

## MIGLIORAMENTO DEL PROCESSO ANALITICO DELLE EMOCOLTURE NELLE SEPSI E RIDUZIONE DEL TAT

Alessia Cabrini<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**B**lood culture is a gold standard laboratory technique for the microbiological diagnosis of bacteremia or sepsis, with the aim of detecting the presence of microorganisms (bacteria or fungi) which, once the host's immune defenses are overcome, are poured into the blood causing severe clinical pictures<sup>(1)</sup>. The effectiveness and clinical significance of blood culture in the diagnosis of bacteremia or sepsis depend on multiple methodological and interpretative aspects<sup>(2)</sup>.

In the preanalytic phase the withdrawal modalities, the number of blood culture samples and the Tourn Around Time (TAT), the time interval between the decision of the clinician to request a laboratory assessment and the receipt of its result, represent elements of fundamental importance for rapid diagnosis and targeted therapy.

This project includes the present project to improve the analytical process of the emocolture, conducted in the UOC of Microbiology and Virology of the University Hospital of Padua, in order to verify the possibility of reducing the TAT of blood cultures carried out following the clinical suspicion of sepsis, using a new automated **BacT / ALERT® VIRTUO™ (Biomerieux)** microbial detection system compared to the traditional **BacT / ALERT® 3D (Biomerieux)** method, which in addition to demonstrating greater functionality in the preanalytic phase, should above all highlight the ability to identify more quickly the pathogens of the blood infections.

**L'**emocoltura è una tecnica di laboratorio gold standard per la diagnosi microbiologica di batteriemia o sepsi, con lo scopo di individuare la presenza di microrganismi (batteri o funghi) che superate le difese immunitarie dell'ospite si riversano nel sangue causando quadri clinici severi<sup>(1)</sup>. L'efficacia ed il significato clinico dell'emocoltura nella diagnosi di batteriemia o sepsi dipendono da molteplici aspetti metodologici ed interpretativi<sup>(2)</sup>.

Nella fase preanalitica le modalità di prelievo, il numero dei campioni di emocoltura e il Tourn Around Time (TAT), cioè l'intervallo di tempo che intercorre tra la decisione del clinico di richiedere un accertamento di Laboratorio e la ricezione del suo risultato, rappresentano elementi di fondamentale importanza per una diagnosi rapida e una terapia mirata.

In questo ambito si inserisce il presente progetto di miglioramento del processo analitico delle emocolture, condotto nella U.O.C di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova, al fine di verificare la possibilità di ridurre il TAT delle emocolture eseguite a seguito del sospetto clinico di sepsi, utilizzando un nuovo sistema automatizzato di rilevamento microbale **BacT / ALERT® VIRTUO™ (Biomerieux)** rispetto al tradizionale metodo **BacT / ALERT® 3D (Biomerieux)**, che oltre a dimostrare una maggiore funzionalità nella fase preanalitica, dovrebbe evidenziare soprattutto la capacità di individuare più rapidamente i patogeni delle infezioni del sangue.

<sup>1</sup> UOC Microbiologia Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova,  
Dottore Magistrale in Tecniche Sanitarie Diagnostiche,  
Presidente Nazionale ANTEL

**Parole chiave:**  
microbiologia, sepsi,  
laboratorio, emocolture,  
diagnosi

**Keywords:**  
microbiology, lab test,  
blood cultures, sepsis, diagnosis

This article was published on  
September 20, 2018,  
at SIMEDET.EU.

doi.org/10.30459/2018-15  
Copyright © 2018 SIMEDET.

**BACKGROUND**

**L**e infezioni ematiche sono associate ad alta morbilità e mortalità nei pazienti ospedalizzati.

In Europa, la sepsi si presenta in oltre il 35% dei pazienti ricoverati in terapia intensiva e oltre il 50% dei pazienti che vanno incontro a shock settico non sopravvivono.

La rapida rilevazione dei microrganismi nel sangue mediante emocoltura ha un ruolo essenziale nella diagnosi ed è uno dei compiti cardine del Laboratorio di Microbiologia. Numerosi sono i microrganismi che possono raggiungere il torrente ematico, batteri “comuni”, micobatteri, miceti, virus e in casi particolari anche elminti.

L'emocoltura costituisce dunque un mezzo di grande utilità diagnostica per poter pervenire ad una diagnosi accurata di infezione da batteri e miceti nel torrente circolatorio. Tale esame non è idoneo per la ricerca di parassiti, virus e micobatteri.

Secondo i criteri dei Centers for Disease and Prevention (CDC), si definisce come infezione ematica da batteri (bloodstream infection; BSI, in inglese), batteriemia, la presenza di batteri vitali nel sangue documentata da un'emocoltura positiva <sup>(3)</sup>.

I batteri possono penetrare nel sangue:

- da un focus d'infezione presente in un sito corporeo
- da una sede superficiale colonizzata da microrganismi, normalmente presenti, che riescono ad oltrepassare la cute o le mucose a causa di soluzioni di continuità delle stesse
- dal tratto gastrointestinale
- attraverso dispositivi come i cateteri intravascolari o nel corso di manipolazioni, interventi chirurgici o indagini diagnostiche di vario tipo.

Le batteriemie possono essere classificate in transitorie, intermittenti, persistenti o continue; in particolare la batteriemia persistente è caratterizzata dal fatto che numerose, ripetute emocolture risultano positive per un lungo periodo, da parecchie ore a diversi giorni.

Tali batteriemie si verificano particolarmente nei processi a sede intravascolare come l'endocardite, la tromboflebite settica, l'arterite, l'aneurisma micotico. Una batteriemia persistente si verifica anche durante i primi stadi di alcune infezioni batteriche sistemiche, come la brucellosi e la febbre tifoide <sup>(4)</sup>.

La percentuale di positività che riflette il carattere transitorio, intermittente o continuo della batteriemia nelle diverse condizioni cliniche è la seguente: 85 – 95 % nelle endocarditi ed infezioni endovascolari, 80 – 90 % nell'epiglottite acuta, 50 – 80 % nella meningite batterica, 30 – 50 % nella pielonefrite ascendente, 30 – 50 % nell'osteomielite ematogena, 5 – 30 % nella polmonite batterica <sup>(5) (6)</sup>.

Varia negli ascessi endoaddominali e varia nella febbre di origine sconosciuta.

**BATTERIEMIA CATETERE CORRELATA:**

Una temibile complicanza associata alla presenza di un catetere venoso centrale (CVC), e/o di altri cateteri endovascolari a permanenza, è rappresentata dal possibile instaurarsi di una infezione dovuta a microrganismi che si annidano in biofilm adesi alla superficie interna dei cateteri (colonizzazione della cannula o hub) o che prima colonizzano la superficie esterna, causando infezione poi, a partire dalla sede di inserzione della cannula (o exit site) <sup>(7)</sup>.

Nella pratica quotidiana, per ogni emocoltura in età adulta si utilizza un SET di flaconi da inoculare; il SET per l'età adulta è costituito da un flacone per aerobi (BacT/Alert FA o FAPLUS a tappo verde) ed uno per anaerobi (BacT/Alert FN o FNPLUS a tappo arancione).

Nel sospetto di sepsi catetere correlata si raccomanda di eseguire in rapida sequenza, oltre al prelievo di un set tramite il catetere, anche il prelievo di un secondo set da vena periferica mediante venipuntura e di immettere la stessa quantità di sangue in ciascun flacone.

Nella pratica clinica, l'asepsi della cute, il numero di culture, e il volume di sangue sono i fattori più importanti per il rilevamento di batteriemia, oltre che la rapida consegna dei flaconi dal reparto al laboratorio il più presto possibile dopo il prelievo, al fine di ridurre il tempo di rilevamento della positività (8) (9).

La diagnosi di infezione catetere correlata si basa anche sull'uso di emocolture comparative (diagnosi conservativa), avendo avuto in precedenza l'accortezza di eseguire in rapida sequenza il prelievo sia da CVC che da vena periferica. Si pone diagnosi microbiologica di infezione CVC-correlata quando si ha la crescita di colonie morfologicamente identiche e appartenenti alla stessa specie microbica da entrambi i prelievi incubati contemporaneamente nella strumentazione automatizzata.

L'infezione è suggestiva soprattutto quando il campione prelevato da CVC presenta una crescita di batteri più rapida (120' nell'adulto, 150' nel bambino) rispetto a quello prelevato da vena periferica per gli stessi microrganismi.

Per TurnAround Time (TAT) s'intende l'intervallo di tempo che intercorre fra il momento del check-in dei flaconi pervenuti in laboratorio e la refertazione definitiva (10) (11).

Nella nostra U.O.C di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova, il TAT per le emocolture negative è attualmente di 5 giorni, mentre per quelle positive è di circa 48 ore dal momento della positivizzazione se vengono utilizzati i tradizionali metodi microbiologici per l'identificazione di specie e l'antibiogramma (12) (13).

Scopo del presente lavoro è la possibilità di ridurre sia il TAT delle emocolture a seguito del sospetto clinico di sepsi, che i tempi di incubazione delle stesse, identificando e valutando le principali criticità emerse nel nostro laboratorio utilizzando il tradizionale metodo di rilevamento microbale **BacT/ ALERT® 3D** rispetto al nuovo sistema automatizzato **BacT / ALERT® VIRTUO™** (14).

### NUMEROSE SONO LE PROBLEMATICHE EMERSE CON IL METODO TRADIZIONALE (SISTEMA BACT/ALERT® 3D):

1) Il tempo pratico di carico e scarico delle bottiglie di emocolture che risulta essere prolungato ed indaginoso da parte dell'operatore; infatti risulta impiegare più tempo ad inserire i flaconi nell'incubatore nella fase iniziale dopo l'accettazione (check-in), soprattutto se si verificano problemi di etichettatura dei flaconi, ad es. per errata anagrafica del paziente, e successivamente nello scarico degli stessi poiché, non essendo automatizzato ma invece manuale, comporta un periodo maggiore (secondo uno studio del produttore Bactec/Alert® 3D ha richiesto più tempo pratico di BacT / ALERT VIRTUO (31,2 min vs 13 min) per il carico e lo scarico 200 bottiglie). Inoltre la capacità di contenimento dei flaconi non è particolarmente elevata (240 posti contro i 428 del Virtuo).

2) All'interno dell'incubatore le celle di contenimento dei flaconi di emocultura tendono a "sporcarsi" facilmente nel tempo, allarmando il sistema e richiedendo pertanto una calibrazione di qualità manuale da parte dell'operatore stesso.

3) I volumi dei flaconi (range di attendibilità +/- 10 ml di sangue) devono essere controllati visivamente prima del caricamento, non essendo il sistema BacT / ALERT® 3D automatizzato per questa fase.

4) La tracciabilità dei pazienti nel tempo risulta essere difficoltosa (es. in caso di rilevazione di "Falsi positivi"), rappresentando pertanto un problema in termini di rischio e sicurezza del paziente stesso. Per risolvere e migliorare tali criticità ed ottimizzare il flusso di lavoro della diagnostica delle emocolture dalla fase preanalitica alla fase analitica, è stato introdotto nel nostro Servizio di Laboratorio il nuovo sistema automatizzato BacT / ALERT® VIRTUO™ che dovrebbe dimostrare un'elevata e maggiore adeguatezza in termini di funzionalità, fornendo oltre che risultati efficienti e rapidamente attuabili, anche in via definitiva un miglioramento dell'outcome dei pazienti.

## METODI E MATERIALI

Nella nostra routine, i flaconi per emocoltura, dopo le procedure di prelievo, vengono inviati in laboratorio e incubati a 37° C negli incubatori automatici (sistema BacT/ALERT® 3D e VIRTUO).

I microrganismi eventualmente presenti nel campione metabolizzano i substrati presenti nel terreno di coltura producendo anidride carbonica.

La produzione di CO<sub>2</sub> fa sì che il sensore sul fondo del flacone assuma una colorazione più chiara.

Un diodo a emissione luminosa (LED) illumina il sensore e la luce riflessa viene misurata da un fotorivelatore.

In caso di rilevazione di una variazione lo strumento segnala il campione come positivo. In assenza di segnale di positività, i campioni rimangono in osservazione continua per complessivi 5 giorni prima di essere refertati come negativi.

Il segnale della presenza di microrganismi è costituito dal viraggio del colore del fondo dei flaconi dal colore verde (segnale di negatività) al colore giallo (segnale di crescita microbica).

Nel caso di viraggio verso il colore giallo, il campione deve essere seminato e deve essere allestito il vetrino per l'esame microscopico (Fig.1).

Con il nuovo sistema automatizzato BacT /ALERT® VIRTUO™, essendo dotato di un nuovo algoritmo per la lettura colorimetrica più sensibile, si evidenzia una maggiore capacità di rilevazione della Crescita batterica rispetto a quelle dell'incubatore tradizionale, con un'abbreviazione del segnale di positività del campione di emocoltura per la determinata specie batterica.

Seguendo le indicazioni del produttore (Biomérieux) per il controllo di qualità delle performance di crescita batterica, nel nostro Laboratorio si eseguono mensilmente dei CQI, inoculando dei ceppi ATCC nei flaconi di emocolture in uso accettati e trattati come qualunque campione clinico secondo una specifica procedura laboratoristica.

I flaconi dovendo simulare una emocoltura positiva, devono essere inoculati con una concentrazione standardizzata di microrganismi (400 UFC/flacone) a cui viene aggiunto del brodo Muller Hinton Blood in quantità di 1-2 ml costituendo così il surrogato del sangue umano.

I microrganismi utilizzati sono rappresentati da un ceppo ATCC 25285 di *Bacteroides fragilis* che è stato inoculato nel set di emocolture per adulti, e da un ceppo ATCC49619 di *Streptococcus pneumoniae* inoculato nel flacone pediatrico.

Entrambi, il set per adulti e il flacone pediatrico, sono stati messi ad incubare il più rapidamente possibile, in ognuna delle unità BacT/Alert® 3D e nell'incubatore BacT/Alert® VIRTUO™.

Dai risultati attesi, tutti gli organismi devono risultare positivi entro 48 ore, quelli anaerobi devono risultare positivi entro 72 ore. Nel flacone aerobio del set per adulti non deve esserci crescita.

Dalla messa in funzione di BacT/Alert® VIRTUO™ sono state eseguite tre prove di qualità nei tre incubatori (BacT/Alert 1, BacT/Alert 2 e Virtuo) attualmente presenti nel nostro laboratorio, nel periodo da **Marzo a Maggio 2018**.

FIG. 1: FLACONI BACT/ALERT



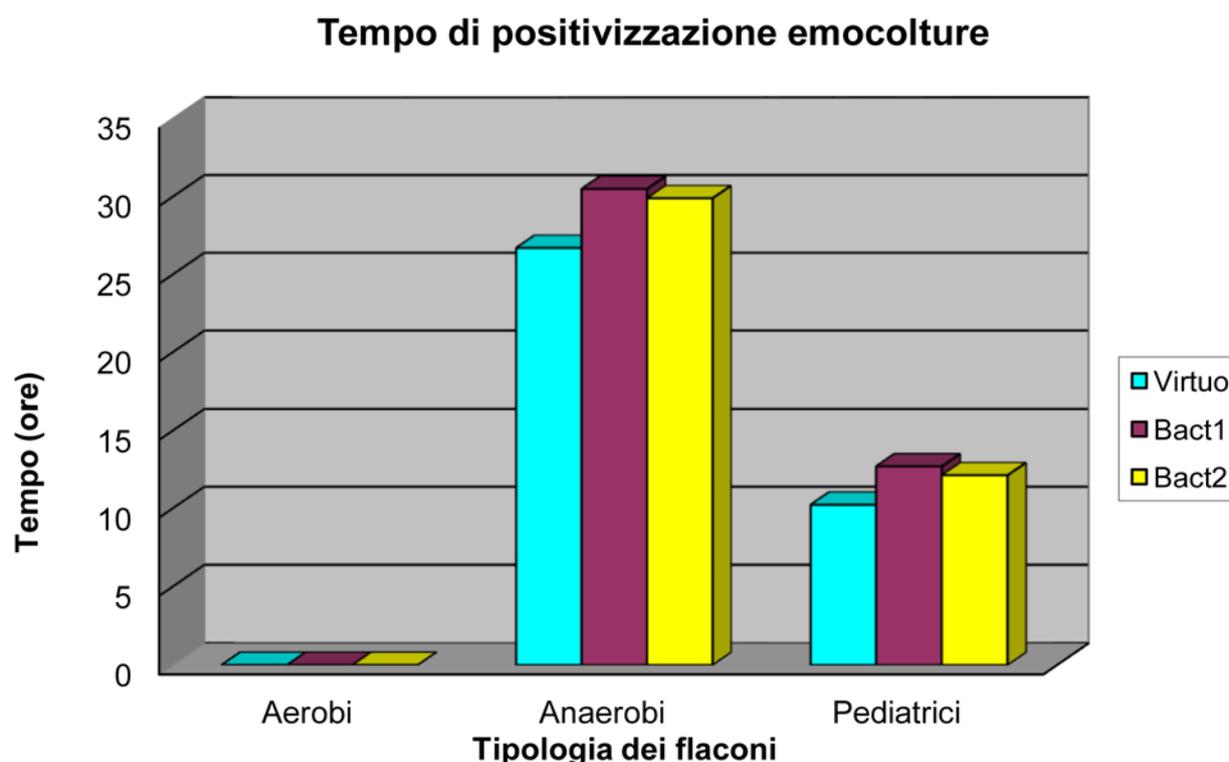
- . **Fondello giallo: positività**
- . **Fondello verde: negatività**

**RISULTATI** Dall'analisi dei risultati strumentali risulta che la media del tempo di crescita batterica dei ceppi di microrganismi *Bacteroides fragilis* è di n.30.5 ore ( Bact/Alert 1) , di n. 29.9 ore ( Bact/Alert 2 ) e di n. 26.7 ore (Bact/Alert 3 Virtuo) .  
Mentre per i ceppi di *Streptococcus pneumoniae* il tempo medio di positività batterica è di n. 12.7 ore ( Bact/Alert 1) , di n. 12.13 ( Bact/Alert 2 ) e di n. 10.23 ore (Bact/Alert 3 Virtuo). ( **TABELLA 1** )

Prova QC Marzo 2018	RISULTATO STRUMENTALE POSITIVO
<b>BACT/ALERT 1</b>	Flacone aerobio: nessuna crescita Flacone anaerobio : <i>Bacteroides fragilis</i> ore 27.7 Flacone pediatrico : <i>Streptococcus pneumoniae</i> ore 13.0
<b>BACT/ALERT 2</b>	Flacone aerobio: nessuna crescita Flacone anaerobio : <i>Bacteroides fragilis</i> 27.5 Flacone pediatrico : <i>Streptococcus pneumoniae</i> 12.6
<b>VIRTUO</b>	Flacone aerobio: nessuna crescita Flacone anaerobio : <i>Bacteroides fragilis</i> 26.9 Flacone pediatrico : <i>Streptococcus pneumoniae</i> 10.7
Prova QC Aprile 2018	RISULTATO STRUMENTALE POSITIVO
<b>BACT/ALERT 1</b>	Flacone aerobio: nessuna crescita Flacone anaerobio : <i>Bacteroides fragilis</i> ore 35.0 Flacone pediatrico : <i>Streptococcus pneumoniae</i> ore 13.3
<b>BACT/ALERT 2</b>	Flacone aerobio: nessuna crescita Flacone anaerobio : <i>Bacteroides fragilis</i> ore 33.5 Flacone pediatrico : <i>Streptococcus pneumoniae</i> ore 12.1
<b>VIRTUO</b>	Flacone aerobio: nessuna crescita Flacone anaerobio : <i>Bacteroides fragilis</i> ore 26.8 Flacone pediatrico : <i>Streptococcus pneumoniae</i> ore 10.1
Prova QC Maggio 2018	RISULTATO STRUMENTALE POSITIVO
<b>BACT/ALERT 1</b>	Flacone aerobio: nessuna crescita Flacone anaerobio : <i>Bacteroides fragilis</i> ore 28.8 Flacone pediatrico : <i>Streptococcus pneumoniae</i> ore 12.0
<b>BACT/ALERT 2</b>	Flacone aerobio: nessuna crescita Flacone anaerobio : <i>Bacteroides fragilis</i> ore 28.8 Flacone pediatrico : <i>Streptococcus pneumoniae</i> ore 11.7
<b>VIRTUO</b>	Flacone aerobio: nessuna crescita Flacone anaerobio : <i>Bacteroides fragilis</i> ore 26.6 Flacone pediatrico : <i>Streptococcus pneumoniae</i> ore 9.9

Si evidenzia un trend positivo a favore di **BacT / Alert 3 Virtuo** con una riduzione del tempo di incubazione di almeno **4 ore** ( $\approx 15\%$ ) per la crescita del microrganismo *Bacteroides fragilis* e di circa **2-3 ore** ( $\approx 16\%$ ) per lo *Streptococcus pneumoniae*. (FIG. 2)

FIG. 2



**CONCLUSIONS** Riducendo l'incubazione si hanno dei vantaggi; in primis la possibilità di ridurre il TAT delle emocolture eseguite a seguito del sospetto clinico di sepsi, e l'interruzione della terapia antibiotica empirica nei pazienti con emocolture negative, con una conseguente migliore compliance e gestione, riduzione dei tempi di degenza e dei costi della spesa sanitaria.

In conclusione si può affermare che l'utilizzo del nuovo sistema automatizzato **BacT / ALERT® VIRTUO™** rappresenta sicuramente una risposta più adeguata di quella fornita dal tradizionale incubatore microbiale Bact/Alert® 3D dimostrando una maggiore funzionalità nella gestione del processo delle emocolture dalla fase preanalitica alla fase analitica

evidenziando soprattutto la capacità di individuare più rapidamente i patogeni delle infezioni del sangue con conseguente miglioramento del processo.

Inoltre con la misurazione in automatico del volume dell'inoculo, **BacT / ALERT® VIRTUO™** fornisce un dato oggettivo utilizzabile per aggiornamenti mirati con i reparti ospedalieri sulle modalità di prelievo delle emocolture.

**BIBLIOGRAFIA**

1. XXXVII Congresso Nazionale AMCLI - Infezioni del torrente circolatorio. Stresa, 5-8 ottobre 2008
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Principles and Procedures for Blood Cultures, Approved Guidelines*. CLSI M47-A 2007 ( ISBN 1-56238-641-7)
3. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. In: Olmsted RN, ed. *APIC infection control and applied epidemiology: principles and practice*. St. Louis: Mosby, 1996:A1-20.
4. Seifert H. *The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections*. Clin Infect Dis. 2009 May 15; 48 Suppl 4:S238-45.
5. Urbano P. *l'emocoltura* <http://www.ao.careggi.toscana.it/microbiologia.htm>, 2009
6. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. In: Olmsted RN, ed. *APIC infection control and applied epidemiology: principles and practice*. St. Louis: Mosby, 1996:A1-20.
7. *Clinical Practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America*
8. Horan T.C. et al. CDC/NHSN Surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *AJIC: American Journal of Infection Control*, June 2008 (Vol.36, Issue 5, pages 309-332)
9. *Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock*. *Intensive Care Med* 2013; 39(2): 165-228 and *Crit Care Med* 2013;41(2): 580-637
10. Andrew Lee et al. *Detection of Bloodstream infections in Adults: How many blood cultures are needed?* *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45(11):3546.
11. Baron E J et al. *A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)*
12. Doern GV1 et al. *Four-day incubation period for blood culture bottles processed with the Difco ESP blood culture system*. *J Clin Microbiol.* 1997 May;35(5):1290-2.
13. Soloaga R1 et al. *Utility of prolonged incubation and terminal subcultures of blood cultures from immunocompromised patients*. *Argent Microbiol.* 2001 Jul-Sep;33(3):177-81
14. [www.biomerieux.it/diagnostica-clinica/prodotti-e-servizi](http://www.biomerieux.it/diagnostica-clinica/prodotti-e-servizi)