esito dei pazienti ⁽¹⁰⁾. Se fosse necessario iniziare rapidamente una terapia antibiotica prima di poter eseguire l'emocoltura in un paziente critico, è indicato effettuare il prelievo prima di una nuova somministrazione, cioè quando le concentrazioni del farmaco nel sangue sono al minimo ⁽⁶⁾.

	<p>PROCEDURA OPERATIVA PER L'ESECUZIONE DELL'EMOCOLTURA</p>	<p>Revisione 00 Maggio 2024 7 di 17</p>
---	---	--

Non ci sono indicazioni per il prelievo nei giorni successivi per il follow up, perché quest'ultimo si deve basare sui dati clinici. In ogni caso il prelievo non andrebbe mai ripetuto prima di tre giorni dall'inizio della terapia mirata (18,19).

Ci sono tre eccezioni:

- l'endocardite (la persistenza dell'infezione può richiedere una modifica della terapia)
- le sepsi da *Staphylococcus aureus* in cui il prelievo dopo 2 e 4 giorni può fornire utili indicazioni di complicanze infettive insorte per via ematogena (es. endocardite o osteomielite) o per estensione dell'infezione in altre sedi (tromboflebite settica, ascessi) (20).
- la candidemia (19)

5.3 SEDE DEL PRELIEVO

Il prelievo da **sangue periferico** rimane il *gold standard* per l'esecuzione corretta di emocolture e 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.

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

Nei pazienti portatori di **catetere venoso centrale**, le linee guida indicano che questo **non dovrebbe essere utilizzato per prelevare il sangue**, tranne che nei pazienti nei quali si sospetti un'infezione associata al catetere stesso (*catheter related bloodstream infection*, CR-BSI). In questo caso due set di emocolture devono essere ottenuti nello stesso momento, una da prelievo periferico e una da catetere, senza scartare la prima quantità di sangue prelevato perché è quella con la più alta concentrazione di microbi, adeguatamente marcate con la fonte del prelievo, e un ulteriore prelievo da vena periferica (5,6). Tuttavia, soprattutto nelle Unità di Terapia Intensiva ed Ematologia, non sempre è possibile accedere a una vena periferica od ottenere un'adeguata quantità di sangue dal prelievo venoso 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 anche se sono stati posizionati al momento.

5.4 NUMERO DI CAMPIONI E VOLUME DI SANGUE DA PRELEVARE

Ai fini dell'isolamento dei germi patogeni, è stato dimostrato che più importante della tempistica è il **volume di sangue prelevato**, la variabile maggiormente determinante. L'incremento da 20 ml a 40 ml del volume di sangue posto in coltura (11) aumenta la resa diagnostica del 20%, mentre l'incremento da 40 a 60 ml porta ad un ulteriore aumento del 10%, indipendentemente dalle modalità di raccolta del campione (simultanea o con prelievi seriali entro le 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 di emocolture** (4-6/8 flaconi) ad intervalli ravvicinati (*multi sampling strategy*) di 10-12 min l'uno dall'altro o in un unico prelievo (*single sampling strategy*) con inoculo contemporaneo di tutti i flaconi. L'esecuzione di un solo prelievo nei pazienti adulti è fortemente sconsigliata, a causa dell'insufficienza del volume di sangue analizzato, con conseguente aumento dei falsi negativi e difficoltà nell'identificazione dei falsi positivi ⁽⁶⁾.

Nel sospetto di batteriemia correlata al catetere vascolare è necessario prelevare e porre in incubazione nello stesso momento un set (1 flac. per aerobi + 1 flac. per anaerobi) dal catetere e un set (1 flac. per aerobi + 1 flac. per anaerobi) da vena periferica.

La contemporaneità del momento di prelievo e di incubazione tra set da catetere e set da vena periferica deve essere segnalata al laboratorio, mediante corretto inserimento della richiesta sul portale dedicato: per avere evidenza di batteriemia correlata al catetere vascolare è necessario che l'emocoltura prelevata da CVC si positivizzi almeno due ore prima dell'emocoltura prelevata da via periferica.

La richiesta deve essere inserita, fornendo le etichette distinte, esempio: PRIMO SET per il prelievo da CVC e SECONDO SET per prelievo da vena periferica ed eventuale terzo set in caso di catetere arterioso.

Ogni set di emocoltura è costituito da due flaconi:

- **1 Flacone Bactec Aerobi (Tappo blu)**
- **1 Flacone Bactec Anaerobi (Tappo fucsia)**

Le linee guida italiane AMCLI (*Associazione Microbiologi Clinici Italiani*) non riconoscono evidenze scientifiche sufficienti per l'uso di terreni selettivi per la coltura dei miceti in aggiunta al set aerobio/anaerobio per le ricerche di routine.

L'uso del flacone anaerobio ha un valore duplice: incrementa il volume di sangue e quindi la sensibilità dell'emocolture e consente la crescita dei batteri anaerobi obbligati ma anche dei batteri anaerobi facoltativi e aerotolleranti.

I flaconi aerobi ed anaerobi contengono resine che hanno la funzione di rimuovere gli antimicrobici e altre sostanze inibenti la crescita microbica presenti nel sangue (complemento, lisozima, fagociti, anticorpi, etc.).

Ogni flacone dovrebbe essere inoculato con un volume ottimale di sangue pari a 8-10 ml, questo consente di mantenere un rapporto sangue/brodo di coltura tra 1:5 e 1:10 (rapporto ottimale). Un volume inferiore (< 5 ml) o superiore (>10 ml) può determinare risultati falsi positivi o falsi negativi ⁽¹⁷⁾.

Si raccomanda di mantenere i flaconi in posizione eretta per assicurare che venga inoculata la giusta quantità di sangue ⁽⁶⁾ e **inoculare sempre prima il flacone per aerobi e poi quello per anaerobi**.

Non esistono in commercio flaconi sottovuoto capaci di raccogliere una quantità definita di sangue; quindi, il volume di sangue deve essere monitorato durante il prelievo dall'operatore. Se il prelievo venoso è effettuato anche per raccogliere sangue per altre determinazioni, i flaconi per emocoltura devono essere inoculati per primi al fine di evitare contaminazioni.

Per i pazienti pediatrici sono disponibili flaconi appositi che prevedono l'immissione di ridotte quantità di sangue (1-4 ml anche in relazione al peso del bambino e non più dell'4.5% dell'intero

volume ematico). Il volume di sangue inoculato, il tipo e la quantità di flaconi seguono delle tabelle dedicate come per esempio quella presente nelle linee guida IDSA ^(18,5). Può essere utilizzato solo il flacone per germi aerobi, riservando il flacone per anaerobi ai soli pazienti ad alto rischio (infezioni croniche orali o dei seni, celluliti, ferite da morso, flebiti settiche e pazienti neutropenici in trattamento con steroidi) ⁽⁵⁾.

5.5 PROCEDURA DI PRELIEVO

Il prelievo di sangue per emocoltura rappresenta è il momento critico per il rischio di contaminazione del campione, responsabile dei falsi positivi, con ricadute cliniche ed economiche significative per le prescrizioni inappropriate. Ecco perché è fondamentale la corretta procedura di **antisepsi della cute**. La contaminazione può avvenire a partire da una serie di fonti ⁽⁴⁾:

- la cute del paziente
- i presidi e i dispositivi utilizzati per prelevare i campioni e trasferirlo nei flaconi per emocoltura
- le mani dell'operatore
- l'ambiente circostante.

Tuttavia la causa più frequente rimane la mancata o impropria antisepsi della cute. Secondo la letteratura il massimo valore accettabile di contaminazioni delle emocolture è del 3% ⁽⁵⁾.

Cosa fondamentale è l'igiene delle mani con gel idroalcolico o con acqua e sapone, inclusi i polsi e gli spazi fra le dita, per almeno 30'' prima di indossare i guanti monouso e procedere con l'antisepsi cutanea del sito di prelievo. L'igiene delle mani deve essere effettuata anche subito dopo la rimozione dei guanti.

L'antisepsi della cute deve essere eseguita utilizzando clorexidina 2% in alcool isopropilico 70%.

Il sito prescelto va disinfettato operando lo *scrubbing* cute di 6-7 cm di diametro per 30'', attendendo poi altri 30'' perché l'antisettico si asciughi.

Non toccare il sito del prelievo dopo averlo disinfettato.

Nei pazienti allergici alla clorexidina può essere utilizzato iodopovidone 10% per 120''.

Secondo la nota AIFA del 2018 l'uso di clorexidina è raccomandato con cautela nei neonati con meno di 2 mesi di età; per tale motivo si devono utilizzare dosi minime oppure ancora meglio, dispositivi predosati.

Nel caso in cui vengano utilizzati per il prelievo cateteri venosi, periferici e centrali, occorre fare grande attenzione alla disinfezione delle valvole di accesso utilizzate (utilizzare per la disinfezione clorexidina 2% in alcool isopropilico 70%) per un minimo di 30'' e fare asciugare il disinfettante prima di effettuare il prelievo.

Inoltre va considerato che il tappo dei flaconi da inoculare non è sterile e pertanto deve essere disinfettato prima dell'inoculo con prodotto di composizione analoga all'antisettico usato per la disinfezione della cute.

Invitare il paziente a girare il capo dalla parte opposta durante la procedura oppure far indossare una mascherina chirurgica.

5.6 TECNICA E SICUREZZA DEL PRELIEVO

Per l'esecuzione del prelievo per emocoltura devono essere utilizzati materiali e tecniche che garantiscono la sicurezza dell'operatore poiché il paziente è probabilmente portatore di patogeni. Per questo, come da raccomandazioni internazionali e Direttiva europea, per i prelievi emocolturali **deve essere vietato l'uso di siringhe** ed adottati dispositivi che garantiscono la sicurezza del paziente e dell'operatore sanitario: set per prelievo con ago a farfalla dotato di meccanismo di sicurezza e adattatore per prelievo multiplo per la raccolta del sangue direttamente nei flaconi.

5.6.1 Esecuzione di emocoltura da vena periferica (per la procedura corretta è preferibile la presenza di due operatori)

- Lavare le mani
- Indossare guanti monouso
- Applicare il laccio emostatico
- Scegliere vena e sito per il prelievo
- Togliere il laccio emostatico
- Rimuovere il tappo dal flacone per emocoltura; coprire con tampone imbevuto di antisettico a base alcolica, fino all'inoculo del sangue
- Rimuovere i guanti monouso
- Indossare la mascherina chirurgica
- Lavare le mani
- Indossare guanti sterili
- Posizionare il telo sterile
- Disinfettare il sito prescelto (area di 6-7 cm) con clorexidina al 2% e attendere almeno 30'' che l'antisettico si asciughi. Nei pazienti allergici usare iodopovidone 10% ed attendere 120''
- Applicare il laccio emostatico chiedendo supporto ad un altro operatore facendo attenzione a non contaminare la zona disinfettata
- Eseguire il prelievo
- Mantenere il flacone del brodo di coltura in posizione verticale al di sotto del braccio del paziente
- Riempire per primo il flacone aerobio
- Riempire il terreno di coltura con adeguata quantità di sangue (per gli adulti 8/10 ml per flacone; in caso di utilizzo di sistemi sottovuoto, aspirare fino alla cessazione spontanea dell'aspirazione da parte del sistema, accertandosi che il sangue abbia raggiunto il livello sufficiente indicato dal sistema di raccolta)
- Estrarre i flaconi dal Vacutainer e agitarli delicatamente

- A procedura ultimata rimuovere il laccio emostatico
- Attivare il sistema di sicurezza dell'ago utilizzato durante la rimozione dalla vena
- Smaltire il dispositivo utilizzato nell'apposito contenitore rigido per taglienti
- Praticare emostasi con tampone asciutto e bendaggio
- Rimuovere i guanti e lavare le mani
- Apporre l'etichetta identificativa del paziente sui flaconi senza coprire il codice a barre segnalando che il prelievo è stato fatto da vena periferica

5.6.2 Emocoltura da catetere venoso centrale (CVC/PICC)

- Effettuare prima il prelievo da vena periferica e subito dopo quello da CVC, possibilmente lato opposto alla cateterizzazione venosa
- Sospendere le infusioni in corso, se presenti
- Rimuovere il tappo del terreno di coltura e coprire la sommità con tampone imbevuto di antisettico a base alcolica
- Indossare i guanti sterili
- Posizionare telo sterile
- Disinfettare con garza sterile e clorexidina 2% in alcool isopropilico al 70% l'hub del catetere dopo avere rimosso il dispositivo a valvola per 30"
- Lasciare asciugare per 30"
- Connettere la camicia del vacutainer direttamente all'hub del catetere e inserire i flaconi nella camicia. Aspirare fino alla cessazione spontanea dell'aspirazione da parte del sistema sottovuoto, accertandosi che il sangue abbia raggiunto il livello sufficiente indicato dal sistema di raccolta
- **Va prelevato prima il campione aerobio e poi quello anaerobio in modo che tutta l'aria sia eliminata dal sistema**
- In caso di mancato reflusso ematico oppure di catetere valvolato collegare una siringa da 10 ml all'hub e aspirare 8/10 ml di sangue
- Dopo la deconnessione del Vacutainer o della siringa, eseguire lavaggio pulsante con siringa da 20 ml riempita con soluzione fisiologica
- In caso di CVC a più lumi, sarebbe corretto effettuare il prelievo da ogni singolo lume, ma per evitare la sottrazione di ampi volumi ematici si consiglia di effettuare il prelievo dal lume distale
- Smaltire i rifiuti negli appositi contenitori
- Apporre l'etichetta identificativa del paziente sui flaconi senza coprire il codice a barre segnalando che il prelievo è stato fatto da CVC

5.6.3 Emocolture da catetere venoso centrale a lungo termine totalmente impiantato (Port)

- Effettuare prima il prelievo da vena periferica e subito dopo quello da Port
- Lavare le mani
- Indossare DPI
- Preparare il campo sterile con il materiale necessario
- Disinfettare la cute con clorexidina 2 % in alcool isopropilico al 70%; iodopovidone al 10% in caso di pazienti allergici alla clorexidina
- Preparare la siringa da 20 ml e la siringa da 10 ml, entrambe con soluzione fisiologica
- Identificare il *reservoir* del port mantenendolo fra pollice e indice, usando il dito medio come terzo appoggio
- Perforare la cute con l'ago di Huber oltrepassando la membrana fino a percepire il rumore di contatto con il metallo
- Connettere la camicia del vacutainer alla prolunga dell'ago di Huber e inserire le provette all'interno di essa. Nel caso di difficoltà ad aspirare il sangue con il Vacutainer, aspirare sangue con siringa da 20 ml
- Al termine del prelievo chiudere il morsetto e scollegare il Vacutainer
- Connettere la siringa da 10 ml contenente soluzione fisiologica
- Deconnettere la siringa da 10 ml
- Rimuovere l'ago tenendo con la mano non dominante la camera
- Se il catetere è in uso, effettuare solo lavaggio con soluzione fisiologica e non rimuovere l'ago di Huber
- Accertarsi che la sicurezza dell'ago sia stata attivata
- Cestinare nel contenitore dei taglienti gli aghi utilizzati e il rimanente del materiale nel contenitore per rifiuti ospedalieri
- Togliere i guanti e lavarsi le mani
- Apporre l'etichetta identificativa del paziente sui flaconi senza coprire il codice a barre segnalando che il prelievo è stato fatto da Port

N.B. Prima di effettuare il prelievo per emocoltura è necessario effettuare la richiesta sul sistema informatico ospedaliero specificando se il prelievo è da vena periferica o da CVC, ecc, in modo da stampare l'etichetta corretta da apporre sul contenitore del campione biologico da esaminare.

6. TRASPORTO DEI CAMPIONI IN LABORATORIO

Il trasporto dei flaconi inoculati al laboratorio e la relativa **tempistica** sono parte integrante della corretta esecuzione dell'esame e coinvolgono aspetti tecnici ed organizzativi. Tutti i microbi crescono, si moltiplicano e muoiono molto rapidamente: se ognuno di questi eventi accade durante il prelievo, il trasporto o la conservazione del campione, i risultati dell'analisi saranno

	<p>PROCEDURA OPERATIVA PER L'ESECUZIONE DELL'EMOCOLTURA</p>	<p>Revisione 00 Maggio 2024 13 di 17</p>
---	---	---

compromessi e la loro interpretazione può essere errata. L'attenzione alla gestione preanalitica dei campioni microbiologici è quindi critica per l'accuratezza del test ⁽⁵⁾.

Secondo le linee guida ⁽⁶⁾:

- i flaconi dovrebbero essere **incubati** immediatamente e comunque **entro 2 ore** dal prelievo, poiché la lunga permanenza all'esterno dei sistemi di incubazione automatica potrebbe causare una mancata positivizzazione da parte dello strumento ⁽²¹⁾, in quanto la crescita microbica potrebbe aver raggiunto la fase stazionaria fuori dal sistema, quindi non essere più rilevabile, e per una possibile sofferenza microbica, con conseguente mancata crescita dei microrganismi ⁽⁵⁾
- nell'attesa del trasporto in laboratorio, i flaconi vanno conservati a temperature ottimali (non superiori a 30 °C) e mai refrigerati a 4 °C o congelati
- in caso di impossibilità a consegnare immediatamente i flaconi, è possibile conservarli in reparto a temperatura ambiente per un massimo di 2 ore senza coprire con garze o cerotti il tappo dei flaconi
- i flaconi devono essere trasportati in sicurezza utilizzando gli appositi contenitori

I flaconi possono essere mandati in laboratorio H24 secondo le seguenti modalità:

- alla SSVD Microbiologia e Virologia (lunedì-sabato 08-20, domenica 08-14)
- alla Sezione d'Urgenza - S.C. Patologia clinica (turno notturno feriale 20-08 e festivi 14-08)

L'assenza di etichetta identificativa del paziente determina il rifiuto dei campioni.

7. ARRIVO IN LABORATORIO E INSERIMENTO IN MACCHINA

Nel laboratorio di Microbiologia del Policlinico Riuniti di Foggia è in funzione lo strumento *Bactec* (BD) per l'incubazione delle emocolture con un sistema di rilevazione in fluorescenza con incubazione continua in stazioni termostate con continua agitazione dei flaconi. E' possibile monitorare a distanza e in tempo reale la situazione di ciascun flacone (l'orario di inserimento nello strumento, l'orario e dopo quanti giorni si è positivizzato o negativizzato, se è in corso) mediante il sistema informatico *Epicenter*.

- Il personale tecnico del laboratorio controlla i flaconi per verificarne la conformità (volume di inoculo adeguato, etichettatura corretta) e la non conformità (volume inoculo <10 ml o > 10 ml, etichette invertite, stampa della stessa etichetta su più set di flaconi, posizionamento errato dell'etichetta sul flacone che va a coprire il codice a barre)
- Procede all'inserimento dei flaconi negli appositi alloggi di incubazione mediante lettura del codice a barre del flacone (differente tra aerobio ed anaerobio) e dell'etichetta identificativa del campione apposta nelle UO di provenienza

- Una volta in postazione, i flaconi sono posti ad agitazione e lettura continua: quest'ultima è legata ad un meccanismo su base ottica che sfrutta la produzione di anidride carbonica a barre del metabolismo batterico
- I flaconi aerobi e anaerobi hanno un periodo di incubazione di 5 giorni secondo quanto indicato dalle linee guida internazionali
- Da *Epicenter* viene trasmesso automaticamente al LIS del sistema informatico ospedaliero presente in laboratorio, 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 dei flaconi positivi è immediata e avviene tramite segnali ottici e acustici

8. GESTIONE DEI CAMPIONI POSITIVI

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 l'indagine batterioscopica che consiste nell'allestimento e l'osservazione al microscopio di un vetrino con striscio sottile sottoposto a colorazione di Gram. Devono essere valutate e annotate le caratteristiche morfologico-tintoriali dei microrganismi evidenziati al Gram classificandoli, in relazione alla morfologia (cocchi, bacilli, batteri pleomorfi, lieviti), alla colorazione di Gram nel caso di batteri (gram-positivi, gram-negativi e gram-variabili) e alla loro disposizione nello spazio (ad ammassi, a coppie, a corte catenelle, a lunghe catenelle, a ideogrammi cinesi ecc), con possibile riferimento al genere in caso dei cocchi gram-positivi (stafilococchi, streptococchi, enterococchi)
- La semina su terreni selettivi e non selettivi per batteri aerobi ed anaerobi
- Il risultato dell'esame microscopico viene comunicato telefonicamente al Medico di Reparto e aggiunto in calce alla cartella informatica in forma di commento scritto
- Il giorno stesso o il giorno successivo, dopo aver osservato la crescita batterica sui terreni, si procede all'identificazione batterica rapida tramite spettrometria di massa con tecnologia MALDI-TOF. Deve sempre essere valutata la purezza della coltura e la concordanza del risultato con il dato fornito dall'esame batterioscopico.
- In caso di crescita di Enterobatteri, Stafilococco aureo ed Enterococchi, si procede alla determinazione genotipica delle principali resistenze agli antibiotici: ESBL, CPE, MRSA, VRE
- I risultati degli esami rapidi verranno comunicati mediante telefono e per refertazione elettronica al Medico di reparto
- Si procede con l'identificazione biochimica e antibiogramma fenotipico (48-72 h dalla positivizzazione del flacone) partendo dalle colonie (Sistema *Vitek*)
- In presenza di Enterobatteri e batteri Gram negativi non fermentanti MDR, si procede con la microdiluzione in brodo come antibiogramma per il dosaggio di antibiotici di ultima generazione
- Anche in presenza di setticemie da *Candida spp.* si procede al dosaggio degli antimicotici con il metodo della microdiluzione in brodo

	<p>PROCEDURA OPERATIVA PER L'ESECUZIONE DELL'EMOCOLTURA</p>	<p>Revisione 00 Maggio 2024 15 di 17</p>
---	---	---

9. REFERTAZIONE

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 microrganismo, 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.

Il referto delle emocolture positive viene definito preliminare quando non tutti i flaconi componenti il set hanno terminato la lettura nel sistema automatico.

I campioni negativi verranno refertati a partire dal momento in cui il sistema automatico indica la mancata crescita microbica (dopo 5 giorni completi di incubazione per aerobi ed anaerobi).

In caso di positività di un solo flacone di un set di prelievo, dove si riscontri la crescita di cocci Gram positivi coagulasi negativi, si procede alla **sola** identificazione batterica ma non all'antibiogramma e si referta il campione come una probabile contaminazione.

Infezione catetere correlata: la diagnosi di infezione CVC correlata si deve basare sull'uso di emocolture comparative, i risultati ottenuti devono essere interpretati per confermare o meno la presenza di batteriemia o fungemia associata al CVC.

L'isolamento di uno stesso ceppo sia da CVC che da vena periferica, richiede la valutazione dei tempi di crescita del microrganismo, ovvero si calcola la differenza tra l'orario di positivizzazione del campione prelevato da CVC e quello del campione prelevato da sangue periferico.

È fortemente suggestiva di infezione CVC correlata, in assenza di altre fonti di infezione, quando il campione prelevato da CVC si positivizza almeno 120 minuti prima del campione prelevato da vena periferica. **Questo dato deve essere richiesto dal clinico al momento dell'accettazione o al momento della segnalazione.**

La positivizzazione solo del prelievo eseguito da CVC può essere considerato inconclusivo per la diagnosi di infezione CVC correlata, la positività potrebbe essere determinata da una colonizzazione del CVC oppure da una contaminazione durante la raccolta.

Se risultasse positiva solo l'emocoltura da prelievo eseguito da vena periferica l'indagine è inconclusiva per la diagnosi di infezione CVC correlata, ma deve essere valutata attentamente dal clinico.

In caso di negatività sia da prelievo da CVC che da vena periferica, l'infezione CVC correlata è improbabile.

10. RACCOMANDAZIONI

- ✓ Tutti i campioni biologici devono essere considerati potenzialmente infetti, gli operatori sanitari devono sempre adottare le precauzioni standard durante la raccolta e il trasporto del campione
- ✓ Nel caso in cui siano previsti anche esami emato-chimici, il prelievo per emocoltura deve essere effettuato per primo
- ✓ Quando si esegue il prelievo sia da vena periferica che da catetere venoso centrale, deve essere eseguito prima il prelievo da vena periferica, per evitare che le manovre al catetere centrale immettano microrganismi in circolo
- ✓ Si ricorda che il **Midline non è un CVC**, ma un catetere periferico lungo
- ✓ Il prelievo da vena periferica, quando possibile, dovrebbe essere fatto sull'arto opposto a quello in cui è inserito il CVC
- ✓ In caso di prelievo da accesso vascolare di tipo centrale NON deve essere eliminata la prima parte di sangue prelevato
- ✓ In caso di prelievo da accesso vascolare di tipo centrale occorre rimuovere il connettore senz'ago prima di eseguire il prelievo
- ✓ Se il catetere venoso centrale ha più lumi, va specificato il lume da cui è stato prelevato il campione per emocoltura.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour C et al.: *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA 2016; 315: 801-10
2. Schlapbach LJ, Kisson N, Alhawsawi A, Aljuaid MH, Daniels R, Gorordo-Delsol LA, Machado F, Malik I, Nsutebu EF, Finfer S, Reinhart K. *World Sepsis Day: a global agenda to target a leading cause of morbidity and mortality*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2020 ;319(3).
3. Suarez De la Rica A, Gilsanz F, Maseda E. *Epidemiologic trends of sepsis in western countries*, Ann Transl Med 2016; 4: 325
4. CDC. Vital Signs 2016. Disponibile online: www.cdc.gov/vitalsigns/pdf/2016-08-vitalsigns.pdf-*Making health care safer: Think sepsis. Time matters*. NHS. Taking blood cultures. A summary of best practice. Disponibile online: http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/2012011817812/http://hcai.dh.gov.uk/files/2011/03/Document_Blood_culture_FINAL_100826.pdf
5. CLSI. *Principles and procedures for blood culture: Approved Guideline*. CLSI document M47-A. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022
6. AMCLI ETS. Percorso Diagnostico " INFEZIONI DEL TORRENTE CIRCOLATORIO" - Rif. 2023-13, rev. 2023"
7. Thompson RJ, Evans B, Southerland J. *Collecting blood for culture*. Generalist Microbiology Tech Sample No.G-1. American Society of Clinical Patologists, 1991
8. Kirn TJ, Weinstein MP. *Update on blood cultures: how to obtain, process, report and interpret*. Clin Microbiol Infect 2013; 19:513-20
9. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W et al. *Surviving sepsis campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock*.2016. Intensive Care Med 2017; 43: 304-77
10. Li J, Plorde JJ, Carlson LG. *Effects of volume and periodicity on blood cultures*. J Microbiol 1994; 32: 2829-31

11. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP et al. *A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)*. Clin Infect Dis 2013; 57: e22-e12
12. Documento Italiano di Consenso "Procedure di esecuzione, trasporto e conservazione del prelievo per emocoltura in caso di sospetta sepsi" Associazione Microbiologi Clinici (AMCLI) Società Italiana di Farmacia (SIFO) Società Italiana di Microbiologia (SIM) Società Multidisciplinare per la Prevenzione delle Infezioni nelle Organizzazioni Sanitarie (SIMPIOS) Maggio 2018
13. Infusion Nurses Society (INS): "*Infusion Therapy Standards Practice*" 8° Edizione, Revisione 2021
14. Markwart R, Saito H, Harder T, Tomczyk S, Cassini A, Fleischmann-Struzek C, Reichert F, Eckmanns T, Allegranzi B. *Epidemiology and burden of sepsis acquired in hospitals and intensive care units: a systematic review and meta-analysis*. Intensive Care Med. 2020; 46(8).
15. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, et al. *Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016*. Intensive Care Med. 2017;43(3):304-377.
16. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, et al. *Levy Executive Summary: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for the Management of Sepsis and Septic Shock 2021*. Crit Care Med. 2021 Nov 1;49(11):1974-1982.
17. Lin HH, Liu YF, Tien N, Ho CM, Hsu LN, Lu JJ. *Evaluation of the blood volume effect on the diagnosis of bacteremia in automated blood culture systems*. J Microbiol Immunol Infect. 2013;46(1). 2013;46(1).
18. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, Gonzalez MD, Jerris RC, Kehl SC, Patel R, Pritt BS, Richter SS, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Snyder JW, Telford S 3rd, Theel ES, Thomson RB Jr, Weinstein MP, Yao JD. *A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology*. Clin Infect Dis. 2018;67(6).
19. Cogliati Dezza F, Curtolo A, Volpicelli L, Ceccarelli G, Oliva A, Venditti M. *Are Follow-Up Blood Cultures Useful in the Antimicrobial Management of Gram Negative Bacteremia? A Reappraisal of Their Role Based on Current Knowledge*. Antibiotics (Basel). 2020 11;9(12).
20. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS., Fridkin SK, Gorwitz RJ Kaplan SL, Karchmer AW, Levine DP, Murray BE, Rybak MJ, Talan DA ,Chambers HF *Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Infections in Adults and Children. CID 2011: 52.
21. Venturelli C, Righi E, Borsari L, Aggazzotti G, Busani S, Mussini C, Rumpianesi F, Rossolini GM, Girardis M. *Impact of Pre-Analytical Time on the Recovery of Pathogens from Blood Cultures: Results from a Large Retrospective Survey*. PLoS One. 2017; 12(1).

Allegato: BUNDLE EMOCOLTURA

BUNDLE EMOCOLTURA

estratto dalla Procedura Operativa per l'esecuzione dell'Emocoltura

L'Emocoltura va eseguita nei pazienti con una sospetta batteriemia, subito dopo la comparsa del sospetto clinico. Accanto alla febbre e al brivido, devono essere presi in considerazione altri parametri: anomalie della frequenza cardiaca (aumentata), della pressione sanguigna (ridotta o aumentata) e della frequenza respiratoria (aumentata), aumento degli indici infiammatori e comparsa di confusione mentale.

1. IGIENE DELLE MANI

Igienizzare le mani
indossare guanti
monouso e
preparare tutto il
materiale
necessario



2. ANTISEPSI CUTANEA

Eeguire l'antisepsi della cute del sito prescelto con Clorexidina 2% in alcool isopropilico al 70%, mediante *scrubbing* sulla cute (6/7 cm) per 30" e lasciare asciugare per 30".

(per i CVC: disinfezione delle valvole di accesso)

NON TOCCARE IL SITO DEL PRELIEVO DOPO AVERLO DISINFETTATO



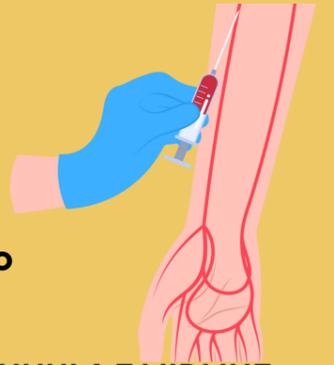
3. PREPARAZIONE DEI FLACONI

- Rimuovere i tappi di protezione dei flaconi
- disinfettare il diaframma di gomma dei flaconi (NON STERILE) con lo stesso presidio antisettico usato per la disinfezione della cute



4. PRELIEVO DA VENA PERIFERICA

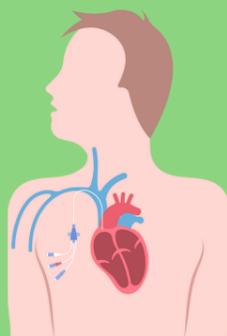
- eseguire il prelievo con tecnica asettica e con guanti sterili
- Effettuare prima il prelievo da vena periferica e poi quello da CVC
- riempire eventuali provette dopo aver eseguito le emocolture



NON ESEGUIRE PRELIEVI DA AGHI CANNULA E MIDLINE

5. PAZIENTE CON C.V.C./PICC/PORT

eseguire da singolo prelievo o da più prelievi ad intervalli ravvicinati da un minimo di 2 a un massimo di 3 set (4-6 flaconi totali)



IL PRELIEVO DA VENA PERIFERICA VA ESEGUITO SUL LATO OPPOSTO A QUELLO IN CUI E' INSERITO IL CVC

6. PRELIEVO

- utilizzare sistema a vuoto (Vacutainer) da connettere a dispositivi dotati di meccanismi di sicurezza (evitare uso di siringhe)
- inserire almeno 8ml di sangue per flacone e non superare mai i 10 ml
- mantenere i flaconi in posizione verticale.



RIEMPIRE PRIMA IL FLACONE AEROBI (TAPPO BLU) POI IL FLACONE ANAEROBI (TAPPO FUCSIA)

7. TRASPORTO IN LABORATORIO

Inviare in laboratorio immediatamente o al massimo entro due ore conservando i campioni a temperatura ambiente.

nelle ore di chiusura del laboratorio di microbiologica consegnare i campioni al laboratorio URGENZE



NON COPRIRE CON GARZE O CEROTTI I FLACONI

8. RACCOMANDAZIONI

Eeguire le emocolture prima dell'inizio di terapia antibiotica

Se in corso terapia antibiotica: eseguire il prelievo prima di una nuova somministrazione

