

Survey of blood cultures methods in Italy in 2010

Antonio Goglio¹, Pierluigi Nicoletti², Patrizia Pecile², Annibale Raglio¹

1 UO Microbiologia e Virologia, AO Ospedali Riuniti, Bergamo

2 SOD Microbiologia e Virologia, AOU Careggi, Firenze

Key words: Microbiology, Survey, Diagnosis, Blood cultures, Management, Bacteraemia

Indagine sulle metodiche per emocoltura in Italia nel 2010

SUMMARY

Sepsis is a serious clinical condition, associated with high mortality despite advanced modern medical treatment. Traditionally, the detection and identification of bacteria and fungi circulating in the blood-stream is based on blood cultures. A number of factors influence the yield of blood culture, most of them concerning the microbiologist skill and the laboratory organization.

In order to collect information about the practices and procedures used for the detection of microorganisms in blood cultures in the Italian laboratory (lab), an e-mail with the invitation to participate in the survey was sent to 2000 members of the Italian Association of Clinical Microbiology. Responses were received from 100 lab, located from all over the country (in 18/20 Italian regions). The results presented hereby concern specimen collection, culture techniques, rapid identification and susceptibility testing, laboratory organization, relationships with physicians. In summary, most lab use automated systems (96%), the bottles are incubated immediately during public holidays in 72/96 lab (75%) and in 49/97 lab at night (50.5%), the length of incubation was 5 or 7 days in 93% of the lab, although it is common to extend the incubation period when brucellosis (74 lab), endocarditis (49 lab), systemic mycosis (33 lab) is suspected. A wide variety of media are employed for subcultures. All lab process the positive bottles at least once a day, while only in 42 of 81 (51.9%) lab the positive blood are processed on holiday. Communication between clinicians and microbiologist include: distribution of specimen collection guidelines (96/100 lab), availability to microbiologist of patients' clinical situation (77/96 lab, 80.2%), and adding to report the microbiologist' suggestion (75/98 lab, 76.5%).

The results, compared with those collected with a similar questionnaire in 2001, show a greater adherence to guidelines: the number of bottles examined by lab yearly is almost doubled, the length of incubation is shortened to 5 days in 42% (vs 9.2% in 2001), direct susceptibility tests seem to be performed more frequently (in 29% of lab vs 18.6% in 2001, mostly in larger hospitals), more lab process positive bottles on Sunday, cooperation with clinicians is improved.

INTRODUZIONE

La sepsi costituisce una importante causa di morbidità, gravata da alta mortalità nelle forme severe o associate a shock (24, 26, 29, 33, 34). Con l'emocoltura è possibile in molti casi confermare la diagnosi clinica, identificare l'agente eziologico e definirne il *pattern* di sensibilità agli antibiotici (17, 30). Il microbiologo è quindi coinvolto nella gestione di questi pazienti e deve assicurare l'attendibilità dei risultati, attraverso la scelta di metodi che assicurino il massimo di sensibilità e di specificità, e la loro disponibilità in tempi stretti, possibile con una adeguata organizzazione del laboratorio, il ricorso a tecniche rapide o preliminari e la tempestiva comunicazione dei risultati.

In letteratura sono disponibili numerose ed autorevoli *review* e linee guida che forniscono precise indicazioni per la corretta esecuzione dell'emocoltura, evidenziano gli aspetti consolidati e i momenti critici, cui il microbiologo dovrebbe

far riferimento per assicurare l'ottimizzazione dei propri risultati (2, 15, 16, 7), ma anche i punti controversi su cui non c'è accordo unanime o mancano prove di documentata efficacia.

Quale la situazione nel nostro Paese? Nel 2002 era stata condotta dagli Autori un'indagine, promossa per iniziativa congiunta dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI) e dell'Associazione per la Prevenzione e lo Studio delle Infezioni (APSI) che fotografava la realtà italiana del 2001 (12).

A distanza di quasi 10 anni cosa è cambiato? Abbiamo pensato potesse essere utile ripetere l'indagine, per aggiornare la fotografia, con l'obiettivo di:

- conoscere le prassi diagnostiche ed operative nella gestione e dell'emocoltura nei laboratori italiani, confrontandole con le indicazioni della letteratura e delle agenzie internazionali,
- offrire ai microbiologi elementi di riflessione e

Corresponding author: Antonio Goglio

A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo, U.O. Microbiologiae Virologia

Largo Barozzi 1, 24128 Bergamo - Tel. +039 3473590810; Fax +039 035 266666

E-mail: angoglio@ospedaliriuniti.bergamo.it

- confronto con le prassi in uso negli altri laboratori italiani (*benchmarking*, strumento per il miglioramento continuo della qualità),
- disporre di riferimenti per la programmazione di iniziative di aggiornamento, mirate sulla base delle prassi esistenti
 - confrontare i risultati con quelli ottenuti con la precedente indagine effettuata dagli Autori nel 2002, rilevando quanto sia cambiato negli anni nei laboratori italiani, tenuto conto anche delle numerose iniziative di formazione promosse dalle società scientifiche (stesura di percorsi diagnostici, organizzazione di corsi e convegni)

MATERIALI E METODI

Nella primavera del 2011 si è provveduto all'invio di una e-mail agli oltre 1600 soci iscritti alla *mailing list* dell'AMCLI, con l'invito alla compilazione del questionario sulle emocolture da parte del Direttore/Responsabile del laboratorio o Dirigente dallo stesso indicato.

Ai colleghi interessati a partecipare all'indagine veniva richiesto di collegarsi ad uno specifico indirizzo indicato nella e-mail, di compilare il questionario proposto, di restituirlo per via elettronica (Software SurveyMonkey che permette la raccolta delle risposte per via elettronica e presenta una prima elaborazione delle risposte stesse).

Il questionario era diretto ad acquisire informazioni su: caratteristiche del laboratorio, procedure diagnostiche utilizzate per le indagini microbiologiche sulle emocolture (con esclusione delle indagini per micobatteri e dei metodi non in brodo), carico di lavoro, organizzazione del lavoro, rapporti con i medici curanti, gestione dei risultati.

Il questionario ricalcava, pur con alcune semplificazioni, il questionario distribuito nel 2002. Per semplicità l'indagine è stata limitata alle emocolture effettuate con sistemi in brodo per la coltura di batteri e miceti escludendo la ricerca di Micobatteri o di altri microrganismi particolari (quali, ad esempio, *Legionella* spp., *Leptospira* spp. o *Borrelia* spp.).

I risultati sono stati elaborati utilizzando il programma sopra citato ed in parte con foglio elettronico (Excel) dopo acquisizione dei dati da SurveyMonkey.

I risultati sono stati analizzati incrociando alcune risposte per verificarne la congruità (ad esempio, posti letto vs numero di ricoveri vs giornate di degenza) e verificati per escludere l'inserimento di più risposte per uno stesso laboratorio.

Per i dati, mancanti o non comprensibili o apparentemente errati, si è provveduto a contattare il responsabile del Laboratorio per raccogliere o verificare l'informazione.

RISULTATI

Sono stati compilati e restituiti 100 questionari da laboratori solo in parte (45 su 100) coincidenti con i laboratori che avevano partecipato all'indagine del 2002.

Nella lettura dei risultati occorre tenere presente che non sempre e non tutti i punti del questionario sono stati compilati (per disattenzione, ma anche a non disponibilità del dato o a risultato negativo) e quindi non sempre i totali corrispondono al totale dei laboratori.

Quando possibile i risultati sono confrontati con quelli rilevati nel 2001 pur consapevoli che le risposte non sono state fornite dagli stessi laboratori e che le differenze devono essere lette come indicative.

Caratteristiche dei laboratori

I laboratori (lab) sono distribuiti, anche se in modo disomogeneo, in quasi tutte le regioni italiane (Tabella 1), con alto numero in Lombardia (30), Piemonte (10), Campania (8), Toscana (8), solo in parte giustificato dalla numerosità della popolazione residente in queste regioni; nessuna risposta da Friuli Venezia Giulia e Molise.

Tabella 1. Distribuzione geografica dei laboratori (e confronto con l'indagine 2001)

Regione	n. laboratori		
	anno	2010	2001
Abruzzo		1	3
Basilicata		1	1
Calabria		1	2
Campania		8	10
Emilia Romagna		5	5
Friuli Venezia Giulia		0	3
Lazio		6	7
Liguria		5	3
Lombardia		30	23
Marche		4	2
Molise		0	1
Piemonte/		9	13
Puglia		6	6
Sardegna		1	3
Sicilia		1	3
Toscana		8	5
Trentino Alto Adige		5	4
Umbria		1	2
Val D'Aosta		1	1
Veneto		7	13
	Totale	100	110

Molto variabili anche le dimensioni delle strutture di ricovero che afferiscono ai laboratori, con 11 Ospedali con meno di 200 posti letto (p.l.), 29 con 200 - 400 p.l., 30 con 401 - 700 p.l., 20 con 701- 1000 p.l. e 10 con più di 1000 p.l. (Tabella 2). Alcuni Colleghi specificano che l'attività del loro laboratorio è estesa a più presidi ospedalieri. Rispetto al 2001 si evidenzia un maggior

numero di ospedali con p.l. tra i 400 e i 1000 e una riduzione di quelli sotto i 400 p.l. e sopra i 1000 p.l.

Tabella 2. Distribuzione degli Ospedali, sede dei laboratori, per numero di posti letto, 2010 vs 2001

Posti letto	laboratori				Delta
	n.		%		
	2010	2001	2010	2001	
< 200	11	21	11	19.1	- 8%
200-400	29	35	29	31.8	- 2.8%
401-700	30	24	30	21.8	+ 8.2%
701-1000	20	16	20	14.5	+ 5.5%
> 1000	10	14	10	12.7	- 2.7%

Dei 100 lab 62 sono lab generali con sezione/unità strutturale semplice di microbiologia, 38 sono lab di microbiologia autonomi.

Sistemi utilizzati

La quasi totalità dei 100 laboratori si avvale di strumenti che rilevano in automatico i segni crescita nel brodo (97 lab). Tre lab utilizzano invece solo sistemi manuali. I sistemi automatici

utilizzati dai lab sono: BACTEC, Becton Dickinson (48 lab), BacT/Alert, bioMérieux (49 lab.), Versa Trek, DID (1). Un lab usa sia Bactec che BacT/Alert; due lab utilizzano sistemi automatizzati e manuali (Bactec + DuPont Isolator per pediatrici e Bactec + Signal Blood Culture System Oxoid). Tre lab usano solo sistemi manuali con rilievo visivo della crescita: due il Signal Blood Culture System (Oxoid) e due l'Hemoline performance difasico aerobi (bioMérieux). Dei 3 laboratori che usano solo sistemi manuali, due hanno sede in ospedali con meno di 200 p.l. ed uno in ospedale con 201 - 400 p.l.

Carico di lavoro

Il questionario chiedeva di indicare il numero di flaconi esaminati nel corso del 2010, rispettivamente per aerobi, anaerobi e per miceti. Il numero di set (definito come un campione di sangue prelevato in uno stesso momento da una stessa sede, indipendentemente dal numero di flaconi inoculati) può essere desunto dal numero

Tabella 3. Numero (totale e medio) di flaconi per emocoltura esaminati nel 2010 (e nel 2001)

Ricerca	n. lab		Totale flaconi		Media	
	2010	2001	2010	2001	2010	2001
Aerobi	94	99	469.501	250.643	4.890	2.532
Anaerobi	93	99	433.182	220.584	4.608	2.228
Miceti	20	39	8.659	7.623	433	115
Totale			913.352	480.851		

Tabella 4. Distribuzione dei lab per p.l. e numero di flaconi esaminati, anno 2010

Posti letto	Emocolture (n. flaconi)						Totale
	<500	500-1000	1001-2000	2001-5000	5001-10000	>10000	
<200	2	3	3	3			11
200-400	2	1	5	10	10	1	29
401-700			1	6	13	8	28
701-1000				3	6	11	20
>1000				1	2	7	10
Totale	4	4	9	23	31	27	98

Tabella 5. Distribuzione dei lab. per la durata dell'incubazione (giorni) in uso nella routine, anno 2010

GG di incubazione	aerobi		anaerobi		miceti	
	n.	%	n.	%	n.	%
3	0	0	0	0	0	0
4	1	1				
5	42	42	41	42.2	14	29.1
6	10	10	10	10.3	2	4.1
7	41	41	40	41.2	10	20.8
8	0	0	0	0		
10	6	6	5	5.1	5	10.4
14	0	0	0	0	9	18.7
15	0	0	0	0	3	6.2
20	0	0	1	1.1	1	2.1
21					4	8.3
Totale Risposte	100		97		48	

di prelievi in aerobiosi. Novantacinque laboratori hanno complessivamente esaminato, nel corso del 2010, 911335 flaconi rispetto ai 478850 del 2001 (Tabella 3). I flaconi erano così distribuiti: 469501 per aerobi (250643 nel 2001), 433182 per anaerobi (220584 nel 2001) e 8659 per miceti (7623 nel 2001). Dall'indagine (forniscono i dati necessari però solo 37 Ospedali) risulta un rapporto prelievi / 1000 ricoveri di 260 (range 60 - 1130). Nel 2001

era risultato di 123.6 prelievi per 1000 ricoveri (range 3.7 - 1183.1). Il numero dei prelievi (o set) è stato calcolato nelle due indagini sulla base dei flaconi per aerobi.

Il range di utilizzo dell'emocoltura è amplissimo (da 60 flaconi/anno agli oltre 66320), solo in parte in relazione ai posti letto afferenti al laboratorio. La Tabella 4 riporta la distribuzione degli ospedali per numero di posti letto e di flaconi esaminati.

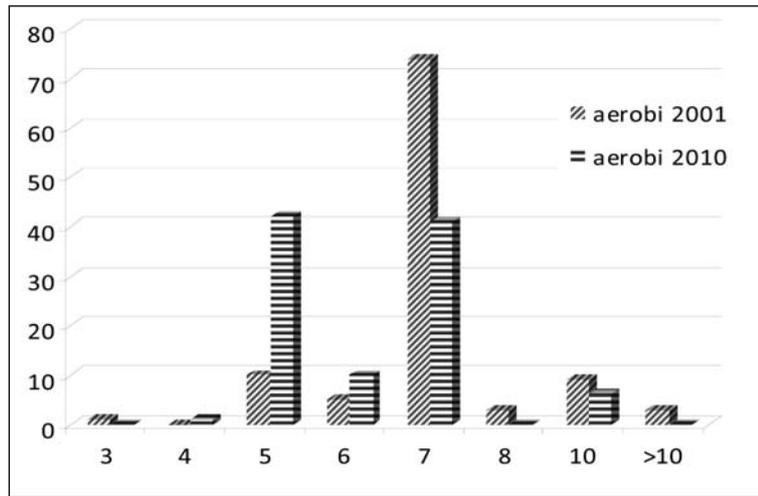


Figura I. Distribuzione dei laboratori per durata dell'incubazione dei flaconi per aerobi, 2010 vs 2001.

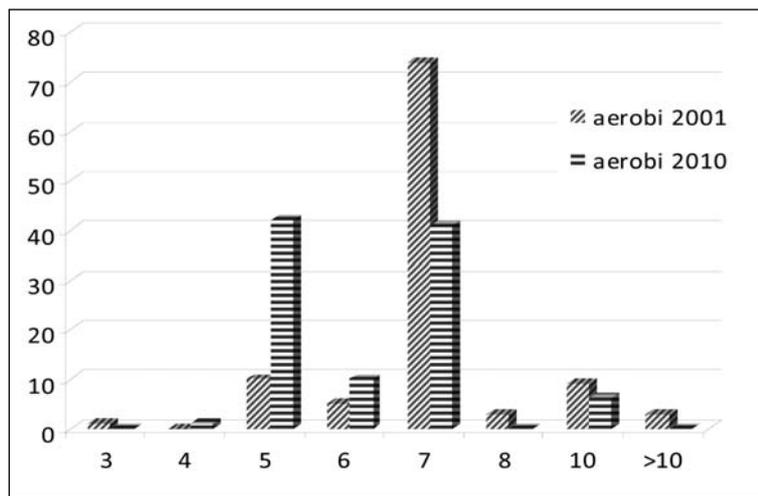


Figura II. Distribuzione (%) dei lab. per la durata dell'incubazione (giorni) in uso nella routine per i flaconi specifici per miceti, anno 2010 vs 2010.

Durata dell'incubazione

I flaconi per aerobi ed anaerobi sono incubati rispettivamente per 5 giorni (42 lab), per 6 giorni (10 lab) e per 7 giorni (41 lab). Un solo lab incubava meno di 5 giorni e uno più di 10 giorni (per i soli anaerobi).

I tempi di incubazione per miceti risultano più dispersi con picchi di 5 giorni (29.1%), di 7 (20.8%) e di 10 (10.4%) (Tabella 5).

Le figure I e II riportano in grafico la distribuzione (%) dei lab. per la durata dell'incubazione (giorni) in uso nella routine per i flaconi aerobi, significativamente diversa nelle indagini relative agli anni 2001 e 2010. La durata di incubazione era allora per aerobi di 5 giorni (9.5% rispettivamente), di 6 giorni (4.8%) e di 7 giorni (70.5%).

La durata di incubazione dei brodi specifici per miceti era di 7 giorni (38.1%), di 10 giorni (16.7%), di 14 giorni (31%), oltre 14 giorni (9.5%).

A fronte di situazioni cliniche particolari molti laboratori prolungano l'incubazione dei flaconi: 74 lab. nel sospetto di brucellosi, 47 in caso di endocardite (in entrambi i casi con una curva bimodale e picchi a due e tre settimane); 33 in caso di sospetta micosi sistemica con un range che va da 7 a 30 giorni senza una moda particolare; solo raramente (6 lab.) in corso di AIDS (Tabella 6).

I dati sono sostanzialmente sovrapposti.

Tabella 6. Distribuzione dei lab. in base al motivo di prolungamento dell'incubazione ed alla durata della stessa (anno 2010).

GG di incubazione	Brucellosi	Endocardite	AIDS	Miceti
7-10	7	6	1	7
14-18	30	23	3	7
20-21	32	14	2	14
>21	5	4	0	5
Totale	74	47	6	33

ponibili a quelli rilevati nel 2001.

Terreni utilizzati per le sottocolture

L'analisi dei terreni utilizzati per le sottocolture risulta particolarmente complessa per i diversi tipi di terreno utilizzati (ben 59 protocolli diversi su 100 laboratori rispetto ai 45 del 2001): il loro numero spazia da un solo terreno (agar sangue o agar cioccolato) in 6 laboratori, ad un pannello di 9 piastre in uso in 1 laboratorio.

Sangue o cioccolato sono usati in 97 lab; sangue più cioccolato in 72 lab; sangue, cioccolato e selettivo per Gram negativi in 50 laboratori; un terreno al sangue, uno selettivo per Gram negativi ed un selettivo per cocchi Gram positivi o solo stafilococchi o enterococchi in 55 lab.

Utilizzo di metodi che consentono di anticipare i risultati

Il questionario indagava alcuni aspetti diagnostici ed organizzativi, particolarmente critici in ordine alla tempestività della risposta e/o alla possibilità di anticipare informazioni parziali preliminari al clinico:

- tempestività nell'avvio dell'incubazione dei flaconi, in particolare nelle ore notturne e/o festive,
- la frequenza di osservazione per rilevazione dei segni di crescita e di processazione dei brodi, durante la settimana e nel *week end*,
- l'effettuazione dell'esame microscopico sui brodi con segni di crescita,
- l'effettuazione di *test* "diretti", utilizzando direttamente la brodocoltura, senza attendere la crescita di colonie sui terreni solidi.

Avvio dell'incubazione dei flaconi

Il questionario chiedeva se nel lab. i flaconi venivano messi subito negli incubatori durante le ore notturne e nei giorni festivi.

Nelle ore notturne 49 su 97 lab (50.5%) inseriscono subito i flaconi nello strumento; 48 lab (49.5%) aspettano il mattino successivo; 3 laboratori non rispondono.

Nei giorni festivi 72 su 96 lab (75%) inseriscono subito i flaconi nello strumento; 24 lab (25%) aspettano il giorno successivo; 4 laboratori non rispondono (Figura III).

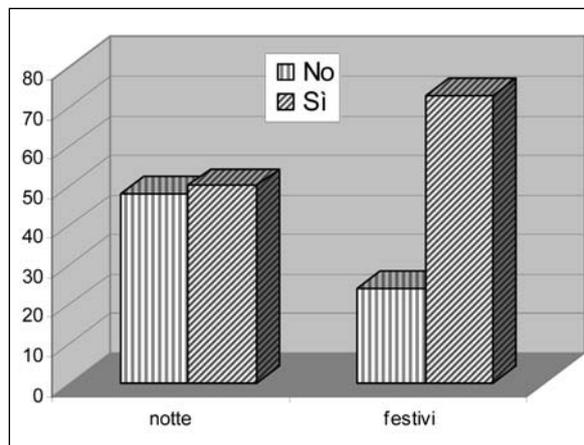


Figura III. I flaconi vengono messi subito negli incubatori anche di notte e nei giorni festivi?

Abbiamo analizzato i dati in relazione alla tipologia di laboratorio: autonomo di microbiologia o generale con sezione di microbiologia (Tabella 8).

Nelle ore notturne i flaconi vengono messi subito negli incubatori in 8 su 38 lab autonomi di Microbiologia, pari al 21.1%, e in 43 su 62 Laboratori generali, pari al 69.4%.

Nei giorni festivi (almeno sino ad una certa ora della giornata) i flaconi vengono messi subito ad incubare in 20 su 38 lab autonomi di Microbiologia (52.6%) ed in 52 su 62 Laboratori generali (83.9%).

Tabella 7. Terreni utilizzati per sottocolture 2010 (rispondono 100 lab.)

	Da bottiglia per anaerobi	Da bottiglia per aerobi	Da bottiglia per miceti
Agar Sangue	60	85	14
Agar sangue per anaerobi	67	10	0
Agar Cioccolato	60	85	10
Agar sangue per anaerobi, selettivo	42	6	0
Terreno selettivo per Gram Neg.	32	68	5
Terreno selettivo per <i>Pseudomonas</i>	0	3	0
Terreno per <i>Salmonella</i>	0	2	0
Terreno selettivo per Stafilococchi	23	46	4
Terreno selettivo per Cocchi Gram pos.	15	32	0
Terreno selettivo per Enterococchi	6	19	1
Terreno per miceti (tipo Sabouraud)	20	48	18
Terreni cromogeni per batteri	8	15	2
Terreni cromogeni per miceti	10	16	14

Se non vengono messi a incubare immediatamente, i flaconi vengono conservati: a temperatura ambiente (83 lab su 91, pari al 92.3%), in termostato (6 lab, 6.6%) o in frigorifero (1 lab, 1.1%).

Esame e processazione dei flaconi positivi

I flaconi vengono esaminati e, se positivi, processati almeno una volta al giorno da lunedì a venerdì in tutti i laboratori: solo una volta al giorno in 20 laboratori su 98 (20.4%), due volte al giorno in 11 lab (11.2%), più di due volte in 67 lab (68.4%).

Di sabato la situazione cambia poco: dai dati dei 93 laboratori che hanno risposto si rileva che in due laboratori (2.2%) le emocolture non vengono processate, una sola lettura è effettuata da 29 laboratori (31.2%), due letture da 16 laboratori (17.2%), più letture da 46 (49.5%).

Ben diversa la situazione di domenica e festivi (rispondono 81 lab): esaminano e processano i campioni solo la metà dei laboratori (42 lab. pari al 51.9%): una volta 26 lab, due volte 5 lab., più volte 11 lab.

Non esaminano, invece, i flaconi delle emocolture nelle giornate festive 39 lab (48.1%) sugli 81 che hanno risposto al quesito.

Poche le differenze in base al tipo di laboratorio (Tabella 9): processano i campioni la domenica il 54.5% dei lab di microbiologia contro il 50% dei lab generali. Alcuni lab segnalano che nei giorni festivi i campioni vengono processati se presente personale della batteriologia (4 lab), se il clinico

lo richiede (2 lab) o in caso di festività consecutive (3 lab).

Esame microscopico

L'esame microscopico viene effettuato routinariamente da 89 lab su 100, talora da 9 lab, mai da 2 lab. I lab usano per lo più la colorazione di Gram (85 su 89 lab che effettuano sistematicamente l'es. microscopico). Alcuni laboratori utilizzano (in particolare a fronte di una negatività del Gram) la colorazione di arancio di acridina.

Identificazione diretta

L'identificazione diretta (effettuata su brodo senza attendere la crescita delle colonie su terreno solido) non fa parte del bagaglio culturale, o almeno delle prassi operative delle microbiologie italiane: solo 12 lab su 100 dichiarano di procedere all'identificazione diretta dal brodo-sangue (erano solo 10 su 107, pari al 9.3% nel 2010). 21 lab dichiarano di effettuare talora i *test* diretti di identificazione. 67 lab non effettuano mai tali *test* (Tabella 10).

Il *test* è effettuato di *routine* più dai lab di Microbiologia che da quelli generali (21.1% vs 6.5%) (Tabella 10). Il dato forse può essere letto criticamente perché è possibile che qualche identificazione diretta venga effettuata ancorché non in modo sistematico e su tutti gli isolati (complessivamente in 21 lab su 100); l'identificazione diretta resta però ancora oggi una pratica poco applicata.

Tabella 8. I flaconi vengono messi subito negli incubatori anche di notte e nei giorni festivi? Confronto tra Microbiologie "autonome" e Laboratori generali con sezione di microbiologia.

Nelle ore notturne	Microbiologie		Laboratori Generali	
	n	%	n	%
no	30	78.9	19	30.6
si	8	21.1	43	69.4

Nei giorni festivi	Microbiologie		Laboratori Generali	
	n	%	n	%
No/non sempre	18	47.4	10	16.1
si	20	52.6	52	83.9

Tabella 8. Frequenza di processazione / die dei campioni positivi.

	Una volta	Due volte	Più di due volte	Mai	N. Lab.
Nei giorni feriali	20	11	67	0	98
Il sabato	29	16	46	2	93
Domenica e festivi	26	5	11	39	81

Tabella 9. Processazione dei campioni nelle giornate festive: lab di Microbiologia vs Lab Generali.

	Generale		Microbiologia		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%
Si	24	50	18	54.5	42	51.9
Mai	24	50	15	45.5	39	48.1
Tot. risposte	48	100	33	100.0	81	100.0

Antibiogramma diretto

Su 100 lab, effettuano di *routine* l'antibiogramma diretto 29 lab, lo effettuano talora 23 lab, non lo effettuano 48 lab. I dati (tabella 11) sono sostanzialmente simili a quanto osservato nel 2001: allora l'antibiogramma diretto risultava effettuato da 19 lab su 102, pari al 18.6%.

Il *test* sembra essere effettuato più nei laboratori autonomi di microbiologia che nei laboratori generali: lo effettuano di *routine* 12 su 62 lab generali (19.4%) e 17 su 38 lab di microbiologia (44.7%).

La grande maggioranza dei lab che effettuano l'antibiogramma diretto conferma il risultato ripetendo l'antibiogramma su colonie isoalte. Su 61 laboratori ripetono il *test* 53 (86.9%), non lo confermano 8 (13.1%).

Trentasette laboratori forniscono indicazioni anche sul metodo usato (8 lab riferiscono l'uso di due metodiche): antibiogramma manuale in agar diffusione (24 lab, pari al 53.3%), E-*test* (11 lab, 24.4%), Sistemi automatici (10 lab, 22.2%), rispettivamente: Vitek2 (7 lab), Microscan (2 lab), Phoenix (1 lab).

Uso di terreni specifici per la ricerca di miceti

L'uso di terreni specifici per la ricerca di miceti (99 risposte) è utilizzato di *routine* da 11 su 100 lab (11.1%) ed occasionalmente da 9 lab (9.1%). La grande maggioranza dei lab (79 lab, 79.8%) non utilizza terreni specifici per miceti. Quattro laboratori segnalano l'uso di sistemi non in brodo per la ricerca di miceti (Dupont Isolator).

Rapporti con i medici curanti

L'ultima parte del questionario era indirizzata a conoscere i rapporti e lo scambio di informazioni con i medici curanti: dal microbiologo al clinico per la fase pre-analitica (suggerimenti per la corretta esecuzione del prelievo, disponibilità e diffusione di indicazioni scritte) e nell'interpretazione del referto (segnalazione di possibili contaminanti), dal clinico al microbiologo (informazioni clinico anamnestiche utili ad ottimizzare la fase analitica (Tabella 12).

Le risposte alle tre domande del questionario sono riportate di seguito.

- "Avete fornito ai reparti indicazioni scritte sulle modalità di prelievo?" rispondono 100 laboratori: sì 96 lab, no 4 lab.
- "Il modulo di richiesta prevede la trasmissione al laboratorio di notizie cliniche?" rispondono 97 laboratori: sì 78 (80.4%), no 19 (19.6%).
- "Indicate sul referto se il germe isolato è un probabile contaminante?" rispondono 99 laboratori: lo segnalano 75 laboratori (75.8%), non lo segnalano 24 (24.2%). Settanta lab forniscono indicazioni anche sui criteri utilizzati per definire il microrganismo come probabile contaminante basati principalmente sulla specie di appartenenza dell'isolato ed il numero di emocolture positive; 3 laboratori si basano l'algoritmo di Weinstein (41) per l'interpretazione di patogenicità dell'isolato; in 5 casi l'interpretazione viene effettuata anche dopo aver preso contatto con il clinico.

I dati di confronto 2001 vs 2010 sono riportati nella tabella 12.

Tabella 10. Lab che eseguono di routine l'identificazione "diretta" (partendo dalla brodocoltura)

	Generale		Microbiologia		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%
No	46	74.2	21	55.3	67	67.0
Sì	4	6.5	8	21.1	12	12.0
Talora	12	19.4	9	23.7	21	21.0
Totale	62	100.0	38	100.0	100	100.0

Tabella 11. Lab che eseguono di routine l'antibiogramma "diretto" (partendo dalla brodocoltura).

	Generale		Microbiologia		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%
No	35	56.5	13	34.2	48	48.0
Sì	12	19.4	17	44.7	29	29.0
Talora	15	24.2	8	21.1	23	23.0
Totale	62	100.0	38	100.0	100	100.0

Tabella 12. Collaborazione con i medici curanti 2001/2010.

	no		sì		n. risposte	
	2010	2001	2010	2001	2010	2001
Indicazioni scritte alle UO per prelievo	4	16	97	93	101	109
Informazioni cliniche sul Modulo di richiesta	19	35	78	73	97	108
Indicazione di sospetta contaminante	24	31	75	78	99	109

L'ultima domanda del questionario, non riguardava le prassi di gestione delle emocolture, ma la disponibilità a partecipare a futuri questionari. Alla domanda "Sei interessato a partecipare in futuro ad analoghe indagini via web?" rispondono 98 lab, tutti in modo affermativo.

DISCUSSIONE

Pur a fronte di nuove tecnologie (biologia molecolare in particolare), l'emocoltura rimane tutt'oggi uno dei più importanti esami della microbiologia clinica. Una delle maggiori critiche che sono indirizzate all'emocoltura (a parte la reale necessità dei tempi minimi di incubazione) sono i risultati negativi pur in presenza di un paziente settico. Bisogna considerare che la negatività può non dipendere dall'esame in sé, ma dai comportamenti sbagliati nella fase che precede l'invio dell'esame in laboratorio (volume di sangue prelevato, momento del prelievo, numero dei set prelevati, modalità di conservazione in caso di impossibilità di invio rapido al laboratorio stesso ecc...). Queste ed altre cruciali variabili sono importanti per l'ottimizzazione dell'esame e sono state solo in parte indagate dalla nostra indagine. Un punto molto importante che fu sottolineato nel nostro precedente lavoro (12) riguardava, in generale, lo scarso ricorso all'emocoltura rispetto alle reali necessità cliniche. L'importanza dell'emocoltura è stata autorevolmente sottolineata nelle linee guida della Society of Critical Medicine e dalla Infectious Disease Society of America, riferite in verità ai pazienti delle Terapie intensive, che affermano: "Because the information provided by a positive blood culture can have such important prognostic and therapeutic implications, blood cultures should be performed for patients with new fever, even when the clinical findings do not strongly suggest a noninfectious cause" (24).

Per conoscere la situazione nel nostro paese 9 anni fa fu effettuata un'indagine raccogliendo informazioni da 110 laboratori rappresentativi della situazione nazionale (12). Negli anni successivi sono state pubblicate linee guida/percorsi diagnostici da parte dell'AMCLI ed altre società scientifiche sia di laboratorio che cliniche (7, 15, 2, 16) e sono stati organizzati corsi, congressi, convegni ecc. sull'argomento emocolture e/o sepsi. La nuova indagine fornisce una serie di dati utili per capire se lo "sforzo educativo" messo in atto in questi anni abbia prodotto i risultati sperati.

Questa seconda indagine ha raccolto informazioni sull'attività di 100 laboratori che coprono l'intero territorio nazionale. Rispetto all'indagine precedente, sono state utilizzate modalità di arruolamento simili; come per l'indagine del 2001 le risposte potrebbero fornire un quadro non rappre-

sentativo della situazione italiana, sia perché sono stati coinvolti gli iscritti all'Associazione professionale (che potrebbero essere più sensibili alle tematiche microbiologiche), sia per una possibile autoselezione dei rispondenti (potrebbero aver risposto i colleghi più interessati e motivati). Si deve poi aggiungere che solo 45 laboratori hanno partecipato ad entrambe le indagini; anche di questo dato si deve tener conto quando si mettono a confronto i risultati dell'indagine sul 2010 con quelli dell'indagine sul 2001.

Quando possibile i dati sono stati confrontati con quelli raccolti in precedenti indagini italiane, e di altri Paesi (19, 20, 3, 31) per verificare gli eventuali cambiamenti, i *trend* e i problemi irrisolti.

Infine, i risultati sono stati letti e commentati alla luce dei numerosi ed autorevoli documenti e linee guida (7, 15, 2, 16) per la corretta esecuzione dell'emocoltura, anche se tuttora alcuni aspetti sono ancora controversi o mancano prove di efficacia. Dall'analisi delle risposte, anche questa volta emergono alcuni aspetti che meritano attenzione e la formulazione di nuovi ulteriori sforzi atti a migliorare ancora l'attività diagnostica microbiologica che ancora è lontana dall'essere ottimale.

La richiesta di emocoltura

I dati relativi ai prelievi per emocoltura nell'anno 2010 evidenziano complessivamente una grande inversione di tendenza rispetto al passato con un sostanziale raddoppio dei flaconi esaminati rispetto ai dati rilevati nel 2001. Questo dato è solo in parte spiegabile con la diversità del campione (diversi laboratori in ospedali di diverse dimensioni) o dal fatto che hanno risposto ospedali di maggiori dimensioni.

L'aumento dei flaconi processati nel 2010 è maggiore rispetto al 2001 un po' per tutti gli ospedali. Due dati: nel 2001 più della metà degli ospedali con meno di 200 p.l. processava meno di 500 flaconi (11 lab su 21), oggi solo 2 lab su 11 processano meno di 500 flaconi; nel 2001 sui 21 lab afferenti ad ospedali con 401-700 p.l. solo 7 processavano più di 5000 flaconi, oggi 28 lab su 28 processano più di 500 flaconi.

Riteniamo che l'aumento dei flaconi esaminati possa essere letto come una maggior sensibilità rispetto all'importanza diagnostica dell'emocoltura. La Tabella 16 evidenzia l'aumento negli anni del numero di flaconi processati nelle tre indagini AMCLI del 1988, 2001 e 2010. I laboratori che processano un piccolo numero di flaconi (meno di 500) sono scesi dai 50.3% del 1988 ai 5.1% del 2010; quelli che processano molti flaconi (più di 10.000) sono saliti negli stessi anni dall'1.4% al 16.5%.

Il numero di prelievi (set) nella nostra indagine risulta di 0.12% per ricovero. In uno studio (31)

del 1992 il numero di emocolture per ricovero era superiore allo 0.5% negli USA, minore negli altri paesi; allo studio avevano aderito anche sette grandi ospedali italiani con una media di emocolture per ricovero dello 0.16% (con un range di 0.1-0.4%). Difficile trovare in letteratura dati recenti sul numero di emocolture (intese come numero di prelievi indipendentemente dai flaconi inoculati) effettuate in occasione di ricoveri in ospedale. Uno studio dell'European Study Group on Nosocomial Infections (3) condotto in 112 ospedali europei di dimensioni medio-grandi riporta una emocoltura ogni 4.12 ricoveri, 242.4 emocolture per 1000 ricoveri (255.9 negli ospedali comunitari, 192.8 in quelli extracomunitari). La situazione italiana, con 260 flaconi per aerobi per 1000 ricoveri, raddoppia il dato di 10 anni fa e presenta valori analoghi a quelli osservati in Europa.

Aspetti metodologici

a) Avvio dell'incubazione ed eventuale conservazione dei flaconi quando non possono essere inseriti subito nei sistemi meccanizzati.

Le linee guida nazionali e internazionali danno per scontato che si proceda a mettere i flaconi immediatamente nell'incubatore. Tanto che non danno indicazioni sulla modalità di conservazione dei flaconi. Lavori recenti sottolineano i vantaggi, in termini di tempestività e di sensibilità, dell'inserimento precoce negli incubatori (28, 27, 21). La realtà italiana è un po' diversa in quanto molti laboratori non procedono alla immediata incubazione dei flaconi nelle ore notturne (49.5%) e festive (25%). La ragione è di tipo organizzativo come confermano i diversi comportamenti tra laboratori generali (che prevedono l'apertura 24/24 ore e 7/7 giorni.) e laboratori autonomi di microbiologia.

In attesa di porre i flaconi negli incubatori la grande maggioranza dei lab conserva i flaconi a temperatura ambiente (92.2%), 1 lab (1.1%) li conserva in frigorifero, 6.7% in termostato. Quest'ultima modalità non trova riscontro, a nostra conoscenza, in letteratura e potrebbe inficiare i risultati dell'esame.

b) Monitoraggio della positivizzazione

Nel 2010 la grande maggioranza dei laboratori italiani, ed è un dato positivo, utilizza strumenti che provvedono alla rilevazione in continuo dei

segni di crescita. Sono il 96%, rispetto all'83.6% dell'indagine del 2001.

Un punto dolente che rimane anche nel 2010 (anche se c'è stato un progresso) è la mancata processazione dei campioni positivi, nei giorni festivi da parte di 39 laboratori su 81 pari al 48.1%. Nel 2001 era maggiore il numero dei lab che non processavano le emocolture nelle giornate festive (63 su 98, pari al 66.3%). Tale numero resta maggiore anche qualora si vogliano considerare le mancate risposte al recente questionario come non processazioni dei campioni (in tal caso la percentuale dei laboratori che non esaminano le colture di domenica salirebbe, nel 2010, al 58%).

Il problema non è assolutamente di facile soluzione perché non dipende dalla volontà del laboratorio ma nella maggior parte dei casi dalle risorse a disposizione del laboratorio stesso. Se una responsabilità si può addossare ai microbiologi semmai è quella di non essere riusciti (non essere stati convincenti) ad ottenere quanto necessario all'apertura nei giorni festivi. Già nove anni fa, all'epoca della prima indagine, avevamo commentato che, in tempi di grande attenzione alle spese correnti, potrebbe risultare difficile trovare interlocutori sensibili: la cosa è molto più difficile in questo momento.

c) Tempo di incubazione

Per quanto riguarda i sistemi manuali la durata dell'incubazione consigliata, salvo condizioni cliniche e microbiologiche che prevedano un prolungamento, è di sette giorni. Per quanto riguarda i sistemi assistiti da strumentazione la maggior parte degli autori suggerisce tempi di incubazione di 5 giorni, sempre escludendo i casi di necessario prolungamento. Nella esperienza di uno degli Autori dopo 5 giorni si ha crescita del 98.9% dei patogeni, contro il 99.8% delle crescite dopo 7 giorni (22). L'indagine del 2010 evidenzia una diffusa riduzione dei tempi di incubazione per i metodi meccanizzati verso i 5 giorni (42% lab rispetto al 9.5% del 2001) rispetto ai 7 della precedente indagine.

Non sembrano esserci indicazioni al prolungamento oltre i 5 giorni neppure nel sospetto di batteri cosiddetti "fastidiosi" come *Brucella* spp., gruppo HACEK, *Granulicatella* spp. ed *Abiotrofia* spp. Quando si utilizzino sistemi auto-

Tabella 16. Distribuzione (%) dei lab. per n. di flaconi esaminati: confronto dei dati dell'indagine con precedenti indagini effettuate nel 1988 (11) e 2001 (12).

	Numero di flaconi esaminati					
	<500	500-1000	1001-2000	2001-5000	5001-10000	>10000
Italia, 98 Ospedali (2010)	5.1	4.2	9.1	24.5	30.6	26.5
Italia, 109 Ospedali (2001)	17.1	17.1	10.5	30.5	11.4	13.3
Italia, 145 Ospedali (1988)	50.3	22.1	12.4	11.0	2.8	1.4

matici. Alcuni autori (7) propongono, nel sospetto di endocardite, di effettuare al termine dei 5 giorni subculture in agar cioccolato. La prassi dei laboratori italiani è invece più “conservativa” con prolungamento dell’incubazione in molti laboratori. Da capire quanto queste prassi siano frutto di un’abitudine o di una precisa scelta. Certamente un punto su cui riflettere per vedere se sia possibile arrivare ad un *consensus*.

d) Esame microscopico

Da ogni flacone positivo deve essere effettuato tempestivamente un esame microscopico (Gram e/o arancio di acridina) per confermare la positività e la presenza di miceti o batteri, e per questi ultimi, i caratteri tintoriali. I risultati vanno comunicati telefonicamente, via fax o altri mezzi entro un’ora dalla constatazione della positività della coltura. Tale prassi risultava già ampiamente diffusa nel 2001, con una quota però non piccola di laboratori (15 su 108, pari al 13.9%) che dichiaravano di non effettuare l’esame microscopico: questi ultimi erano variamente distribuiti nel Paese e operavano in ospedali di varie dimensioni (da 90 a 1130 p.l.). Dall’attuale inchiesta, risultano invece solo 2 i laboratori che non effettuano l’esame microscopico e 9 che lo eseguono “talora”. Anche attualmente è largamente utilizzata la colorazione di Gram (80% dei lab nel 2010 ed 86% nel 2001, pari all’86%); nel 2010 tre laboratori usano anche arancio di acridina che non dà informazioni sulle caratteristiche tintoriali, ma offre una maggior sensibilità (utili in caso di batteriemie sostenute germi che si colorano poco o con difficoltà, quali *Brucella* spp. o *Campylobacter* spp.). I dati sono sostanzialmente simili a quelli rilevati nell’indagine del 2001.

Ripetiamo anche in questa occasione quanto già specificato nel precedente lavoro e cioè che il referto deve essere il più descrittivo possibile. Se la lettura è fatta da un microbiologo esperto è preferibile specificare “cocchi Gram positivi a grappolo: probabile stafilococco” piuttosto che “cocchi Gram positivi”. Il *test* serve anche come guida all’esecuzione di eventuale identificazione ed antibiogramma “diretti”. Attenzione però: deve essere chiarito al medico curante che microscopicamente non possiamo distinguere lo stafilococco aureo dagli altri stafilococchi per cui occorre molta prudenza nell’interpretazione del risultato perché potrebbe essere un inquinante!

e) Sottocoltura su terreni solidi

In letteratura viene raccomandata la sottocoltura su terreni che assicurino la crescita di microrganismi esigenti (agar sangue in aerobiosi, agar sangue per anaerobi in anaerobiosi, agar cioccolato

(in CO₂) e su terreni selettivi-differenziali: un terreno selettivo-differenziale per Gram negativi e su un terreno selettivo per Gram positivi (aggiunti di *routine*, o sulla base del Gram, risultano particolarmente utili in caso di batteriemie polimicrobiche e/o per anticipare i risultati).

Come nel 2001, anche attualmente la realtà italiana appare estremamente variegata.

Senza entrare nel dettaglio, la situazione del 2010 è simile a quella del 2001, con la differenza che sono entrati in uso i terreni cromogeni per batteri e per miceti (usati da 33 laboratori) e si fa un minor uso dei terreni selettivi per *Salmonella* spp. e *Pseudomonas* spp.

Altra osservazione da fare è che in generale nel 2010 come nel 2001 si evidenzia una ridondanza di uso dei terreni. Su questo dato bisogna riflettere perché evidentemente su questo punto i vari percorsi diagnostici, linee-guida, convegni, corsi ecc... non sono stati efficaci nell’indirizzare all’uso di un profilo ottimale o perché hanno ignorato il problema o non lo hanno ritenuto importante (ad esempio la linea-guida del CLSI lo ignora completamente) o perché non lo hanno posto con la dovuta evidenza.

L’uso di agar cioccolato, agar sangue per anaerobi e terreni cromogeni potrebbe costituire un buon compromesso consentendo la crescita di microrganismi esigenti ed anticipando informazioni utili per l’identificazione attraverso l’osservazione di differenze morfologiche e “macrotintoriali”.

f) *Test* “diretti” per l’identificazione e l’antibiogramma

È bene dire subito che non ci sono procedure approvate né standardizzate; ciò nonostante alcune linee guida ne consigliano l’esecuzione (15, 16). L’uso dei *test* diretti viene lasciato alla responsabilità ed esperienza personale tenendo presente che risultati scorretti possono fuorviare l’indirizzo terapeutico e risultare dannosi: quindi massima prudenza nell’interpretazione del risultato da comunicare al clinico.

Esistono però numerosi lavori in letteratura che propongono modalità affidabili di identificazione “diretta” (6, 9, 25); un algoritmo particolarmente dettagliato è riportato sul testo di Isenberg (16). L’esperienza anche di colleghi italiani (4, 5, 13, 14), ha dimostrato che gli errori negli antibiogrammi diretti sono quasi solo *minor error*. Questa è l’esperienza anche dei laboratori di Microbiologia dell’ospedale Careggi di Firenze e Ospedali Riuniti di Bergamo.

Anticipare di 24 ore il risultato, almeno dell’antibiogramma, potrebbe avere una positiva ricaduta clinica (18, 19), tanto più importante in una patologia, la sepsi, che può avere una rapida evoluzio-

ne clinica e, nelle forme gravi o con *shock*, una alta mortalità, compresa tra il 20 e il 50%.

In altri Paesi molti lab effettuano *test* diretti: dall'indagine americana, già citata (19, 20), risulta che il 31% dei laboratori effettua *test* diretti per l'identificazione e il 75% *test* diretti per l'antibiogramma. In Italia *test* diretti erano effettuati per identificazione ed antibiogramma rispettivamente dal 9.3% e dal 17.9% nel 2001; nel 2010 l'identificazione diretta viene effettuata dal 12% e talora dal 21% (in aumento rispetto al 2001) mentre l'antibiogramma diretto viene effettuato dal 29% e talora dal 22% il che vuol dire che ancora la metà dei laboratori intervistati (49%) non effettua l'antibiogramma diretto (è un piccolo miglioramento rispetto al 2001 ma a nostro parere dovremmo anche in questo caso arrivare al 100%). Nel 2010 i *test* diretti risultano effettuati soprattutto nei laboratori di grandi dimensioni (il 60% dei laboratori in strutture con più di 1000 posti letto effettua l'antibiogramma diretto ed un 53% nei laboratori fra 400 e 1000 posti letto).

La disponibilità ed il diffondersi di metodiche quali la spettrometria di massa (MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry) o i *test* di ibridazione *in situ* (PNA FISH) fanno pensare ad un uso sempre più esteso nei prossimi anni di *test* di identificazione diretta.

g) Collaborazione con i clinici

Già nel precedente lavoro fu sottolineata ed enfatizzata l'utilità di una stretta collaborazione tra medico curante e microbiologo e risulta particolarmente importante nel caso dell'emocoltura: tre gli aspetti considerati dal questionario.

La disponibilità per il microbiologo di informazioni cliniche sul paziente per decidere eventuali strategie alternative alla *routine*: è il caso del prolungamento dell'incubazione nel sospetto di particolari patologie. Tale prassi attualmente è adottata dall'80.4% dei laboratori dei 97 che hanno risposto alla domanda con un sensibile aumento rispetto al 2001 (73 lab su 108, pari a 67.6%).

Più diffusa invece la prassi di produrre e distribuire all'utenza indicazioni per la fase preanalitica (97% nel 2010, 85.3% nel 2001), segno di una crescente sensibilità del microbiologo ad affrontare temi al di fuori dello stretto ambito analitico. Nell'indagine del 1988 era risultato che riceveva notizie cliniche il 62.5% dei lab, ed aveva prodotto e distribuito indicazioni scritte per la raccolta il 60%.

Di fronte all'isolamento di un probabile contaminante danno indicazione sul referto 75 laboratori su 99 (75.8%); la situazione è pertanto sovrapponibile a quella del 2001 (78 su 109, pari 71.6%) ed

appare in linea con le indicazioni delle linee guida internazionali, anche se l'interpretazione del risultato non è sempre agevole (32). Dai dati del 2010 i parametri utilizzati per definire un isolato come probabile contaminante si basano essenzialmente sui criteri microbiologici della positività multipla e della specie di appartenenza del microrganismo isolato (solo 5 consultano anche il clinico). Assai significativi i risultati di un'indagine effettuata in un Ospedale inglese (23): il 97% dei medici ha detto di approvare l'inserimento nel referto di un commento del microbiologo (ed esempio: "probabile infezione" o "probabile contaminazione"). Anche se il giudizio definitivo spetta al curante, il microbiologo può portare un importante contributo rispetto al significato clinico del germe isolato, nell'ambito di una stretta collaborazione tra clinico e laboratorista (8).

CONCLUSIONI

In generale le conclusioni di questa nostra seconda indagine sono abbastanza vicine a quelle della precedente e cioè una sostanziale diffusa correttezza nell'esecuzione dell'emocoltura, con una buona adesione ai protocolli diagnostici prodotti dalle società scientifiche, agenzie sanitarie o linee-guida internazionali.

Alcuni aspetti critici evidenziati dalla precedente indagine sono stati, nel corso degli ultimi anni, migliorati ma ancora permangono. Un aspetto nettamente diverso (in positivo) è l'utilizzo dell'emocoltura che si può dedurre dall'uso dei flaconi che è notevolmente aumentato rispetto al 2001.

Altra osservazione è che i *test* diretti, specialmente identificazione ed antibiogramma, pur essendo più utilizzati che in passato sono ancora lontani dall'ideale. Permangono due aspetti critici legati all'organizzazione ed alle risorse disponibili:

- la mancata esecuzione e/o prosecuzione del *test* nei giorni festivi (circa il 50% dei laboratori è chiuso) e
- il ritardo nell'immissione dei flaconi nell'incubatore (notte e giorni festivi).

Sono problemi complessi che superano la buona volontà del microbiologo. Nel primo caso sono necessarie risorse che devono arrivare dalle direzioni generali che devono capire l'importanza clinica di risposte microbiologiche tempestive (a noi l'onere di sensibilizzare chi di dovere e convincerli della bontà della scelta). Nel secondo caso è invece possibile rispondere attraverso la collaborazione dei colleghi biochimici i cui laboratori sono aperti sulle 24 ore (ed il compito di inserire i flaconi negli incubatori non richiede particolari competenze o impegno di tempo). Su questi aspetti è auspicabile ancora un forte impegno delle società scientifiche attraverso l'organizzazione di

momenti formativi e la sensibilizzazione delle autorità sanitarie, ma anche dei microbiologi per attivare iniziative di scambio e di confronto con i colleghi clinici.

Infine, anche se in questo lavoro si parla dell'emocoltura e quindi dobbiamo tenerci strettamente al tema, teniamo presente che c'è stata una grande evoluzione delle metodiche sia tradizionali che in biologia molecolare che integrandosi con l'emocoltura stessa ma senza nulla togliere alla sua, per ora indispensabilità, possono dare un forte contributo alla riduzione del *turn around time*.

Per concludere un grazie ai numerosi colleghi che hanno saputo e voluto trovare il tempo per raccogliere e comunicarci i loro dati.

Ringraziamenti

Un sentito ringraziamento ai colleghi che, compilando e restituendo il questionario, hanno reso possibile l'indagine.

BIBLIOGRAFIA

- Baron EJ, Thomson RB Jr. Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Versalovic J, Carroll KC, Funke G e al. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., American Society for Microbiology, Washington D.C., USA.
- Baron EJ. Cumitech 1C: Blood Cultures IV 2005. ASM Press.
- Bouza E, et al. On behalf of the Cooperative Group of the European Study Group on Nosocomial Infections (ESGNI). Bloodstream infections in Europe. Report of ESGNI-001 and ESGNI-002 Studies. <http://www.esgni.org/Esgni01-02.html>.
- Cali AM, Gualdi P, Maffei R, Schinella M. Tra microbiologia tradizionale e tecniche molecolari: le possibilità per un laboratorio medico di ridurre il TAT e migliorare l'*outcome* nella diagnostica delle infezioni del sangue. *Microbiol Medica* 2002; 17: 96-7.
- Callegaro A, Basaglia G, Mucignat G, Pascoli L, Tarabini G, Santini G. Uso di *E-Test* per il saggio di sensibilità diretto da emocolture. *Microbiologia Medica* 1995; 10: 100-1.
- Chorny JA, Wilson ML. Rapid detection and identification of microorganisms from blood cultures. *Clin Lab Med* 1994; 14: 181-95.
- CLSI. Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline CLSI Document M47-A, Wayne PA: Clinical Laboratory and Standards Institute; 2007.
- Cunney RJ, Smith EG. The impact of laboratory reporting practice on antibiotic utilisation. *International J Antimicrobial Agents* 2000; 14: 13-9.
- Davis TE, Fuller DD, Aeschleman EC. Rapid, direct identification of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* from blood cultures using commercial immunologic kits and modified conventional tests. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992; 15: 295-300.
- Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy Bruce. Clinical Impact of Rapid *In Vitro* Susceptibility Testing and Bacterial Identification. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1757-62.
- Goglio A, Marchiaro G, Notarnicola MA, Piacentini I, Scagnelli M. L'emocoltura nei laboratori italiani. *L'igiene moderna* 1990; 93: 143-59.
- Goglio A, Nicoletti P. Indagine nazionale sulle metodiche per emocoltura in Italia. *Microbiologia Medica* 2004; 9 (1): 1-10
- Goglio A, Marchiaro G. Affidabilità dell'antibiogramma diretto da emocolture. *BML* 1993; 1: 41-8.
- Goglio A. La sepsi: rilevanza clinica e problemi di diagnosi microbiologica con metodi rapidi non automatizzati. Emergenza e diagnosi rapida in microbiologia clinica, Monografia di Microbiologia Medica dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Milano, 1985.
- Health Protection Agency. Standard operative procedure. Investigation of blood cultures (for organisms other than *Mycobacterium* species). BSOP 37, Issued by Standards Units, Evaluations and Standards Laboratory, <http://www.phls.co.uk/dir/hq/sops/bsop-pdf/bsop37i3.1.pdf>. Issue date: 02.06.03.
- Iseberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. 2007. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA.
- Johnson JR. Multiple Blood Cultures for Diagnosing Bacteremia. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 738.
- Kang CI, Kim SH, Kim HB, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: Risk factor for mortality ad Influence of Delayed Receipt of Effective Antimicrobial Therapy on Clinical Outcome. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 745-51.
- Kehl KSC. Results of Survey of Blood culture Methods: part I *CI Microbiol Newsletter* 1986; 8, 117-20.
- Kehl KSC. Results of Survey of Blood culture Methods: part II *CI Microbiol Newsletter* 1986; 8: 127-32.
- Kerremans JJ, et al. Immediate Incubation of Blood Cultures Outside Routine Laboratory Hours of Operation Accelerates Antibiotic Switching. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3520-3.
- Moioli F, Arosio M, Facheris MA, et al. Emocolture: valutazione dei tempi di crescita con il sistema Bact/Aler. *Microbiologia Medica* 2001; 16: 219.
- Morgan MS. Perceptions of a medical microbiology service: a survey of laboratory users. *J Clin Path* 1995; 48: 915-8.
- O'Grady NP, Barie PS, Bartlett JG, et al. Practice Guidelines for evaluating new fever in critically ill adult patients. *Clinical Infectious Diseases* 1998; 26: 1042-59.
- Rappaport T, Sawyer KP, Nachamkin I. Evaluation of several commercial biochemical and immunologic methods for rapid identification of Gram positive cocci directly from blood cultures. *J Clin Microbiol* 1988; 28: 1335-8.
- Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 444-65.
- Saito T, et al. Delayed insertion of blood culture bottles into automated continuously monitoring blood culture systems increases the time from blood sample collection to the detection of microorganisms in bacteremic patients. *J Infect Chemother.* 2009; 15: 49-53.
- Sautter RL, et al. Effects of Delayed-Entry Conditions on the Recovery and Detection of Microorganisms from Bact/ALERT and BACTEC Blood Cultures Bottles. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44: 1245-9.
- Shafazand S, Weinacker AB. Blood cultures in the Critical Care Unit: Improving Utilization and Yield. *Chest* 2002; 122: 1727-36.
- Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock

2008. Crit Care Med. 2008; 36(1): 296-327.
31. Washington JA and the International Collaborative Blood Culture Study Group. An International Multicenter Study of Blood Culture Practices. Eur J Clin Microbiol Infect Dis., December 1992, 1115-28.
 32. Weinstein MP. Blood Culture Contamination: Persisting Problems and Partial Progress J Clin Microbiol 2003; 41: 2275-8.
 33. Weinstein MP, Reller LB, Murphy JR, et al. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults; I. Laboratory and epidemiological observations. Rev Infect Dis 1983; 5: 35-53.
 34. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. Clin Infect Dis 1997; 24: 584-602.
 35. Weinstein MP. Current blood culture methods and systems: clinical concepts, technology, and interpretation of results. Clin Infect Dis 1996; 23: 40-6.