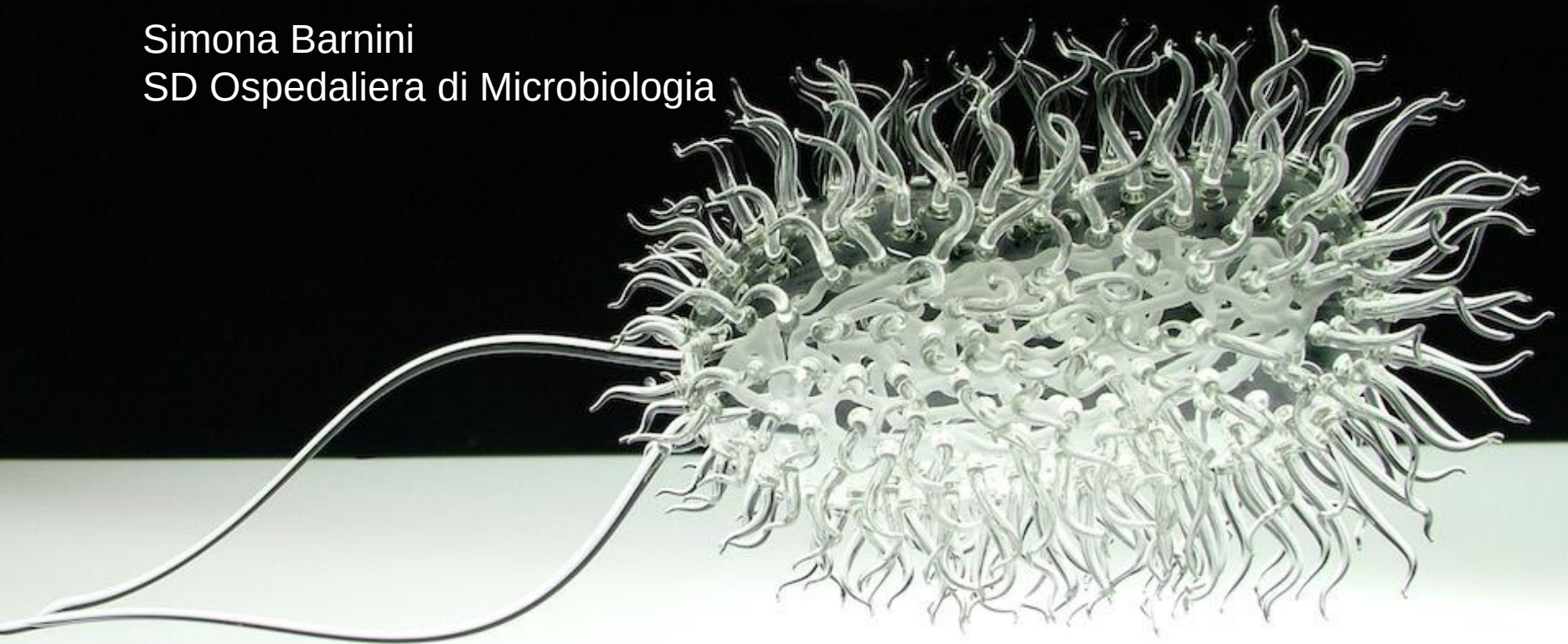


L'emocoltura e non solo

Simona Barnini
SD Ospedaliera di Microbiologia



Sfatiamo un mito: il sangue sterile

DNA batterico nel sangue; rinvenuto quello di diverse specie negli attuali studi sul microbioma umano

I metodi molecolari consentono di rivelare la presenza di geni batterici o fungini con elevata sensibilità, ma....
questi geni appartengono ad organismi vivi?
e cosa sappiamo sulla *clearence* del DNA batterico?

Batteriemia: quando ci laviamo i denti,
quando ci facciamo la barba,
quando ci depiliamo.... ma nessuno se ne accorge, in quanto svariate popolazioni di leucociti provvedono presto a ripulire

In caso di infezione, invece.....

...i leucociti non sono in grado di arginare la diffusione dei microrganismi e i sintomi sono ben presenti!

La differenza tra un sito di infezione localizzato e l'infezione del torrente circolatorio consiste, tra le altre cose, nella CARICA INFETTANTE; molto elevata nel primo caso, estremamente bassa nel secondo.

In corso di infezione sistemica, la carica microbica varia da 0,1 a 1 CFU per mL di sangue. Al microscopio (circa 1000 ingrandimenti) riusciamo a vedere un batterio quando la carica è di 10^4 batteri/mL*; questa quantità è quella discriminante, ad esempio, tra colonizzazione ed infezione per i campioni respiratori profondi.

Questo è il motivo principale per cui, sinora, non si è riusciti efficacemente a fare diagnosi diretta dal campione di sangue (mentre si può fare, ad esempio, su BAL) ma abbiamo bisogno di aumentare il numero dei batteri presenti per capire se ci sono e chi sono.

Ecco a cosa serve l'emocoltura!

*per poter vedere 1 batterio, dovremmo mettere su un vetrino da 10 a 100 litri di sangue!!!!

Nel sangue i batteri trovano molti antagonisti

I leucociti

I fattori del complemento

Numerose molecole che trasportano il ferro

Enzimi litici

Il sangue sarebbe un eccellente terreno di coltura, non fosse per la presenza di questi elementi: in laboratorio si usa l'agar sangue, sul quale crescono quasi tutti i batteri e miceti, e contiene solo il 5% di emazie

Quando mettiamo il sangue in coltura per evidenziare la presenza di microrganismi dobbiamo da un lato prendere abbastanza sangue da poter avere almeno 3 batteri in un flacone e dall'altro diluire il sangue in rapporto adeguato rispetto al brodo di coltura per evitare la distruzione dei batteri da parte dei fattori antimicrobici ematici

ECCO PERCHE' E' COSI' IMPORTANTE IL VOLUME DI SANGUE PRELEVATO

Come si fa il prelievo

L'obiettivo è prelevare il sangue senza contaminarlo con i batteri della cute, né del prelevato né del prelevatore

Stabilire quanto sangue prelevare e segnare il livello sul flacone

Individuare il sito del prelievo

Detergere la cute con etanolo al 70%, in modo centrifugo

Disinfettare con clorexidina o pvp-iodio e lasciar asciugare

Laccio emostatico

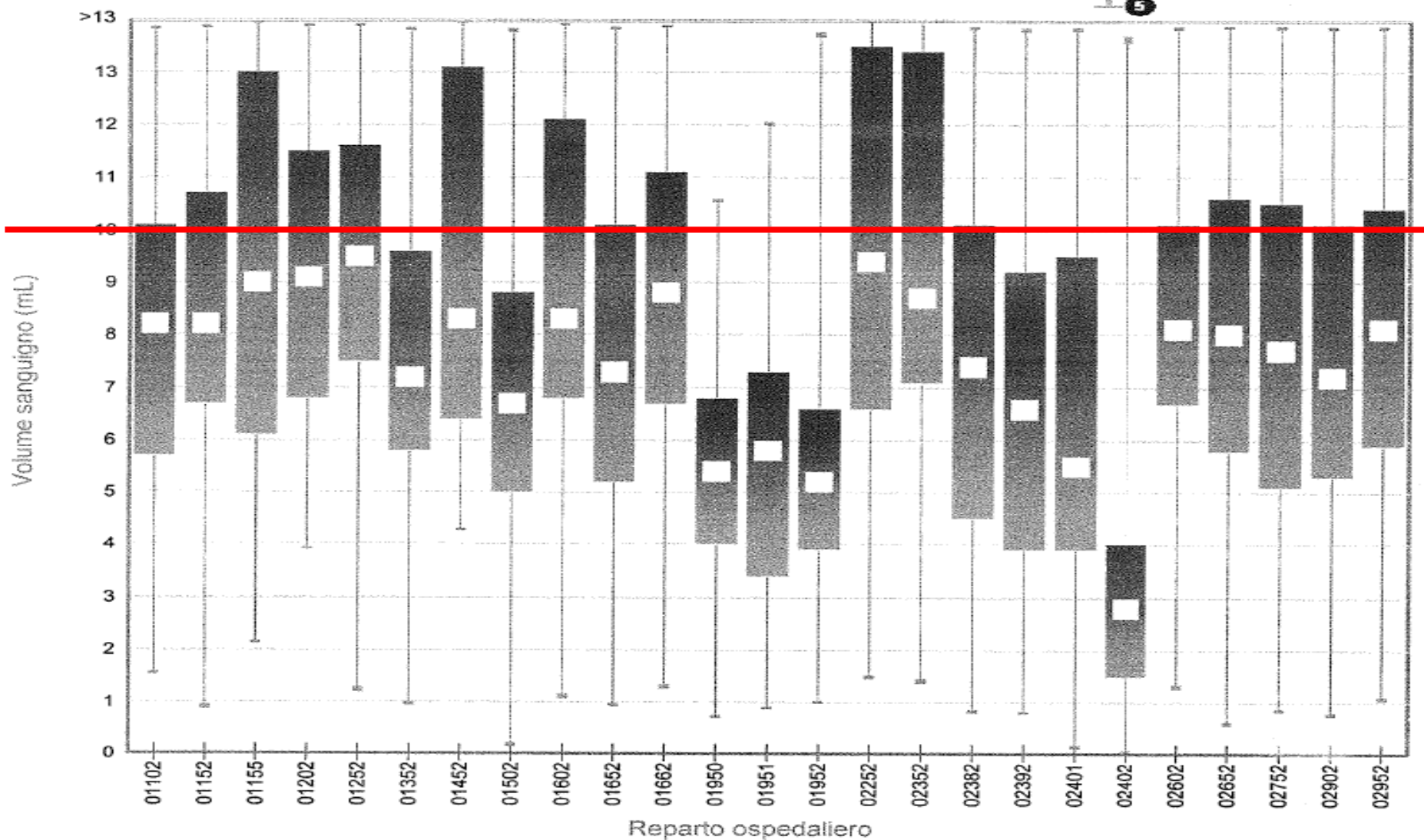
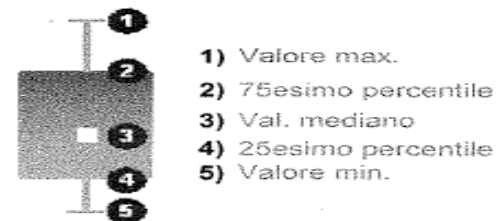
Se occorre palpare la vena per eseguire il prelievo, indossare guanti sterili

Prima il flacone aerobio, poi l'anaerobio

Non coprire il codice a barre del flacone con l'etichetta del paziente

Mantenere i flaconi a **TEMPERATURA AMBIENTE** sinché non vengono inseriti nell'analizzatore

Quanto sono attenti i nostri prelevatori?



Emocolture: quante e quando

»

International Journal of Microbiology

Volume 2015 (2015), Article ID 827416, 10 pages

- Rapid Identification of Pathogens in Positive Blood Culture of Patients with Sepsis: Review and Meta-Analysis of the Performance of the Sepsityper Kit

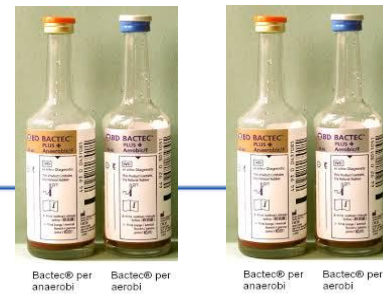
[Nils G. Morgenthaler](#)^{1,2} and [Markus Kostrzewa](#)²

¹Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany

²Bruker Daltonik GmbH, Fahrenheitstraße 4, 28359 Bremen, Germany

» *Use of Blood Cultures in Sepsis*

Blood cultures are an essential part of sepsis management. Existing guidelines give a clear recommendation: “To optimize identification of causative organisms, we recommend obtaining at **least two sets of blood cultures (both aerobic and anaerobic bottles) before antimicrobial therapy**, with at least one drawn percutaneously and one drawn through each vascular access device, unless the device was recently (<48 h) inserted.” [3] Although only 30–60% of blood cultures in sepsis become positive [14, 15], this method is one with the highest level of evidence in the diagnostic workup of a sepsis patient [3]. The time to positivity of a blood culture varies and depends much on the pathogen load, the type of pathogen, and its growth capacity [16, 17]. Other factors of influence include the volume of cultured blood taken, the presence of polymicrobial infection, the brand of blood culture bottles used, the time it takes for a culture bottle to reach an incubator, and the pretreatment of patients with antibiotics prior to sampling. So the median time to positivity is around 15 hours, but individual bottles may turn positive between just a few hours and several days [16, 17].



Aumentando i prelievi, aumenta la sensibilità dell'emocoltura

Current Approaches to the Diagnosis of Bacterial and Fungal Bloodstream Infections in the Intensive Care Unit

Patrick R. Murray, PhD; Henry Masur, MD

Crit Care Med. 2012;40(12):3277-3282. Effect of Blood Volume

The volume of blood cultured is a pivotal variable for the successful recovery of bloodstream pathogens: the more volume that is cultured, the higher the yield of the process.[10–15] Cockerill et al[13] documented a 29.8% increase in positive cultures when 20 mL of blood (divided into two bottles) were cultured compared with 10 mL of blood. Additional positive cultures were observed when 30 mL (13.4% increase vs. 20 mL) and 40 mL of blood (7.2% increase vs. 30 mL) were cultured. The blood culture yield also increases with the collection of additional blood cultures (consisting of 20 mL of blood divided

into two bottles). **Cockerill et al[13] also reported that when a minimum of four blood culture sets were collected within a 24-hr period, the yield increased with each additional culture drawn: 61.4% of the patients with blood stream pathogens had the causative organism detected with the first collected culture, 78.2% with the first two cultures, and 93.1% with the first three cultures. Lee et al[14] reported very similar data.**

Whereas patients with catheter-related sepsis, endocarditis, or other intravascular infections may be persistently bacteremic, most other infections are associated with intermittent bacteremia or fungemia. Although it is commonly believed that high-grade seeding of the blood corresponds to temperature elevations, Riedel et al[16] demonstrated in a multicenter study that timing collection of blood cultures with temperature elevations did not increase the yield of blood cultures.

Because clinical signs including fever and symptoms cannot be used to predict the optimum time for specimen collection, the Society for Critical Care Medicine, Infectious Diseases Society of America, Surviving Sepsis Campaign, and Clinical and Laboratory Standards Committee recommend that a minimum of two blood cultures consisting of 20–30 mL per culture (ideally one peripheral draw and one drawn through the catheter most suspicious of being infected if line sepsis is suspected) should be collected within a 30-min period when a septic patient is first evaluated, before antibiotics are administered or changed, and additional cultures should be collected over a 24-hr period.

In presenza di catetere.....

...prelevando un set di emocolture da vena periferica e un set da catetere, si può avere un'informazione aggiuntiva molto importante: se la sorgente dell'infezione è il catetere, il prelievo da catetere si positivizzerà PRIMA del prelievo da vena, di solito con **almeno due ore** di differenza

Differential Time to Positivity: A Useful Method for Diagnosing Catheter-Related Bloodstream Infections

Issam Raad, MD; Hend A. Hanna, MD, MPH; Badie Alakech, MD; Ioannis Chatzinikolaou, MD; Marcella M. Johnson, MS; and Jeffrey Tarrand, MD
Background: Catheter-related bloodstream infections are associated with recognized morbidity and mortality, especially in critically ill patients. Accurate diagnosis of such infections results in proper management of patients and in reducing unnecessary removal of catheters. Objective: To evaluate differential time to positivity as a method for diagnosing catheter-related bacteremias caused by both short-term and long-term use of central venous catheters. Design: Prospective study design

Differential Time to Positivity: A Useful Method for Diagnosing Catheter-Related Bloodstream Infections (PDF Download Available). Available from:

https://www.researchgate.net/publication/8933023_Differential_Time_to_Positivity_A_Useful_Method_for_Diagnosing_Catheter-Related_Bloodstream_Infections [accessed Sep 17, 2017]. Catheter-related bacteremias were more frequently caused by staphylococci and less likely to be associated with underlying hematologic malignant conditions, neutropenia, and longer duration of hospitalization. As a diagnostic tool for catheter-related bacteremia (using a composite definition reference standard according to the Infectious Diseases Society of America guidelines), differential time to positivity of 120 minutes or more was associated with 81% sensitivity and 92% specificity for short-term catheters and 93% sensitivity and 75% specificity for long-term catheters. Differential time to positivity of 120 minutes or more is highly sensitive and specific for catheter-related bacteremia in patients who have short- and long-term catheters.

Cosa succede alla emocoltura?

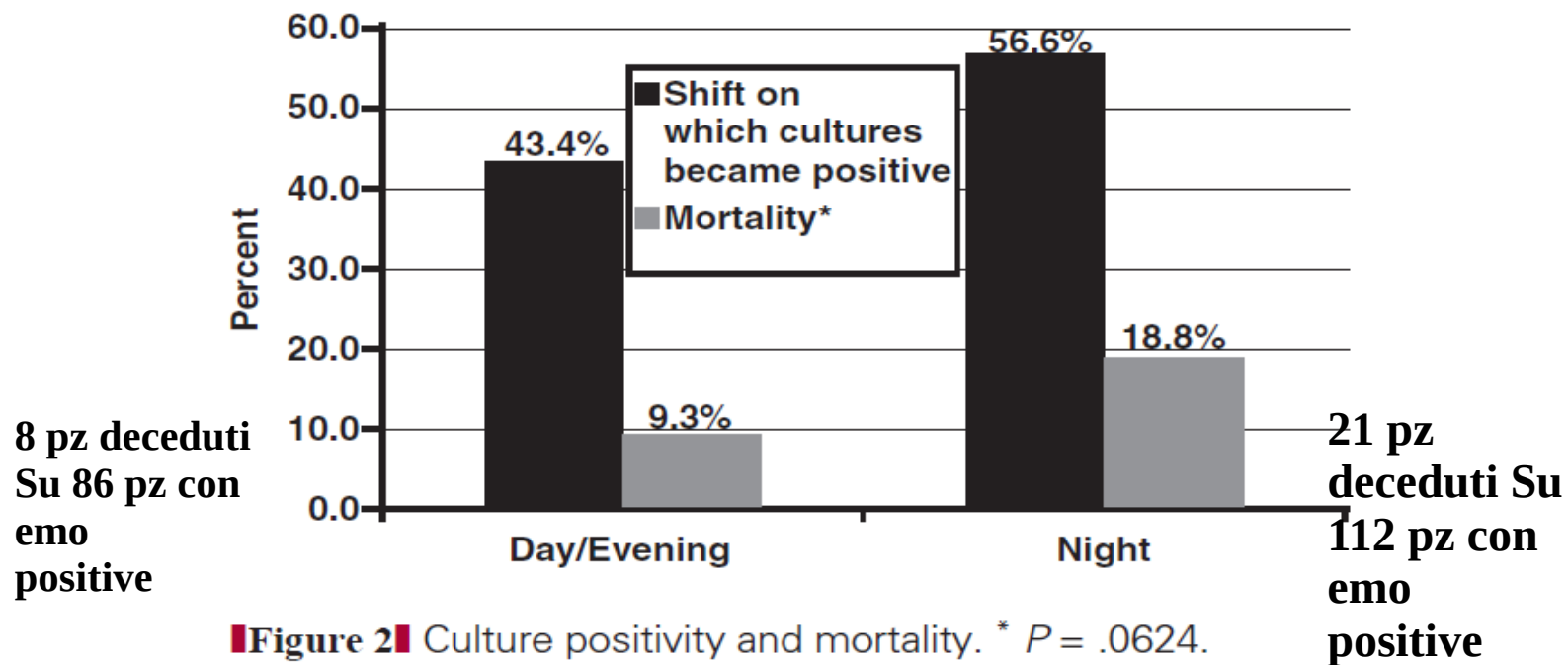


Monitoraggio continuo

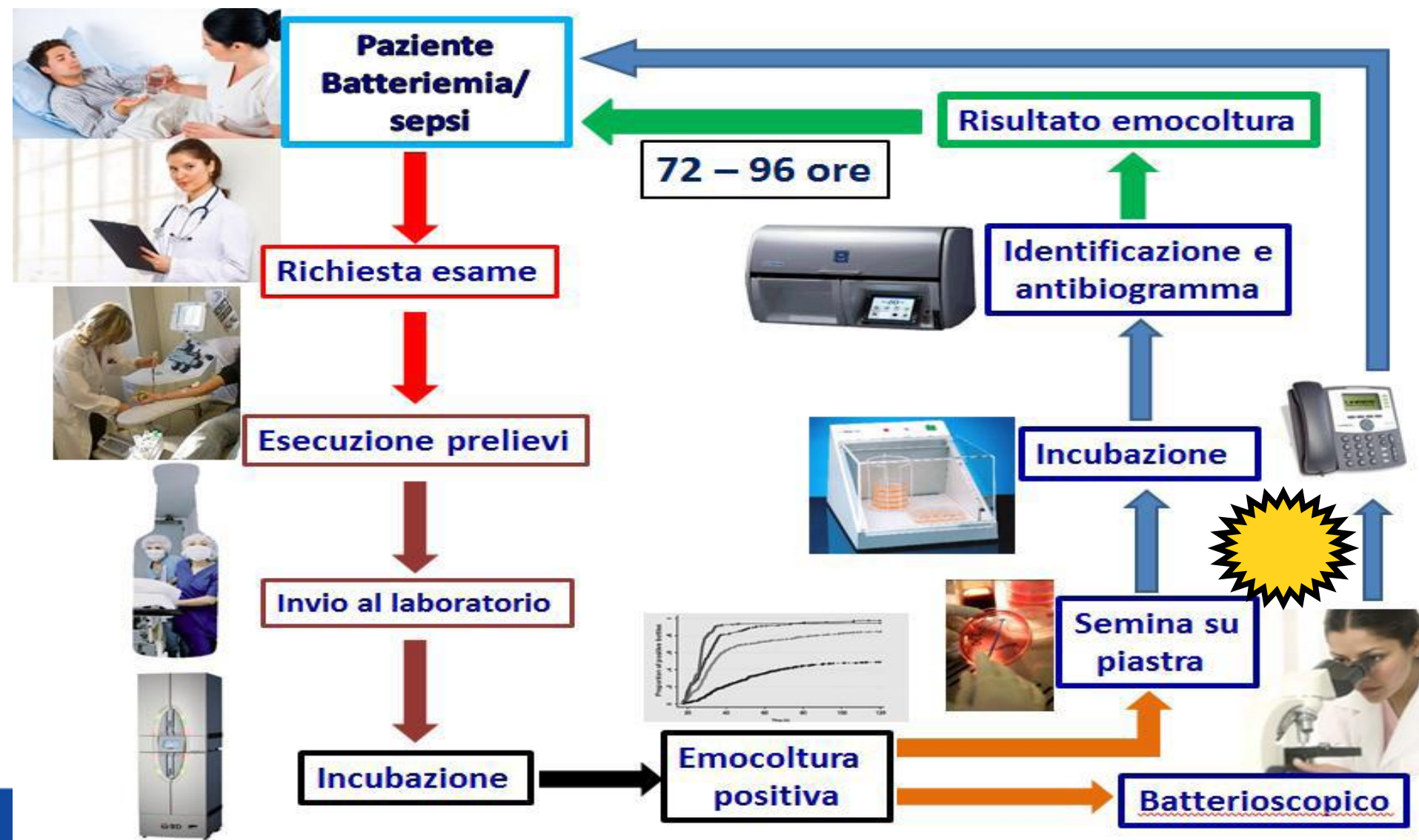
Associazione tra periodo di positività dell'emocoltura e mortalità

Joan Barenfanger et al: Decreased Mortality Associated With Prompt Gram Staining of Blood Cultures. Am J Clin Pathol 2008;130:870-876

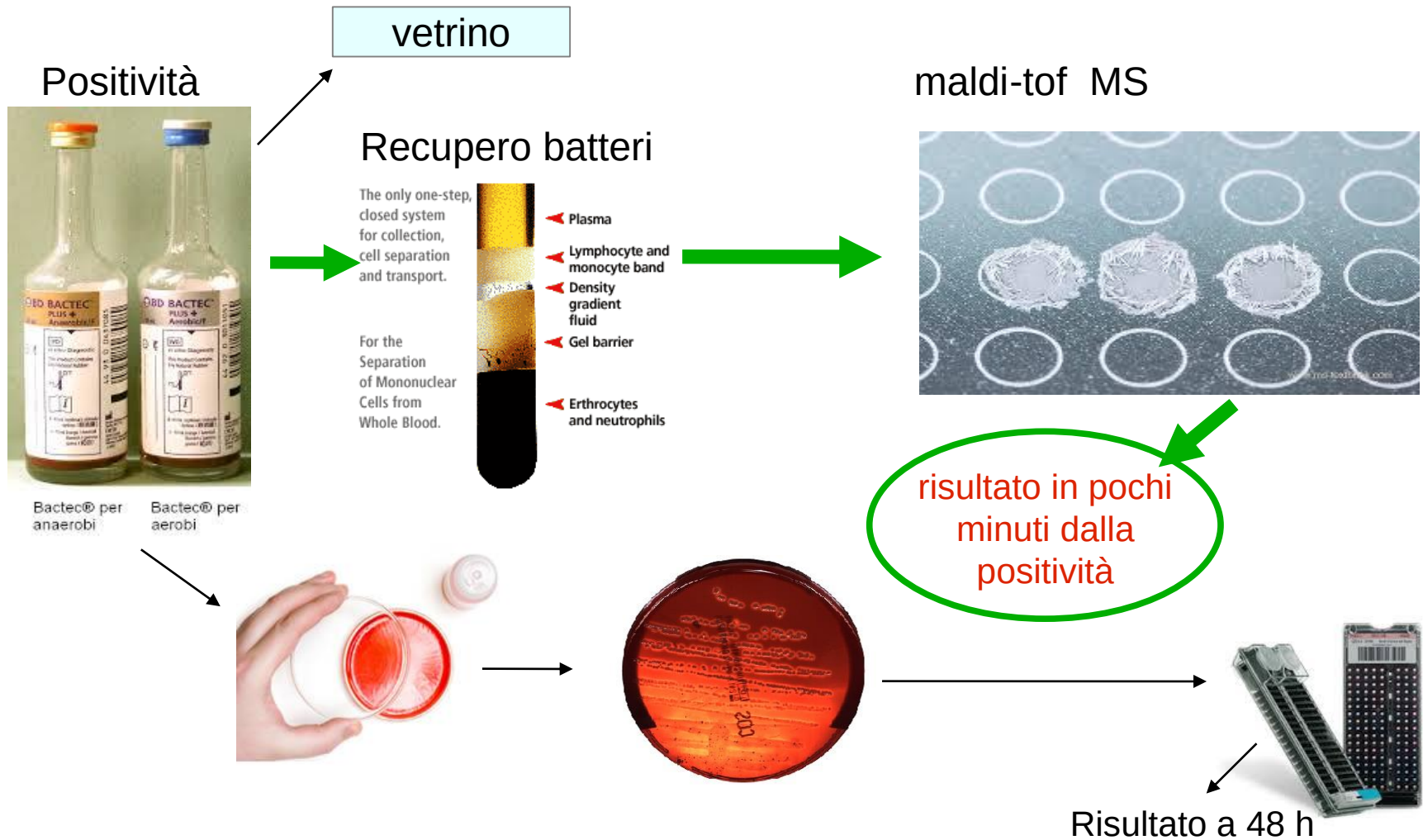
Microbiology and Infectious Disease / ORIGINAL ARTICLE



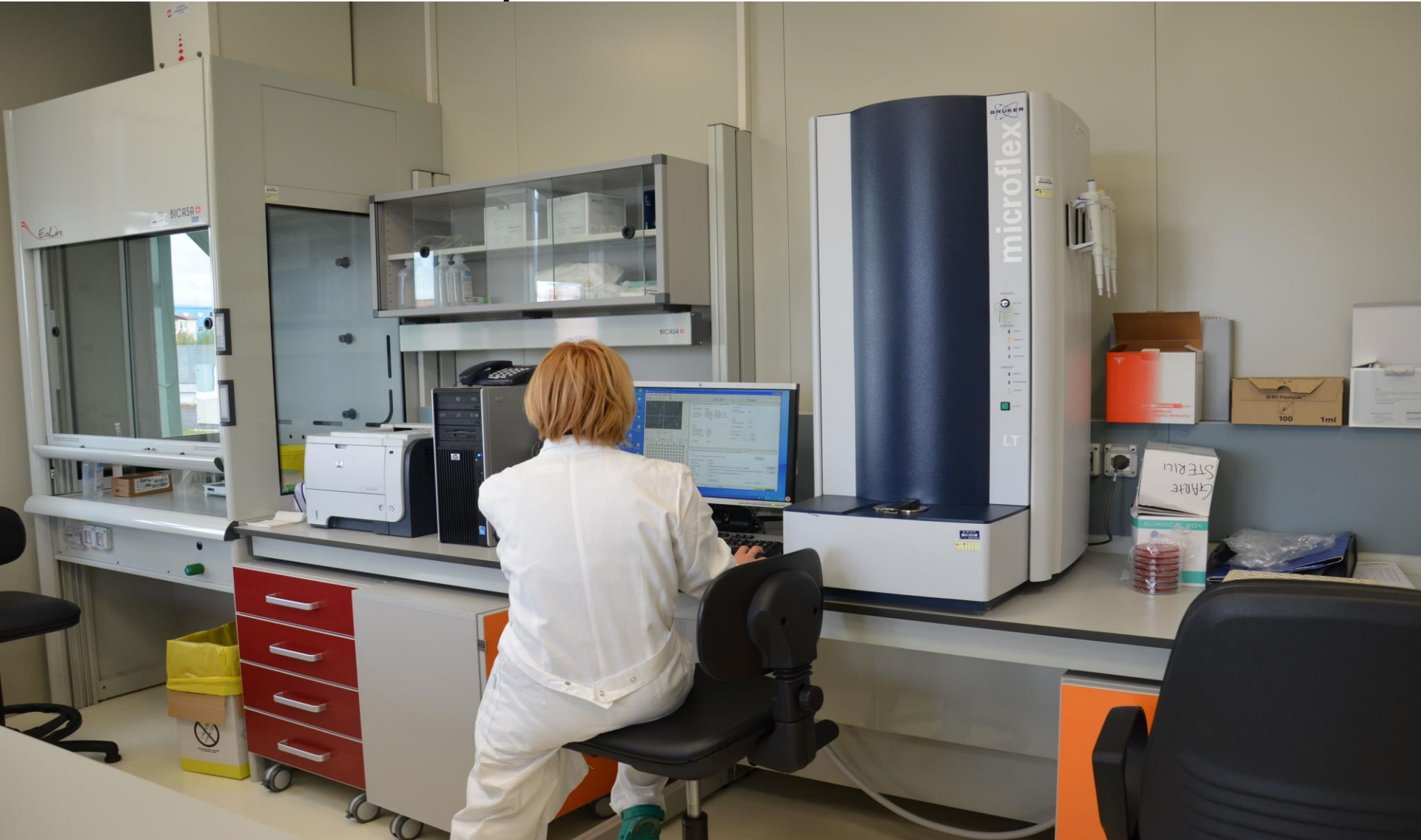
Flusso preanalitico – analitico – postanalitico di un'emocoltura



L'emocoltura “rapida”...



Identificazione rapida



.....e ora? Possiamo prenderci un caffè?

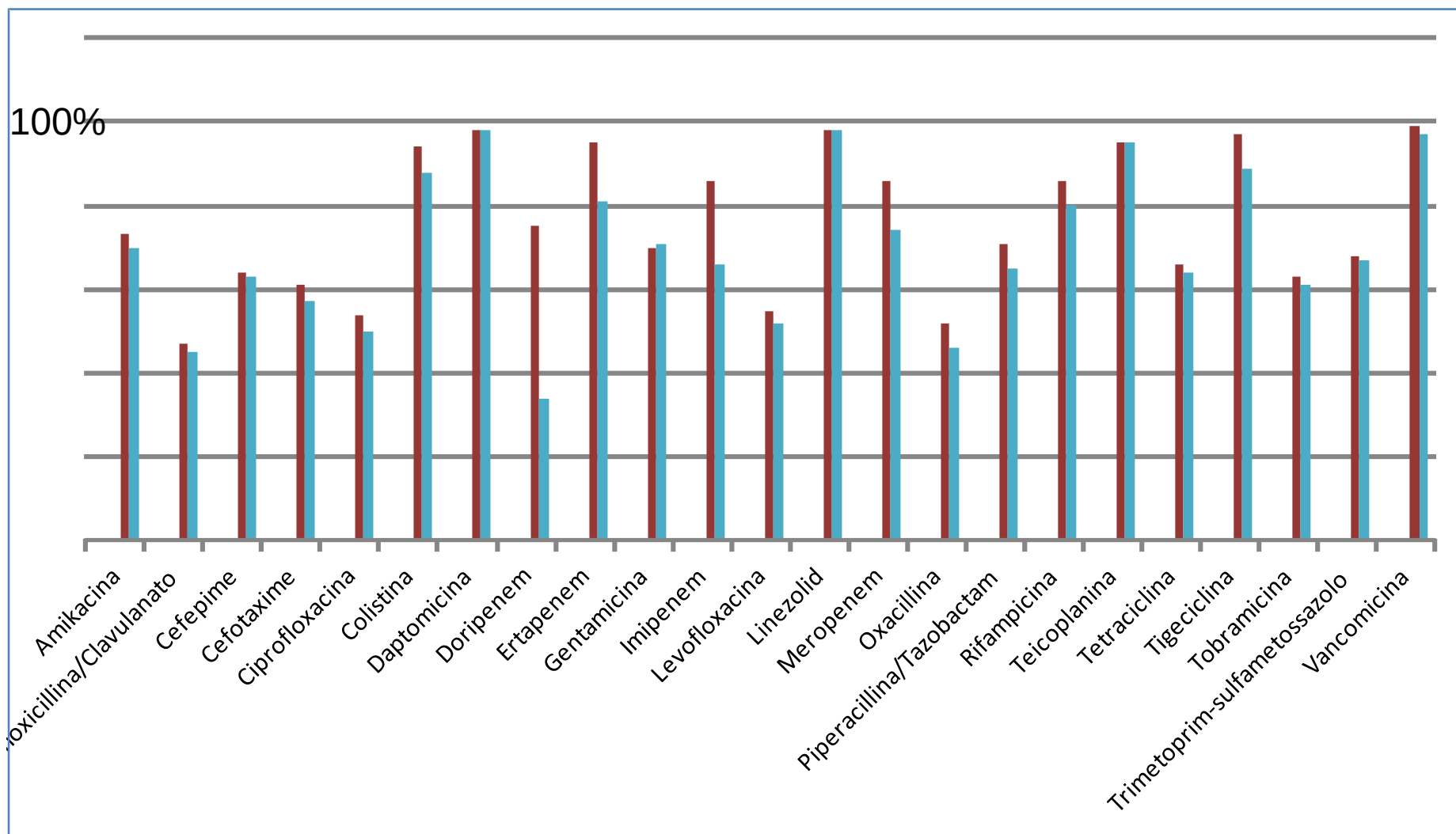


Con una identificazione affidabile, può essere iniziata una terapia, se non proprio mirata, almeno ben indirizzata, ma:

Chi è il paziente?

Sensibilità ad antibiotici: Pronto Soccorso e tutti i Reparti (gennaio-luglio 2017)

Rosso: PS **Blu: Tutti, incluso PS** (dati non ripuliti)



Ma la provenienza del paziente non sempre è una buona regola orientativa

Esame

Urinocoltura screening
- carica batterica

Unità subintensiva

1° microorganismo: ***Escherichia coli***

Antibiotico	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	SIR
Amikacina	≤ 2	S
Amoxicillina/Clavulanato	≤ 2	S
Ampicillina	≤ 2	S
Ampicillina/sulbactam	≤ 2	S
Cefepime	≤ 1	S
Cefotaxime	≤ 1	S
Cefoxitina	≤ 4	S
Ceftazidime	≤ 1	S
Cefuroxime - Acetil	4	S
Cefuroxime - Sodio	4	S
Ciprofloxacina	$\leq 0,25$	S
Ertapenem	$\leq 0,5$	S
Fosfomicina	≤ 16	S
Gentamicina	≤ 1	S
Levofloxacina	$\leq 0,12$	S
Meropenem	$\leq 0,25$	S
Nitrofurantoina	≤ 16	S
Piperacillina/Tazobactam	≤ 4	S
Trimetoprim-sulfametossazolo	≤ 20	S

Esame

Urinocoltura screening
- carica batterica

Centro prelievi

1° microorganismo: ***Escherichia coli***

Antibiotico	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	SIR
Amikacina	16	I
Amoxicillina/Clavulanato	> 16	R
Ampicillina	> 16	R
Ampicillina/sulbactam	> 16	R
Cefepime	16	R
Cefotaxime	> 32	R
Cefoxitina	16	I
Ceftazidime	16	R
Cefuroxime - Acetil	> 32	R
Cefuroxime - Sodio	> 32	R
Ciprofloxacina	> 2	R
Ertapenem	$\leq 0,5$	S
Fosfomicina	≤ 16	S
Gentamicina	> 8	R
Levofloxacina	> 4	R
Meropenem	$\leq 0,25$	S
Nitrofurantoina	≤ 16	S
Piperacillina/Tazobactam	64	R
Trimetoprim-sulfametossazolo	≤ 20	S

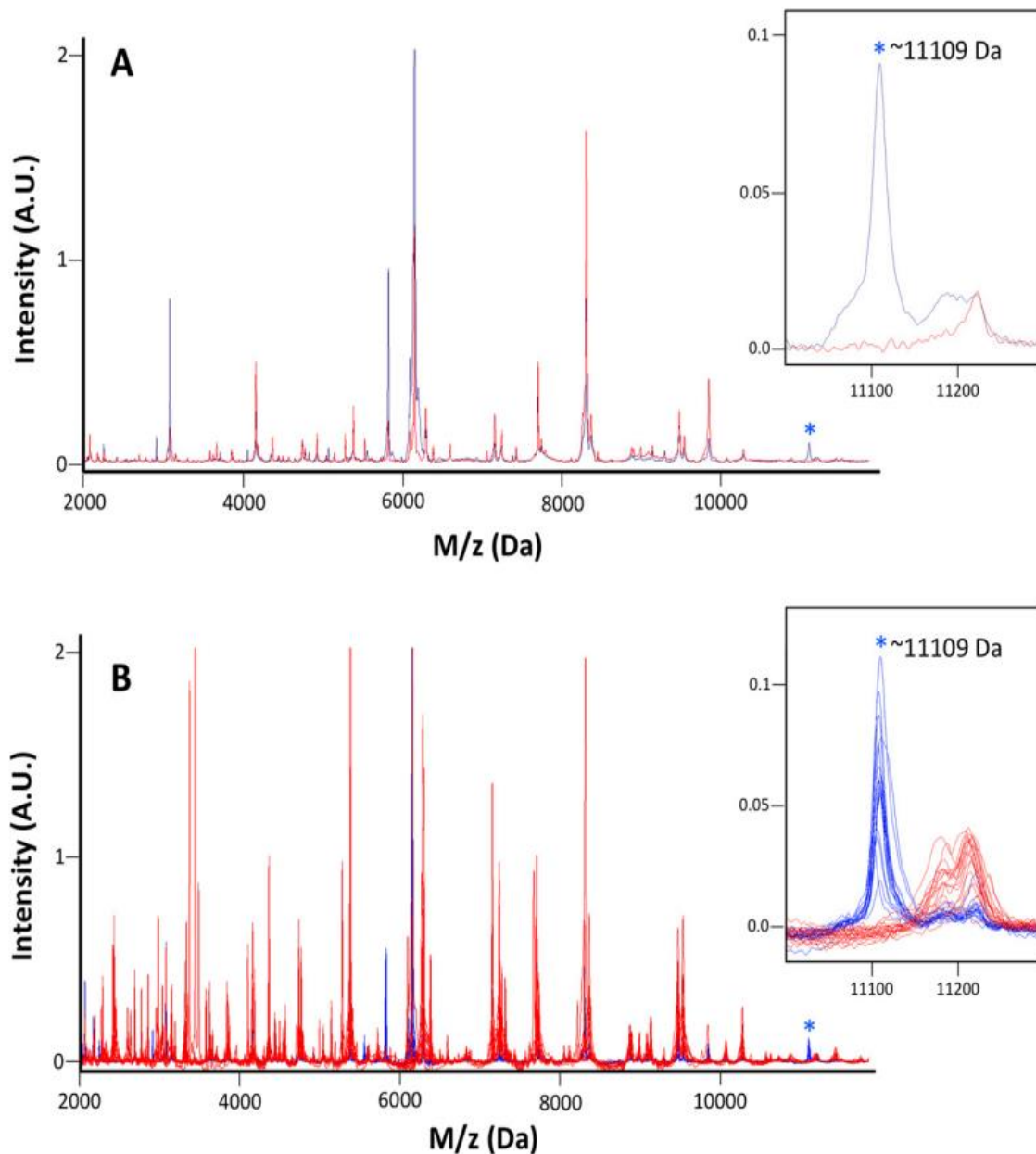


Figura 7. Spettro di massa di KPC-KP prodotto con MALDI-TOF MS: sull'asse X sono riportati i valori di massa/carica, sull'asse Y l'intensità. (A) Lo spettro di *Klebsiella pneumoniae* positiva per *blaKPC* ATCC BAA-1705 (blu) presenta un picco a 11.109 Da (*) che è assente da *Klebsiella pneumoniae* negativa per *blaKPC* ATCC BAA-1706 (rosso). (B) Sovrapposizione di 18 spettri di *Klebsiella pneumoniae* positive per *blaKPC* (blu) e 18 spettri di *Klebsiella pneumoniae* negative per *blaKPC* (rosso).

Lau *et al.* 2014

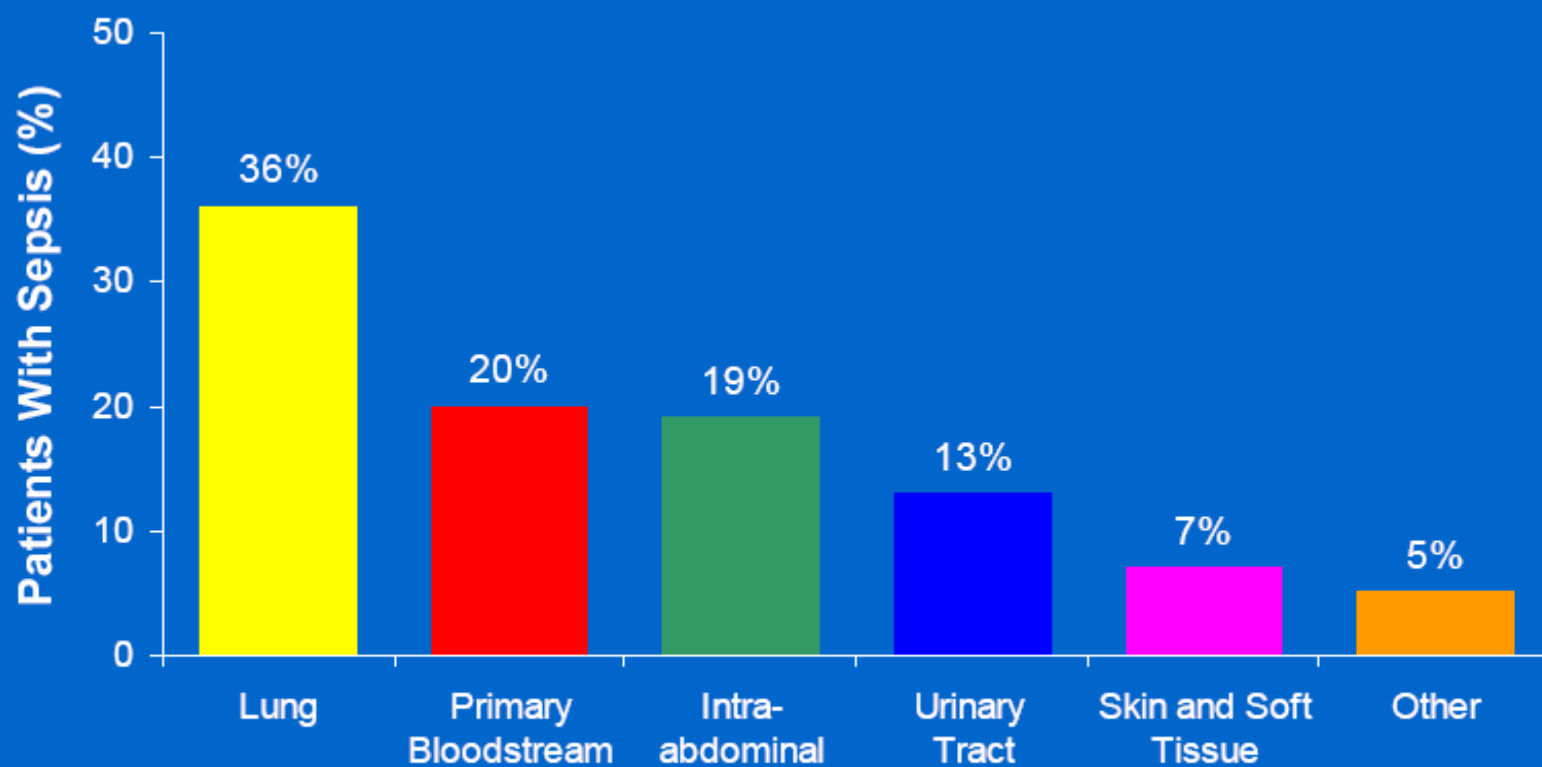
Nell'ingrandimento si vede che il picco a 11.109 Da è presente solo negli isolati positivi per *blaKPC*.

Nuovi antibiotici: impiego razionale con test molecolari

Nuovi anti-Gram-negativi		Target			
		ESBL	KPC	OXA-48	VIM/IMP/NDM
	Ceftolozano Tazobactam	●	●	●	●
	Ceftazidime Avibactam	●	●	●	●
	Imipenem Relebactam	●	●	●	●
		● ATTIVO	● NON ATTIVO		

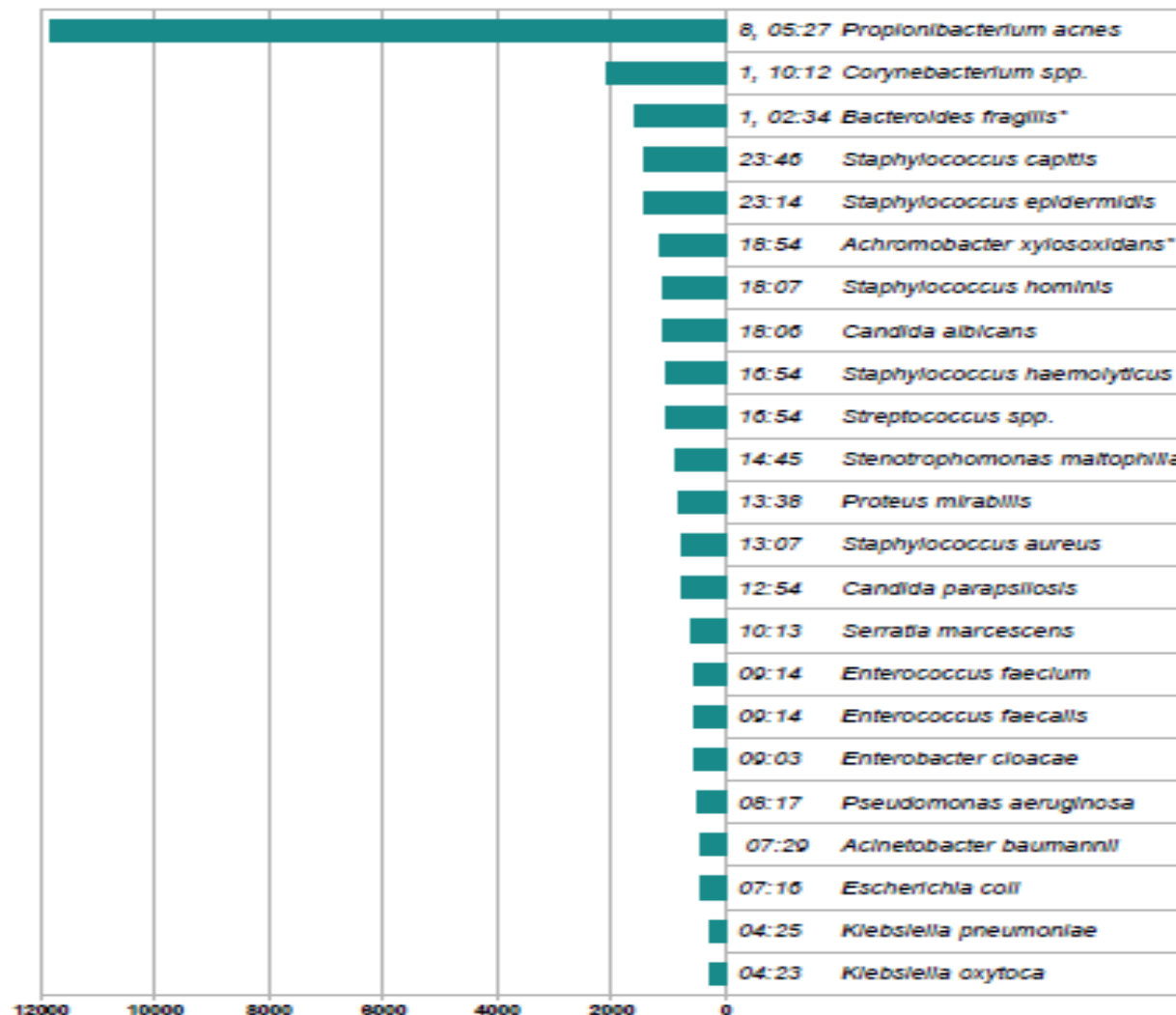
L'IDENTIFICAZIONE DI UNA SEPSI PREVEDE IL RICONOSCIMENTO DI
UN NESSO CAUSALE DIRETTO TRA LE MANIFESTAZIONI SISTEMICHE E
IL PROCESSO INFETTIVO

Identificare la sorgente dell'infezione



Fish DN. *Am J Health Syst Pharm.* 2002;59

Ma quanto impiega una emocoltura a diventare positiva?



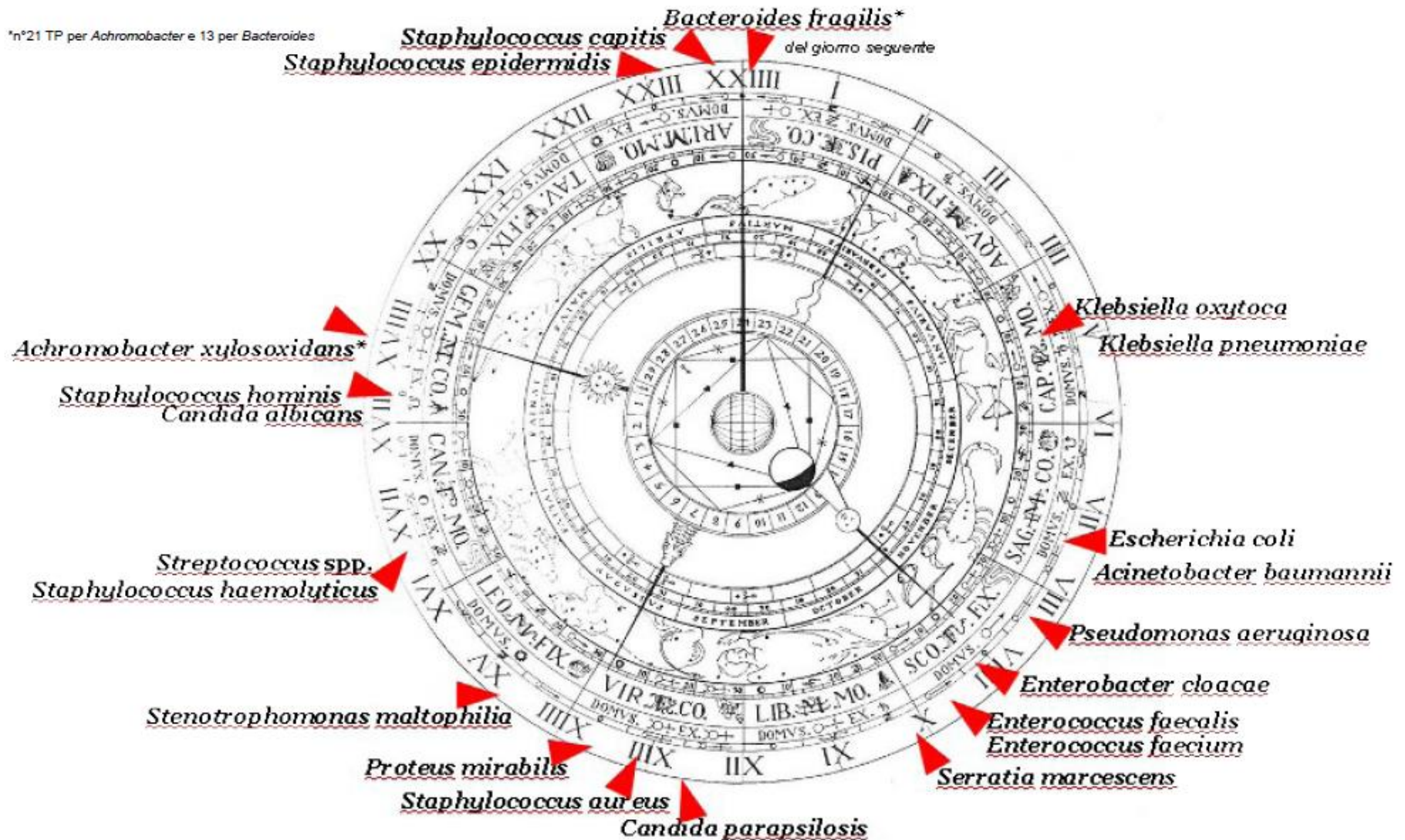
Visualizzazione grafica delle mediane dei tempi di positività di diverse specie di microrganismi

E, più precisamente...

	mediana (gg, hh:min)	mediana (min)	range (gg, hh:min)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	04:23	263	00:57 – 12:17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	04:25	265	01:06 – 11:44
<i>Escherichia coli</i>	07:16	436	01:37 – 2, 04:47
<i>Acinetobacter baumannii</i>	07:29	449	01:36 – 20:14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	08:17	497	01:23 – 1, 00:59
<i>Enterobacter cloacae</i>	09:03	543	00:44 – 1, 01:04
<i>Enterococcus faecalis</i>	09:14	554	02:43 – 1, 05:04
<i>Enterococcus faecium</i>	09:14	554	03:34 – 1, 01:54
<i>Serratia marcescens</i>	10:13	613	01:03 – 0, 23:14
<i>Candida parapsilosis</i>	12:54	774	01:06 – 1, 07:07
<i>Staphylococcus aureus</i>	13:07	787	04:10 – 1, 01:57
<i>Proteus mirabilis</i>	13:38	818	00:27 – 1, 14:09
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	14:45	885	01:47 – 1, 20:28
<i>Streptococcus spp.</i>	16:54	1014	02:29 – 1, 11:46
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	16:54	1014	04:58 – 1, 06:59
<i>Candida albicans</i>	18:06	1086	01:26 – 3, 02:05
<i>Staphylococcus hominis</i>	18:07	1087	03:54 – 1, 22:37
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> *	18:54	1134	08:26 – 4, 12:41
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	23:14	1394	04:15 – 1, 19:28
<i>Staphylococcus capitis</i>	23:46	1426	15:10 – 2, 16:35
<i>Bacteroides fragilis</i> *	1, 02:34	1594	17:49 – 2, 11:44
<i>Corynebacterium spp.</i>	1, 10:12	2052	04:59 – 6, 16:27
<i>Propionibacterium acnes</i>	8, 05:27	11846	4, 14:19 – 9, 23:05

L'orologio dell'emocoltura nel nostro ospedale

*n°21 TP per Achromobacter e 13 per Bacteroides

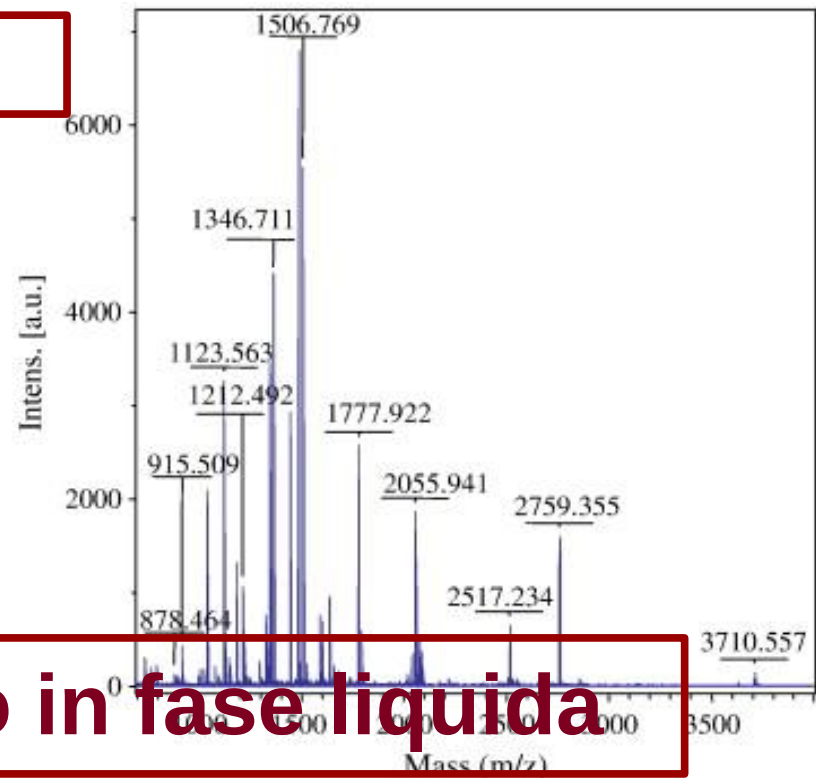


EMOCOLTURA POSITIVA

Colorazione di Gram

Procedure di recupero delle cellule batteriche

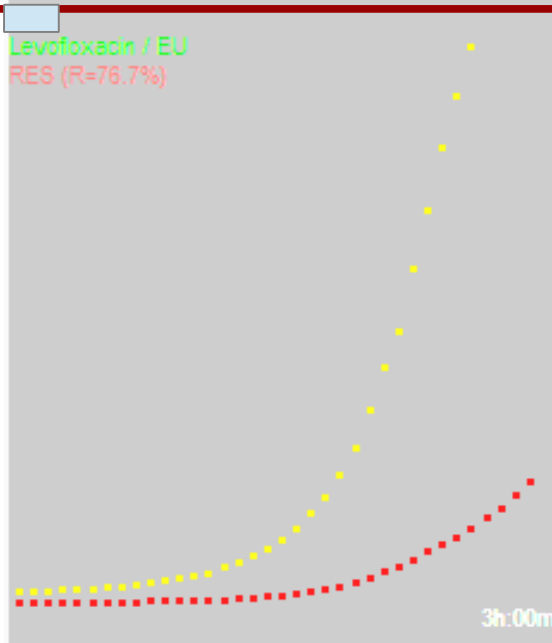
Identificazione MALDI-TOF



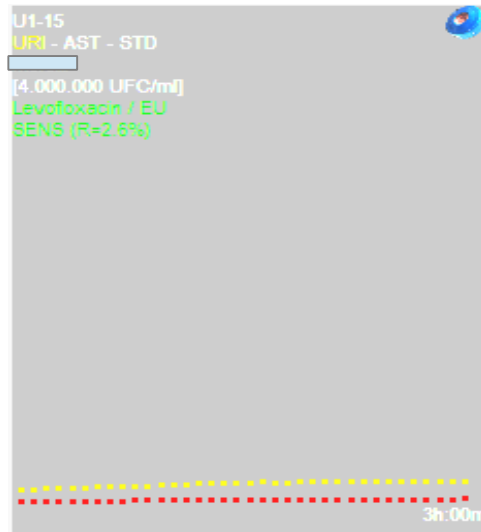
Antibiogramma rapido in fase liquida

U1-15
URI - AST - STD

Levofloxacin / EU
RES (R=76.7%)



U1-15
URI - AST - STD
[4.000.000 UFC/ml]
Levofloxacin / EU
SENS (R=2.6%)



In coltura liquida, i batteri vengono incubati con antibiotici per 3 o 5 ore, generando curve di crescita se resistenti o assenza di crescita se suscettibili. I risultati vengono espressi in termine di categoria interpretativa (SIR).

PANNELLI	ANTIBIOTICI
<i>Enterobacteriaceae</i>	Cefotaxime
	Ceftazidime
	Levofloxacin
	Gentamicin
	Meropenem
<i>Pseudomonas/Stenotrophomonas/Acinetobacter</i>	Colistin
	Amikacin
	Cefotaxime
	Levofloxacin
	Gentamicin
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colistin
	Cefoxitin
	Linezolid
<i>Coagulase-negative Staphylococci CoNS</i>	Teicoplanin
	Cefoxitin CoNS
	Linezolid
<i>Streptococci/Enterococci</i>	Teicoplanin CoNS
	Ampicillin
	Linezolid
	Teicoplanin

Concordanza con metodi semiautomatizzati del 92%

Filmarray: affidabile, rapido, utile nelle sepsi polimicrobiche



Acinetobacter baumannii

Haemophilus influenzae

Neisseria meningitidis

Pseudomonas aeruginosa

Enterobacteriaceae Enterobacter cloacae complex
Escherichia coli

Klebsiella oxytoca

Klebsiella pneumoniae

Proteus

Serratia marcescens

Candida albicans

Candida glabrata

Candida krusei

Candida parapsilosis

Candida tropicalis

mecA - methicillin resistance
vanA/B - vancomycin resistance
KPC - carbapenem resistance

Enterococcus

Listeria monocytogenes

Staphylococcus *Streptococcus*
Staphylococcus aureus

Streptococcus agalactiae

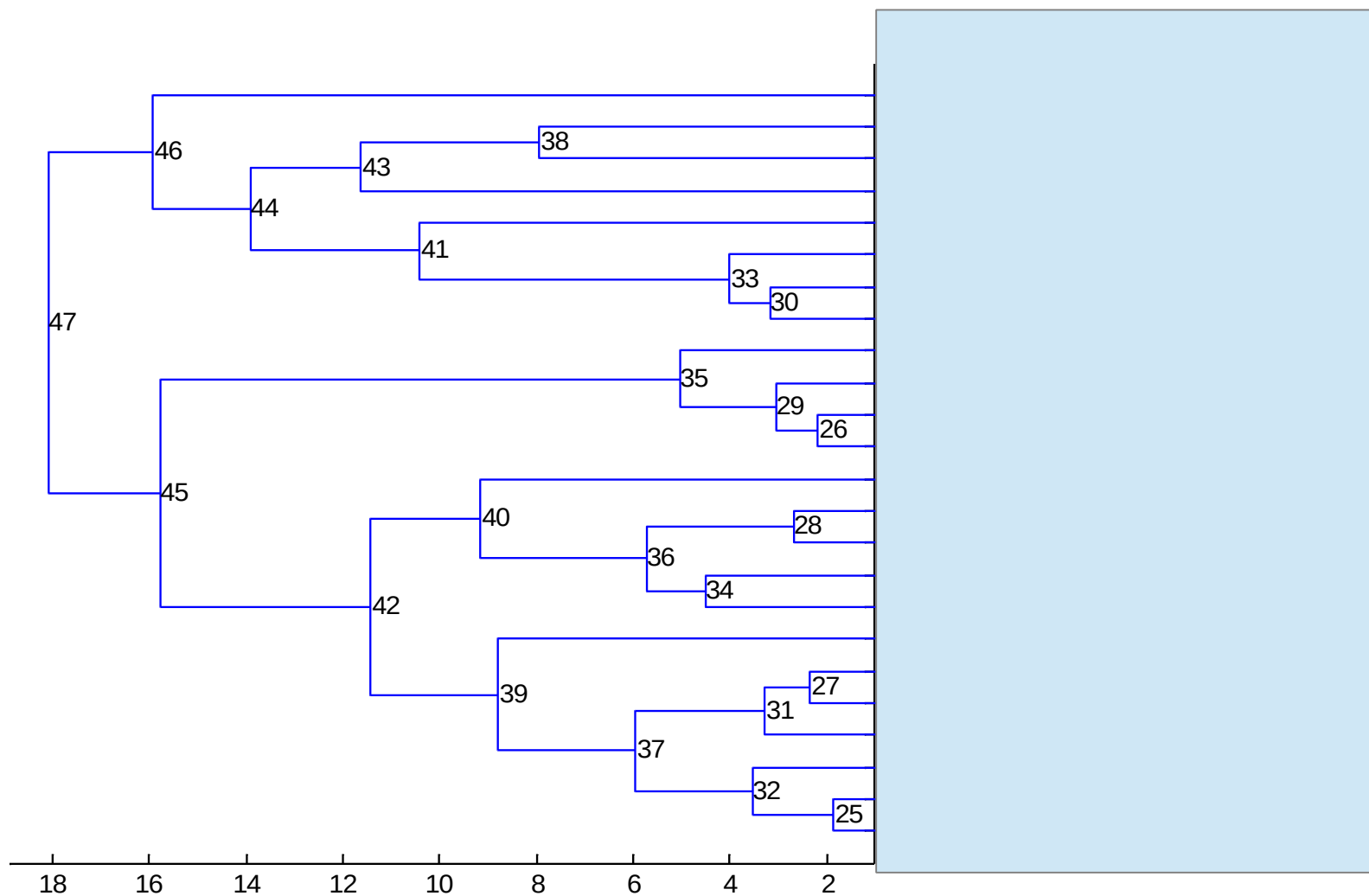
Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pyogenes

Quando traslochiamo, i nostri batteri vengono con noi; quando trasferiamo un paziente, trasferiamo anche i suoi batteri!



Analisi filoproteomica outbreak





Grazie!