



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII,
MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA



AGENȚIA NAȚIONALĂ
PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ

GHID

Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor



Chișinău, 2020



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII,
MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA



AGENȚIA NAȚIONALĂ
PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ

GHID

Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor

Chișinău, 2020

Aprobat la ședința Consiliului de Experți al Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale, Proces-verbal nr.2 din 03.07.2020

Aprobat și implementat prin ordinul Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale nr.696 din 29.07.2020 Cu privire la aprobarea Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”

Colectivul de autori:

Burduniuc Olga, doctor în științe medicale, conferențiar cercetător
Bălan Greta, doctor în științe medicale, conferențiar universitar
Sofronie Olga, cercetător științific, master în sănătate publică
Bucov Victoria, doctor habilitat în științe medicale, profesor cercetător
Holban Tiberiu, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar
Maria Bivol, cercetător științific stagiar

Recenzenți:

Rudic Valeriu, doctor în științe biologice, doctor habilitat, profesor universitar, academician, Om emerit
Spînu Constantin, doctor în științe medicale, doctor habilitat, profesor universitar, academician, Om emerit

Acest ghid reprezintă pasul prin care evidențele științifice sunt transferate în domeniul practicii medicale, prin care se asigură, unui pacient individual, asistența medicală corespunzătoare, prin prisma informațiilor existente la momentul respectiv.

Ghidul este destinat specialiștilor din cadrul Agenției Naționale pentru Sănătate Publică, instituțiilor medico-sanitare care oferă servicii de laborator (medici microbiologi, felceri laboranți) și asistență medicală (medici clinicieni, asistenți medicali).

Informația prezentată în ghid este relevantă și pentru procesul didactic, în formarea și educarea continuă a medicilor și a personalului medical cu studii medii.

Ghidul stabilește principii și proceduri în testarea hemoculturilor și oferă recomandări specifice pentru colectarea, transportarea și investigarea microbiologică a sângelui.

În ghid nu vor fi abordate proceduri de identificare a agenților patogeni. Testarea sensibilității la antimicrobiene a microorganismelor este abordată în standardul EUCAST (Rapid AST in blood cultures, AST of bacteria, AST of fungi).

Descrierea CIP a Camerei Naționale a Cărții

Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor: Ghid / Burduniuc Olga, Bălan Greta, Sofronie Olga [et al.]; Ministerul Sănătății, Muncii și Protecției Sociale al Republicii Moldova, Agenția Națională pentru Sănătatea Publică. – Chișinău: S. n., 2020 (Î.S. F.E.-P. „Tipografia Centrală”). – 56 p.: fig., tab.

Referințe bibliogr.: p. 52-56 (74 tit.). – 450 ex.

ISBN 978-9975-151-43-6.

Acest ghid a fost tipărit cu suportul financiar al Uniunii Europene în cadrul eforturilor de răspuns la pandemia COVID-19 ale Uniunii Europene și Organizației Mondiale a Sănătății în cadrul Parteneriatului Estic și a Programului „Solidari pentru Sănătate”. Conținutul și opiniile exprimate în text aparțin autorilor și nu reflectă în mod necesar viziunea și politicile UE și OMS.



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA

ORDIN
mun. Chișinău

„19 „ iulie 2020

nr. 696

Cu privire la aprobarea Ghidului
„Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”

În vederea standardizării și asigurării calității serviciilor medicale de laborator, precum și implementarea reglementărilor internaționale în interesul sănătății publice globale, în temeiul prevederilor Hotărârii Guvernului nr.694/2017 Cu privire la organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale,

ORDON:

1. Se aprobă Ghidul „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”, conform anexei.

2. Conducătorii prestatorilor de servicii medicale de laborator vor organiza implementarea și monitorizarea eficienței aplicării în activitatea practică a prevederilor Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”.

3. Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale va întreprinde măsurile necesare în vederea asigurării pieței farmaceutice din Republica Moldova cu medicamentele și dispozitivele medicale incluse în Ghidul „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”.

4. Compania Națională de Asigurări în Medicină:

1) va asigura finanțarea serviciilor incluse în Ghidul „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor”;

2) va organiza ghidarea de către angajații din subordine de prevederile Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor” în procesul de executare a atribuțiilor funcționale, inclusiv în validarea volumului și calității serviciilor acordate de către prestatorii contractați în sistemul asigurării obligatorii de asistență medicală.

5. Agenția Națională pentru Sănătate Publică va organiza:

1) evaluarea instituționalizării Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor” în cadrul evaluării și acreditării prestatorilor de servicii medicale de laborator;

2) evaluarea respectării prevederilor Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor” în cadrul controalelor efectuate în instituțiile medico-sanitare;

3) asigurarea accesibilității Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor” pe pagina web a ANSP și acordarea suportului consultativ-metodic în implementarea acestuia în activitatea prestatorilor de servicii medicale de laborator.

6. Instituțiile de învățământ medical vor organiza implementarea Ghidului „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor” în activitatea didactică a catedrelor respective.

7. Ghidul „Principii și proceduri în testarea microbiologică a hemoculturilor” se plasează pe pagina WEB a Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale.

8. Controlul executării prezentului ordin se atribuie dlui Constantin Rîmîș și dlui Alexandru Holostenco, secretari de stat.

Ministru

Viorica DUMBRĂVEANU



CUPRINS:

Abrevieri	5
1. Scop	6
2. Introducere	6
3. Informații generale (definiții, tipuri ale IFS).....	8
4. Recomandări pentru indicarea hemoculturii.....	18
5. Procedura de prelevare a hemoculturii	19
6. Cantitatea necesară și numărul de probe prelevate	22
7. Transportarea și păstrarea hemoculturilor	26
8. Metodologia de procesare a probelor de hemocultură	27
9. Raportarea rezultatelor.....	39
10. Contaminanții.....	41
11. Punctele critice în procesul de investigare a hemoculturii	43
12. Fereastra terapeutică.....	44
Anexa 1 Recomandări de recoltare a hemoculturii (cu seringă).....	46
Anexa 2 Sumar privind diagnosticul de laborator al hemoculturilor în funcție de agentul etiologic	48
Anexa 3 Exemple de testare a hemoculturii.....	50
Anexa 4 Interpretarea și raportarea rezultatelor hemoculturii	51
Referințe	52



ABREVIERI:

AST	– eng. Antimicrobial Susceptibility Testing
EDTA	– eng. Ethylenediaminetetraacetic Acid
EI	– Endocardită Infecțioasă
EUCAST	– eng. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
IAAM	– Infecții Asociate Asistenței Medicale
ID	– Identificare
IFS	– Infecții ale Fluxului Sangvin
MALDI-TOF	– eng. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight
MH	– Mueller Hinton
MH-F	– Mueller Hinton Fastidious
MRSA	– Meticilino-Rezistent <i>Staphylococcus aureus</i>
NICE	– eng. National Institute for Health and Care Excellence
PCR	– Polymerase Chain Reaction
PNSP	– <i>Streptococcus pneumoniae</i> Penicilin-Rezistent
SCN	– Stafilococi Coagulozo-Negativi
SIRS	– eng. Systemic Inflammatory Response Syndrome
TAT	– Turnaround Times
TT	– Timp de Transport
TTD	– Timp de Detectare
UFC	– Unități Formatoare de Colonii
VRE	– Vancomicin Rezistent <i>Enterococcus</i>

Acest ghid descrie procesarea și investigarea microbiologică a hemoculturilor și își propune să stabilească cerințe pentru fiecare etapă a procesului de investigație, fiind un instrument util, pus la dispoziție microbiologilor și clinicienilor. Testele de diagnosticare rapidă trebuie luate în considerare și utilizate în urma validării. Tehnicile moleculare directe, pe prelevate clinice nu sunt abordate de acest ghid, inclusiv detectarea paraziților, virusurilor sau a speciilor de *Mycobacterium*.

Sepsisul reprezintă o criză globală de sănătate ce afectează între 47 și 50 milioane de oameni și cel puțin 11 milioane mor în fiecare an, implicând un deces la fiecare 2,8 secunde. Supraviețuitorii prezintă un risc ridicat de invaliditate pe termen lung.

Sepsisul este o manifestare patologică din cadrul bolilor infecțioase la nivel global, cea mai frecventă cauzată de deces. Din toate decesele din întreaga lume 20% sunt asociate sepsisului. În funcție de țară, mortalitatea variază între 15 și mai mult de 50%. Odată supraviețuiți mulți pacienți suferă de consecințele sepsisului pentru tot restul vieții.

Infecțiile fluxului sanguin pot fi cauzate de bacterii, fungi, virusuri și paraziți, inclusiv și cele cu risc individual și comunitar ridicat (virusul Dengue, Ebola și virusurile febrei galbene, SARS-CoV-2 etc.). Spectrul clinic al infecției COVID-19 variază de la forme asimptomatice la afecțiuni clinice caracterizate prin insuficiență respiratorie, care necesită ventilație mecanică, până la manifestări sistemice în ceea ce privește sepsisul, șocul septic și disfuncția multiplă a organelor. Actualmente sunt disponibile mai multe date științifice referitor la COVID-19. Alianța Globală a Sepsisului aduce dovezi despre efectele SARS-CoV-2 nu numai asupra sistemului respirator, care sunt cunoscute, dar și despre afectarea practic a tuturor sistemelor organismului, provocând sepsis. Managementul pacienților severi cu COVID-19 poate fi complicat de sindromul de detresă respiratorie acută (SDRA), sepsis, șoc septic, coagulopatie intravasculară diseminată și insuficiență multi-organică,

inclusiv leziuni renale acute și leziuni cardiace. Semnele tipice de leziuni multi-organice ale sepsisului apar la aproximativ 2-5% dintre pacienții cu COVID-19 după aproximativ 8-10 zile. Mulți pacienți afectați de COVID-19 pot deceda din cauza septicemiei și a complicațiilor asociate. De aceea este foarte importantă colectarea probelor de sânge și spută pentru izolarea și identificarea agenților patogeni potențiali la toți pacienții cu COVID-19. Prelevarea și investigarea probelor permite excluderea altor cauze ale infecțiilor tractului respirator inferior, monitorizarea acestor pacienți prin prisma evoluției clinice. Rezultatele investigațiilor de laborator permit confirmarea agentului etiologic pentru managementul corect al insuficienței respiratorii progresive și/sau asociate cu sepsisul.

Prin urmare, este vital identificarea semnelor timpurii ale sepsisului, confirmarea de laborator al agentului cauzal și inițierea tratamentului prompt și oportun. Intervenția la timp salvează viața pacientului.

Ghidurile internaționale, inclusiv cele cu referință la COVID-19 recomandă în caz de suspexie a sepsisului administrarea tratamentului antimicrobian empiric în decurs de 1 oră de la evaluarea inițială a stării de sănătate a pacientului și colectarea concomitentă a probelor pentru investigații de laborator. Ulterior, la obținerea rezultatelor de laborator tratamentul antimicrobian se ajustează în baza rezultatelor testelor microbiologice.

Sepsisul este o urgență medicală (precum ar fi atacul de cord, accidentul vascular cerebral sau traumele multiple), frecvent subdiagnosticat în stadiu incipient când este încă potențial reversibil precum și una din complicațiile severe al infecției COVID-19.

Șansele de supraviețuire a pacienților cu sepsis depind în mare măsură de administrarea unui tratament adecvat și în timp util pentru infecția care a cauzat sepsisul.

În lipsa unui diagnostic și tratament prompt, sepsisul poate duce rapid la afectarea țesuturilor, insuficiența organelor ce pune în pericol viața pacientului. Depistarea agentului cauzal al sepsisului poate dura în timp, fiecare minut în diagnosticarea precoce a sepsisului contează și sunt necesare acțiuni urgente din partea tuturor actorilor implicați.

Evidențele medicale demonstrează că uneori infecția care a dus la sepsis este necunoscută și recomandă mai întâi recoltarea prelevatului, urmat de administrarea tratamentului antimicrobian empiric cu spectrul larg de acțiune, ulterior corijat cu rezultatele antibiogramei.

Hemocultura reprezintă însămânțarea și incubarea unei probe de sânge, într-un mediu de cultură adecvat, care urmărește izolarea și identificarea bacteriilor sau fungilor antrenați de fluxul sangvin în anumite condiții patologice.

Hemocultura reprezintă standardul de aur pentru detecția microorganismelor din sânge, primordială în diagnosticul microbiologic al bacteriemiei, fungiemiei, endocarditei infecțioase sau a febrei de origine necunoscută. Hemocultura poate detecta și infecțiile fluxului sangvin, asociate cu pneumonia, artrita septică și osteomielite.

Rezistența agenților patogeni la antimicrobiene, în special bacteriile Gram-negative, este cea mai frecventă cauză a tratamentului empiric ineficient în infecția fluxului sangvin.

Se recomandă reducerea timpului la fiecare etapă a procesului de testare a hemoculturii, de la transportarea probelor până la raportarea rezultatelor. Identificarea rapidă a agentului cauzal și raportarea în timp util a rezultatelor privind sensibilitatea la antimicrobiene pentru izolatele din sânge oferă informații de diagnostic valoroase pentru inițierea și ajustarea (de-escaladarea*) terapiei antimicrobiene, reducând astfel mortalitatea, costurile de asistență medicală și povara socială.

Sângele are efect bactericid, datorat elementelor cu acțiune antimicrobiană pe care le conține: complementul, sistemul properdinic, lizozimul, betalizinele, anticorpii naturali. Microorganismele pot nimeri în fluxul sangvin dintr-un focar de infecție de pe suprafața pielii sau a mucoaselor, a căror integritatea a fost lezată, din tractul gastrointestinal sau prin introducerea directă a materialului contaminat în fluxul sangvin.

Aceste bacterii sunt în mod normal îndepărtate din fluxul sangvin în câteva minute. Numai atunci când sistemele de apărare ale organismului sunt

* Schimbarea tratamentului antimicrobian de spectru larg/multiplu, cu o terapie îngustă/țintită sau întreruperea tratamentului antimicrobian, bazat pe rezultatele identificării și testării antimicrobiene. Poate include, de asemenea, schimbarea administrării de la calea intravenoasă la cea orală sau întreruperea preparatelor antimicrobiene, dacă infecția a fost exclusă.

Termenii *de-escaladare* și *eficientizare* a terapiei antimicrobiene empirice descriu practica de utilizare a rezultatelor identificării și testării antimicrobiene, ca bază pentru eliminarea terapiei combinate inutile și pot ținti mai eficient agentul patogen cauzal, ceea ce duce la scăderea expunerii la preparate antimicrobiene și la economisirea substanțială a costurilor.

epuizate, devine evidentă infecția sistemică. Mortalitatea este legată de tipul de microorganism contractat și de natura bolii. Infecția fluxului sangvin este cauzată de bacteriile (bacteriemie) sau de fungii (fungemie) din sânge și poate fi tranzitorie, intermitentă sau continuă.

Bacteriemie tranzitorie

Prezența tranzitorie a bacteriilor sau a fungilor în sânge pentru o perioadă de câteva minute, poate fi asociată cu extracții dentare și alte intervenții stomatologice, un cateterism uretral, o bronhoscopie, intervenții chirurgicale pe mucoase normal colonizate sau pe focare septice tisulare, urinare, ginecologice. Utilizarea intravenoasă a medicamentelor poate fi, de asemenea, o sursă de bacteriemie tranzitorie prin ace sau medicamente contaminate. Bacteremia tranzitorie apare și în asociere cu infecții localizate, cum ar fi pneumonia pneumococică și pielonefrita.

Bacteriemie intermitentă

Infecția sangvină intermitentă este o infecție tranzitorie recurentă și este asociată cu abcesele nedrenate, intraabdominale. Aceasta apare la începutul unor infecții sistemice și localizate, de exemplu, bacteriemie pneumococică, în cazul pneumoniei pneumococice. Probele de sânge, recoltate în timpul perioadei febrile (pentru alte microorganisme decât speciile de *Mycobacterium*), pot fi negative în bacteremia intermitentă, deoarece bacteriile tind să fie eliminate de către mecanismele de apărare ale gazdei, înainte de prelevare.

Bacteriemie continuă

Bacteremia continuă apare în evoluția unor boli infecțioase ciclice, ca: febrele enterice, leptospiroze etc., în infecții endovasculare: endocarditele subacute, anevrisme infectate, tromboflebite. Ocazional, bacteremia continuă să apară în asociere cu surse nonvasculare, în special la pacienții imunosupresați.

Apariția unor metastaze septice amplifică procesul bacteremic amorsat de focarul infecțios inițial.

Pseudobacteriemie

Pseudobacteremia apare atunci când tulpinile izolate din sânge provin din afara sistemului sangvin al pacientului. Contaminarea probelor de sânge poate să aibă loc la toate etapele: atât la colectarea probei de sânge, cât și la procesarea în laborator și poate proveni dintr-o varietate de surse. Au

fost descrise focare de pseudobacteremie cu microorganisme din mediu, care implică soluții și echipamente contaminate în spitale, laboratoare și eșantionare incorectă a sângelui.

Sepsis

Noțiunea SIRS (eng. Systemic Inflammatory Response Syndrome) – sindromul de răspuns sistemic inflamator – descrie răspunsul timpuriu al organismului la leziuni care pot fi de origine infecțioasă sau neinfecțioasă.

SIRS se atestă când sunt prezente, cel puțin, două criterii dintre următoarele:

- temperatura corpului: $<36^{\circ}\text{C}$ sau $>38^{\circ}\text{C}$;
- ritmul cardiac: >90 bătăi pe minut;
- hiperventilație: frecvență respiratorie >20 respirații pe minut;
- numărul de leucocite $>12,0 \times 10^9/\text{L}$, $<4,0 \times 10^9/\text{L}$ sau $>10\%$ forme imature.

Sepsisul (anterior septicemie) este prezența SIRS cauzat de infecție. Sepsisul este definit ca infecție confirmată sau suspectă (pe criterii clinice, bacteriologice și imagistice), care declanșează un răspuns inflamator sistemic particular.

Aproximativ 20% dintre cazurile de sepsis sunt asociate cu bacteriemia, restul fiind determinate de alte procese infecțioase din organism. Incidența sepsisului continuă să crească cu o rată a mortalității de 35-65%. Tratatamentul antimicrobian empiric, precoce și adecvat, este asociat cu scăderea ratelor mortalității și rezultate clinice favorabile. În sepsisul sever, fiecare oră de întârziere în tratamentul cu antimicrobiene determină o mortalitate înaltă. La persoanele imunocompromise, sepsisul este definit ca SIRS cu unul sau mai multe dintre caracteristicile clinice prezente, combinate cu o etiologie infecțioasă.

Sepsis sever

Sepsisul sever este definit ca sepsis, asociat cu disfuncții organice, hipoperfuzie sau hipotensiune.

Disfuncții de organ:

- Hipoxemie arterială: $\text{PaO}_2 / \text{Fi O}_2 < 300$
- Oligurie acută: debit urinar $< 0,5 \text{ ml/kg/h}$ pentru cel puțin 2 ore
- Creatinină: $>177 \mu\text{moli/L}$
- Anomalii ale coagulării: $\text{INR} > 1,5$, $\text{aPTT} > 60 \text{ s}$
- Trombocitopenie: $\text{TR} < 100 \times 10^9/\text{L}$
- Hiperbilirubinemie: $>34 \mu\text{moli/L}$

Șoc septic

Șocul septic este definit ca persistența hipotensiunii arteriale, induse de sepsis, în pofida resuscitării volemice adecvate. Simptomele clinice sunt, de obicei, atribuite produselor bacteriene toxice și/sau răspunsului gazdei la acestea. Șocul septic este mai frecvent indus de septicemia cu floră Gram-negativă, dar poate fi asociat și cu microorganisme Gram- pozitive, în bacteriemia cu pneumococ, stafilococ, streptococ grup A, după Lancefield.

Terapia antimicrobiană intravenoasă este recomandată în prima oră de la diagnosticarea șocului septic și a sepsisului sever. La fel, sunt esențiale și alte măsuri de susținere, precum terapia cu lichide, ventilația mecanică și menținerea tensiunii.

Sepsis neonatal

Sepsisul neonatal este definit ca SIRS, diagnosticat clinic, cauzat de infecția care apare în primele patru săptămâni de viață. Incidența sepsisului neonatal crește odată cu scăderea greutății la naștere sau a prematurității. Deosebim două tipuri:

- **Sepsis neonatal cu debut precoce**

Sepsisul neonatal cu debut precoce apare în primele 72 de ore de viață și este, de obicei, cauzat de infecția retrogradă a tractului genital matern sau, mai rar, transplacentar.

- **Sepsisul neonatal cu debut tardiv**

Survine după primele 72 de ore de viață, iar microorganismele pot fi achiziționate din mediul extern (de ex., spital sau comunitate). Infecția este adesea transmisă prin intermediul persoanelor implicate în îngrijire. Microorganismele colonizează inițial zonele superficiale și tractul respirator superior și progresează provocând sepsis, pneumonie sau meningită.

Microorganismele, izolate din zonele superficiale, aspiratul gastric și lichidul amniotic indică colonizare și pot include agenți patogeni responsabili de sepsisul neonatal. Cu toate acestea, ele nu stabilesc prezența unei infecții sistemice active. Izolarea microorganismelor din sânge rămâne standardul de aur pentru diagnosticarea infecțiilor bacteriene sistemice la nou-născuți. Microorganismele asociate cu sepsisul neonatal sunt:

- Streptococi beta-hemolitici, în special streptococi grup B, după Lancefield
- *Enterobacteriaceae*

- *Staphylococcus aureus*
- *Stafilococi coagulazo negativi*
- *Listeria monocytogenes*
- *Enterococcus* spp.
- *Pseudomonas* spp.
- Fungi

A fost raportat și sepsis neonatal cauzat de bacterii anaerobe, majoritatea cazurilor fiind provocate de speciile din genul *Bacteroides*, *Clostridium* sau *Peptostreptococcus*.

Conform recomandărilor NICE privind utilizarea preparatelor antimicrobiene în infecția neonatală cu debut precoce, rezultatele negative ale hemoculturii, la 36 de ore după prelevare, pot fi utilizate ca dovadă pentru întreruperea tratamentului cu antimicrobiene. Incubarea hemoculturilor timp de 36 de ore este suficientă pentru a exclude sepsisul la nou-născuții asimptomatici, totuși hemoculturile prelevate de la nou-născuții <72 de ore pot necesita o incubare mai îndelungată.

Infecțiile fluxului sangvin la pacienții imunocompetenți, dobândite în comunitate

Bacteriemia și fungemia dobândite apar deseori la indivizii anterior sănătoși, de obicei, în asociere cu infecțiile de focar, cum ar fi pneumonia pneumococică. De asemenea, bacteriile pot pătrunde în sânge din flora comensală proprie a pacientului sau dintr-un focar nedetectat și pot provoca infecții metastatice (așa cum se întâmplă uneori în cazul osteomielitei, provocate de *Staphylococcus aureus*). Alte boli bacteriemice generalizate includ febra enterică (de exemplu, tifoidă) și bruceloza.

Microorganismele cel mai frecvent izolate la adulți cu bacteriemie dobândită sunt:

- *Escherichia coli*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Staphylococcus aureus*
- Alte *Enterobacteriaceae*
- *Neisseria meningitidis*
- Streptococi beta-hemolitici

Infecțiile fluxului sangvin la pacienții imunocompetenți, achiziționate în spital

Numărul sporit de proceduri invazive, cum ar fi cateterizarea, terapia imunosupresivă, terapia cu antimicrobiene și măsurile de suport vital, au dus la creșterea cazurilor de bacteriemii, candidemii și a altor fungemii dobândite în spital. Aceste proceduri pot vehicula microorganisme în sânge sau pot diminua sistemul de apărare al gazdei. Microorganismele cel mai frecvent izolate de la adulții cu infecție de flux sangvin dobândită vor depinde de grupul de pacienți (vârstă, comorbidități etc.) și spectrul se poate schimba odată cu durata aflării în spital:

- Stafilococi coagulazo negativi
- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- Alte *Enterobacteriaceae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterococcus*
- Microorganisme anaerobe
- *Streptococcus pneumoniae*
- Fungi

Infecții asociate asistenței medicale (IAAM)

IAAM sunt infecții care apar ca urmare a intervențiilor de îngrijire sau a tratamentelor ambulatorii, la cabinetul medical, clinică sau spital. La pacienții care beneficiază în permanență de îngrijire medicală este adesea dificil să se determine cu exactitate dacă infecția a fost contractată în comunitate sau în spital.

Bacteriemie anaerobă

Studiile în domeniu relatează că microorganismele anaerobe constituie 1-17% din hemoculturile pozitive. Microorganismele anaerobe prezintă, prin urmare, o cauză importantă a bacteriemiei și este necesar să fie testate de rutină. Microorganismele cel mai frecvent asociate cu bacteremia anaerobă sunt:

- Bacilii Gram-negativi, inclusiv specii din genul *Bacteroides* și *Fusobacterium*
- *Peptostreptococcus*
- *Clostridium* spp.

Infecțiile fluxului sanguin la copii

În ultimii ani, spectrul agenților etiologici ai bacteriemiei la copii s-a schimbat. Infecțiile cu *Haemophilus influenzae* tip b au scăzut dramatic după introducerea imunizării cu Hib, iar rata infecțiilor asociate asistenței medicale sistemice au crescut odată cu sporirea posibilităților medicale, raportării, etc. Microorganismele cel mai frecvent izolate la copiii cu bacteriemie dobândită în comunitate sunt:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Neisseria meningitidis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*

Microorganismele implicate în infecțiile asociate asistenței medicale la copii sunt similare cu cele implicate la adulți.

Bacteriemia ocultă poate apărea la copiii cu puține sau fără simptome asociate, în mod normal, cu infecția fluxului sanguin. Pirexia, care poate fi singurul indicator, nu este unul specific. *S.pneumoniae* predomină, dar a fost descrisă și infecție ocultă cu *H. influenzae*, specii de *Salmonella* și *N. meningitidis*.

Bacteriemia asociată cateterizării

Este foarte dificil a demonstra că drept cauză a bacteriemiei sau a fungemiei este cateterizarea intravenoasă. Deseori nu există dovezi de infecție la locul de inserție a cateterului, iar microorganismele implicate sunt frecvent parte a florei normale a pielii și sunt contaminanți obișnuiți ai hemoculturilor. Diagnosticul bacteriemiei asociate cateterizării este, de obicei, bazat pe:

- izolarea aceluiași microorganism din sânge și din locul purulent de inserție a cateterului sau a vârfului cateterului;
- sepsisul clinic, care nu răspunde la terapia antimicrobiană și se rezolvă prin înlăturarea cateterului.

Bacteriemia la femeile însărcinate

Listeria monocytogenes poate provoca o infecție severă la femeile gravide. Sepsisul cauzat de *L. monocytogenes* prezintă o afecțiune febrilă acută care poate afecta fătul. Acest lucru poate duce la o infecție sistemică (granulomatoză septică infantilă), la moartea fătului sau la o meningită neonatală. Pentru a depista această specie de microorganisme trebuie examinate produsele de concepție, placenta și tampoanele neonatale. Investigarea bacteriologică de rutină a secretului vaginal pentru *L. monocytogenes* nu este, de regulă, efectuată, dar poate fi utilă în cazurile suspecte.

Afectarea septică poate duce la o morbiditate maternă severă și poate fi fatală. Perforarea uterină, prezența resturilor necrotice și a produselor placentare reținute pot duce la infecții; majoritatea infecțiilor sunt polimicrobiene și implică anaerobi. Sepsisul clostridian care complică avortul este potențial letal. La unele femei, speciile de *Clostridium* fac parte din flora vaginală normală.

Endocardita infecțioasă

Endocardita infecțioasă (EI) este o infecție microbiană a suprafeței endocardice, care determină apariția vegetațiilor la nivelul endocardului, în special la nivelul valvelor, cu perturbarea funcționalității normale a acestora. Se întâmplă, de obicei, la locul unei leziuni cardiace predispozante sau al unui defect congenital, în care există flux sanguin turbulent, favorizând leziunea endocardică și aderarea trombocitelor. Un cheag de fibrină este depus pe suprafața endocardică deteriorată și este colonizat cu microorganism, care au pătruns în fluxul sanguin, formând astfel vegetații infectate.

Viabilitatea bacteriilor poate fi prezentă atât în interiorul, cât și pe suprafața vegetației, ceea ce face dificil tratamentul antimicrobian. Din punct de vedere istoric, EI a fost calificată ca fiind „acută” sau „subacută”, referitor la cursul obișnuit al bolii netratate. Fiind propuse în 1994, criteriile Duke sunt și acum utilizate pentru diagnosticare. Este mai simplu să descriem boala în raport cu microorganismul infectant sau cu anatomia de bază.

Rezultatele hemoculturii sunt esențiale pentru diagnosticul și managementul pacienților cu endocardită infecțioasă. Prin urmare, este imperativ să se utilizeze tehnici optime de cultivare, ceea ce va permite izolarea agentului etiologic în peste 90% dintre cazurile de endocardită infecțioasă. Prima problemă în evaluarea unui pacient cu suspecție de endocardită infecțioasă este a determina când se prelevează hemocultura.

Endocardita infecțioasă acută

În cazurile de endocardită infecțioasă suspectă sau certă, care poate fi cauzată de agenți patogeni extrem de virulenți, cum ar fi *Staphylococcus aureus*, hemoculturile trebuie să fie recoltate pentru a evita eșecul terapeutic.

Endocardita infecțioasă subacută

În cazul prezenței simptomelor care sugerează o EI subacută, nu este primordială raportarea rezultatului preliminar, ci stabilirea diagnosticului microbiologic definitiv (identificarea agentului cauzal și rezultatele testării antimicrobiene).

Endocardita nativă (afectarea valvelor)

Boala cardiacă reumatică cronică a fost principalul factor predispozant în EI, dar este înlocuită acum de alte afecțiuni, cum ar fi: boala cardiacă congenitală, prolapsul valvei mitrale și boala valvulară degenerativă la vârstnici. Endocardita infecțioasă se poate dezvolta la valvele anatomic normale și funcționale, ca urmare a anumitor bacteriemii.

Microorganismele cel mai frecvent izolate sunt:

- Streptococii orali
- *Staphylococcus* spp. (aproximativ 80% dintre aceștia sunt *S. aureus*)
- *Enterococcus* spp.
- *Streptococcus bovis* (*S. bovis* biotip 1/*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*).

Au fost descrise multe alte microorganisme, inclusiv unele care sunt pretențioase și care rareori cauzează infecții la om, altele decât endocardita (de exemplu, grupul HACEK: *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikarella* și *Kingella*). Speciile din genul *Bartonella* devin din ce în ce mai frecvent cauze importante ale endocarditei, în special la pacienții cu HIV.

Infecția fluxului sangvin la pacienții imunocompromiși

Pacienții imunocompromiși sunt cei cu anomalii ereditare, dobândite sau cele induse de tratamente imunosupresoare. Prin urmare defectele de fagocite, complement, formarea de anticorpi și imunitatea mediată celular sunt deseori asociate cu o anumită dereglare sau boală, cum ar fi malformațiile, infecția HIV, transplant de organe, terapie imunosupresoare și cu hormoni steroizi. Riscul de infecție este cel mai mare la pacienții cu neutropenie, la care bacteriile Gram-negative cauzează sepsis sever, asociat cu o rată ridicată a mortalității.

La pacienții imunocompromiși, există o incidență sporită a infecției cauzate de microorganisme care fac parte din flora indigenă. Acestea ar fi, de obicei, considerate contaminanți pentru gazda imunocompetentă (de exemplu, stafilococii coagulazo-negativi, enterococii și streptococii grup Viridans).

Pacienții hipospleni sau aspleni sunt sensibili la septicemie fulminantă, cauzată de o varietate de microorganisme, în special de bacterii, precum *S. pneumoniae*, *H. influenzae* și *N. meningitidis*, dar și de microorganisme mai puțin obișnuite, cum ar fi *Capnocytophaga* spp. Spectrul de microorganisme detectate, reflectă perioadele prelungite ale neutropeniei, durata spitalizării și o utilizare sporită a cateterelor venoase centrale și a antimicrobielenor cu spectru larg. Infecțiile

polimicrobiene sunt mai frecvent atestate la acest grup de pacienți, iar numărul de infecții oportuniste, provocate de speciile Gram-pozitive, în special cele cauzate de fungi și *Mycobacterium* spp., de asemenea a crescut.

Pe lângă microorganismele menționate anterior, asociate cu infecția fluxului sanguin la pacienții imunocompromiși se mai izolează și alți agenți microbieni:

- bacterii Gram-negative
- *Listeria monocytogenes*
- *Corynebacterium* spp.
- *Candida* spp.

Semnificația fungilor saprobioți în IFS

Aspergillus spp. reprezintă cea mai frecventă cauză a infecțiilor fungice invazive, dar este rar izolat din sânge. Pe de altă parte, *Fusarium* spp. este izolat în 60- 70% din hemoculturile pacienților cu fusarioză diseminată. Printre fungii emergenți, implicați tot mai des în infecții invazive, inclusiv în fungemii, se numără: *Scedosporium* spp., *Alternaria* spp. și *Paecilomyces* spp.

Cu excepția fungemiilor asociate cu prezența cateterelor venoase centrale, determinarea semnificației clinice a hemoculturilor pozitive cu fungi, chiar și la pacienții cu hemopatii maligne, reprezintă o provocare. Cele mai frecvente cauze de fungemii adevărate sunt determinate de *Scedosporium* spp., iar prezența leucemiei sau a transplantului medular reprezintă un factor de risc major.

Semnificația hemoculturilor pozitive cu *Aspergillus* spp. rămâne incertă. În literatura de specialitate sunt atestate puține cazuri, documentate din punct de vedere clinic, histologic și microbiologic, de evidențiere a aspergilozei invazive cu hemocultură pozitivă certă. O singură hemocultură pozitivă, în sistemul lizei cu centrifugare, reprezintă, în mod obișnuit, un indicator al pseudoaspergilemiei, iar în acest caz trebuie găsite argumentele clinice și radiologice pentru stabilirea semnificației clinice a izolatului. Totuși se consideră că hemoculturile pozitive pentru *Aspergillus*, cu reală semnificație clinică, sunt foarte rare.

Candida spp. (în particular *Candida albicans*) este frecvent izolată în hemoculturi, reprezentând până la 10% dintre infecțiile sistemice asociate asistenței medicale; cu toate acestea aproximativ 50% din hemoculturi rămân negative la pacienții cu candidemie. În cazul hemoculturilor pozitive cu *Candida* spp., trebuie depistată posibila sursă a infecției și cateterele intravasculare înlocuite.

Majoritatea studiilor științifice subliniază importanța indicării hemoculturii de către clinicieni, pacienților ce prezintă oricare dintre următoarele semne:

- septicemie, șoc septic;
- infecții care se asociază cu bacteriemie (pneumonie, meningită, pielonefrite acute, infecții puerperale, angiocolicistite, artrite septice, infecții ale arsurilor și plăgilor);
- nou-născuți și copii cu semne clinice sugestive, chiar minime de infecție de flux sanguin;
- febră sau istoric de febră și neutropenie suspectată sau dovedită;
- febră și stare imunocompromisă;
- stări febrile după intervenții chirurgicale pe intestin, focare infecțioase cronice, cateterism venos prelungit, dializă peritoneală;
- febră la persoanele care au călătorit recent peste hotarele țării;
- endocardită infecțioasă suspectă;
- sindrom sugestiv pentru IFS cu germeni specifici (febră enterică – *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, bruceloză, leptospiroză);
- în cazuri particulare (sarcină; afecțiuni cardiace, diabet asociat cu insuficiență renală, insuficiență hepatică; leucocitoză; granulocitopenie);
- sindroame febrile cu etiologie neelucidată.

5.1 TIPUL PROBEI

Sânge

5.2 DEZINFECTAREA PIELII ȘI PREVENIREA CONTAMINĂRII HEMOCULTURII

Majoritatea probelor de sânge pentru hemocultură sunt recoltate prin venipuncție. Pentru a reduce la minim riscul de contaminare a probei cu flora comensală a pielii, locul venipuncției necesită dezinfectare. O serie de dezinfectanți au fost folosiți clinic în ultimii 50 de ani, inclusiv prelucrarea cu alcool (70% izopropil), tinctura de iod, povidonă-iod, iodofori, peroxid de clor și gluconat de clorhexidină. Majoritatea studiilor analizate recomandă următorii dezinfectanți:

- tinctura de iod, peroxid de clorură și gluconat de clorhexidină sunt superioare preparatelor de povidonă-iod;
- tinctura de iod și gluconatul de clorhexidină sunt echivalente, gluconat de clorhexidină în alcool izopropilic 70%.

Preparatele care conțin iod necesită suficient timp pentru dezinfectarea suprafețelor (30 de secunde pentru tinctura de iod și 1.5–2 minute pentru iodofori). Gluconatul de clorhexidină necesită aceeași perioadă de timp ca tinctura de iod, dar nu este asociat cu reacții alergice și nu trebuie curățat de pe piele după terminarea venipuncției. Dezavantajul principal al gluconatului de clorhexidină îl constituie faptul că nu poate fi aplicat pentru dezinfectarea pielii sugarilor cu vârstă mai mică de două luni; cu toate acestea, este dezinfectantul de piele recomandat copiilor mai mari și adulților.

Gluconatul de clorhexidină, ca antiseptic al pielii, este permis pentru aplicare pacienților pediatrici, cu vârsta de două luni și peste.

Pentru pacienții cu vârsta mai mică de două luni, alcoolul izopropilic 70% constituie o alternativă acceptabilă pentru dezinfectarea pielii.

Modul de recoltare a probelor de sânge pentru hemocultură

Pe parcursul procedurii, trebuie respectată o tehnică aseptică strictă (vezi anexa 1).

Sângele pentru hemocultură trebuie colectat din vene, nu din artere.

Probele de sânge obținute prin cateterele intravenoase sunt asociate cu rate de contaminare mai mari decât probele de sânge obținute prin venipuncție. Deoarece evaluarea și interpretarea hemoculturilor pozitive din catetere intravenoase și dispozitive similare este dificilă, este necesară recoltarea în paralel a unei probe suplimentare, obținute prin venipuncție.

După identificarea locului de venipuncție, septul de cauciuc al flaconului de hemocultură trebuie dezinfectat cu 70% alcool izopropilic și lăsat să se usuce.

Cerințe de recoltare a probelor de sânge pentru hemocultură:

1. Zona de puncție se decontaminează larg, concentric, cu 70% alcool izopropilic, permițându-i să se usuce.
2. Se aplică dezinfectantul principal (recomandată fiind clorhexidina în 70% alcool izopropilic), apoi i se permite să acționeze în limitele timpului recomandat.
3. Persoana care recoltează sânge nu trebuie să palpeze vena după dezinfectarea pielii decât dacă poartă mănuși sterile.
4. Se recomandă ca sângele să fie recoltat într-o seringă sterilă și apoi să fie transferat în flaconul de hemocultură. Nu se admite recoltarea sângelui direct în flacoanele de hemocultură, din cauza riscului de reflux al bulionului în vene. Este posibilă colectarea directă în flaconul de hemocultură doar cu ajutorul dispozitivelor speciale de colectare, disponibile de la unii producători; acestea trebuie utilizate în conformitate cu recomandările producătorilor.
5. Flacoanele de hemocultură trebuie menținute în poziție verticală atunci când sunt utilizate.

Notă:

Utilizarea dezinfectanților pe bază de iod nu este recomandată pentru dezinfectarea septului din cauciuc pentru unele sisteme comerciale, deoarece acest lucru poate afecta integritatea septului.

Notă:

Dacă este necesară și efectuarea altor teste, flacoanele pentru hemocultură trebuie inoculate primele, pentru a evita contaminarea. Se recomandă a efectua separat prelevarea sângelui pentru hemocultură.

Indiferent de metoda aplicată pentru recoltarea sângelui, laboratoarele trebuie să dispună de proceduri operaționale standard, în scopul minimizării ratelor de contaminare (interval acceptabil $\leq 3\%$).

5.3 TIMPUL OPTIM DE PRELEVARE A SÂNGELUI PENTRU HEMOCULTURĂ

Prelevările trebuie făcute înaintea tratamentului antibacterian, în cazurile când este posibil. Sângele se recoltează cât mai curând posibil, după debutul simptomelor clinice. Cu toate că sângele poate fi prelevat în orice moment, totuși timpul optim pentru recoltare este în timpul crizei febrile sau cât mai curând posibil după criza febrilă, cu excepția endocarditei, unde limita de timp nu este critică.

5.4 CRITERII DE RESPINGERE A PROBELOR

Laboratorul își rezervă dreptul de a refuza speciimenele recoltate și etichetate impropriu. În general, hemoculturile impropriu recoltate sunt păstrate până la momentul în care instituția sau persoana care a recoltat proba sunt anunțate.

Probele de hemocultură, care întrunesc criteriile prezentate mai jos, trebuie respinse, recomandându-se repetarea recoltării.

Criterii de respingere:

- flacoane neetichetate care nu pot fi identificate;
- flacoane sparte, deteriorate sau cu scurgeri;
- flacoane cu cheaguri și care conțin anticoagulante, altele decât SPS (Sodium polyanethole sulfonate).

Hemocultura reprezintă o probă de sânge, colectată prin venepuncție, dintr-un singur loc, inoculată în unul sau în mai multe flacoane.

Un set de hemocultură este definit ca un flacon aerob și unul anaerob. Pentru sugari și nou-născuți poate fi solicitat un singur flacon aerob.

6.1 CANTITATE

Adulți

La un adult, volumul de sânge recomandat pentru un set de hemocultură este de 20 – 30 ml. Deoarece fiecare set conține un flacon aerob și unul anaerob, fiecare flacon trebuie inoculat cu aproximativ 10 ml sânge.

În scopul de a optimiza recuperarea agentului patogen și a majora rata de izolare, este recomandat să se folosească două sau trei seturi (două flacoane per set) pentru fiecare episod septic (40–60 ml sânge; 10 ml per flacon). Pentru fiecare mililitru suplimentar de sânge cultivat, izolarea microorganismelor recuperate din sânge de la adulți crește în proporție directă până la 30 ml. Intervalul dintre două probe nu este un factor critic, deoarece randamentul de diagnosticare rămâne același, chiar și atunci când cele două probe sunt prelevate în același timp (interval nul).

Notă:

Pot fi indicate mai mult de 2 flacoane per set.

Copii și nou-născuți

Investigarea sângelui pentru hemocultură la copii constituie o provocare. Este dificilă determinarea volumului optim necesar din următoarele motive:

- concentrația bacteriilor din sânge la copiii cu bacteriemie este, de obicei, mai mare decât la adulți, prin urmare, cantitatea de sânge necesară de la un nou-născut sau sugar poate fi mai mică cu câțiva mililitri;
- concentrația de bacterii din fluxul sanguin scade odată cu vârsta și, prin urmare, volumul de sânge necesar pentru hemocultură crește;

- o abordare rațională este ajustarea volumului de sânge recoltat în funcție de greutatea copilului (tabelul 1).

Volumul de sânge se recoltează în funcție de greutatea pacientului și se utilizează deseori doar un flacon aerob, iar cel anaerob numai în cazul în care se suspectează infecția anaerobă.

Pentru testarea hemoculturii la copii sunt disponibile flacoane de hemocultură cu formule, special destinate volumelor mici de sânge (pentru copii cu vârsta mai mică de 2 ani). Acestea sunt concepute special pentru a menține raportul sânge-bulion (1:5 până la 1:10) pentru volume mici de sânge, în scopul îmbunătățirii recuperării microbiene.

În prezența unui nivel ridicat de bacteriemie, cantitatea de sânge recoltată pentru sugari și nou-născuți este de 1-2 ml sânge și pentru copii – 2-5 ml (nu mai mult de 1% din volumul total de sânge).

Un nivel scăzut de bacteriemie ($<4 \times 10^3$ UFC/ml) la nou-născuți și la copii apare cu microorganisme clinic semnificative și studiile în domeniu sugerează că pentru detectarea fiabilă a bacteriemiei la nivel scăzut, trebuie să se cultive 4-5% din volumul total de sânge al pacientului (tabelul 1).

Tabelul 1. Volumul de sânge recomandat pentru hemocultură la nou-născuți și copii

Greutate pacient, kg	Volum total de sânge al pacientului (ml)	Volum recomandat pentru hemocultură		Volum total pentru hemocultură	% din volumul total de sânge al pacientului
		Set 1	Set 2		
≤1	50-99	2	-	2	4
1,1-2	100-200	2	2	4	4
2,1-12,7	>200	4	2	6	3
12,8-36,3	>800	10	10	20	2,5
>36,3	>2200	20-30	20-30	40-60	1,8-2,7

Adoptat de Kellogg et al. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:2181-2185

Notă:

Nu se depășește volumul maxim recomandat de producător pentru fiecare flacon.

Dacă volumul de sânge este insuficient pentru două flacoane, mai întâi se inoculează flaconul aerob și apoi restul volumului de sânge se inoculează într-un flacon anaerob.

Inocularea flacoanelor de hemocultură în acest mod este importantă, deoarece cele mai multe bacteriemii sunt cauzate de bacterii aerobe și facultativ aerobe, care vor fi recuperate mai bine din flacoanele aerobe. În plus, fungii patogeni sunt recuperați aproape exclusiv din flacoanele aerobe, la fel ca aerobii stricți, precum *Pseudomonas* și *Stenotrophomonas*. Laboratoarele care optează doar pentru flacoane aerobe, trebuie să aplice două flacoane aerobe pentru fiecare set de hemocultură, pentru a asigura inocularea volumelor adecvate de sânge.

6.2 NUMĂRUL DE PROBE

Numărul și frecvența hemoculturilor colectate depind de starea clinică a pacientului.

Se colectează două seturi consecutive, din două locuri separate de venepuncție, cât mai curând posibil după debutul simptomelor clinice. Sângele poate fi prelevat în orice moment, dar preferabil este în perioada episodului febril sau imediat după acesta, excepție făcând endocardita, unde timpul nu este critic.

La nou-născuți se colectează sânge pentru un singur flacon aerob sau pentru un flacon special destinat volumelor mici.

Pentru copii se folosesc 1-2 flacoane aerobe, se recurge la unul aerob și unul anaerob, atunci când este relevant din punct de vedere clinic.

În situații urgente, 2 sau mai multe seturi de hemocultură pot fi obținute secvențial, într-un interval scurt de timp (minute), după care terapia empirică poate fi inițiată. În situații mai puțin urgente, obținerea seturilor de cultură de sânge poate avea loc pe parcursul mai multor ore sau și mai mult.

În cazurile de sepsis sever, se recoltează două seturi în prima oră, preferabil înainte de inițierea tratamentului antimicrobian, cu condiția să nu se întârzie în mod semnificativ administrarea preparatelor antimicrobiene.

De la pacientul suspectat de prezența endocarditei infecțioase se recoltează cel puțin trei seturi, într-o perioadă de 24 ore. Seturile de hemocultură se obțin la un interval de 30 min. – 1 oră. Acest fapt poate ajuta la confirmarea unei bacteriemii continue, care poate oferi o valoare clinică suplimentară, mai ales dacă ecocardiografia este negativă sau echivocă.

Deoarece bacteriile și fungii nu sunt prezenți în mod constant în fluxul sanguin, sensibilitatea unui singur set de hemocultură este limitată.

Într-un studiu recent a fost investigată sensibilitatea cumulată a culturilor de sânge, obținute secvențial pe o perioadă de 24 de ore, utilizând sisteme automatizate. Rezultatele denotă că randamentul cumulată de agenți patogeni din trei seturi de hemocultură (2 flacoane per set), cu un volum de sânge de 20 ml în fiecare set (10 ml per flacon), a fost de 73,1% pentru primul set, 89,7% – primele două seturi și 98,3% pentru primele trei seturi. Cu toate acestea, pentru a realiza o rată de detectare >99% dintre infecțiile fluxului sangvin, pot fi necesare câte patru seturi de hemocultură.

Un singur flacon sau un set de flacoane (aerob și anaerob) nu este suficient pentru testarea hemoculturii de la pacienții adulți, deoarece această practică implică recoltarea unui volum de sânge insuficient și respectiv pierderea unui număr substanțial de bacteriemii și dificultăți în diferențierea bacteriemiei adevărate de contaminare. Un contaminant va fi, de regulă, prezent într-un singur flacon dintr-un set de hemocultură, spre deosebire de o adevărată infecție a fluxului sangvin, în care mai multe flacoane/seturi de hemocultură vor fi pozitive.

Dacă s-au luat 2-3 seturi de hemocultură și acestea sunt negative după 24-48 de ore de incubare, iar pacientul este încă potențial septic, în scopul îmbunătățirii managementului pacientului, se recomandă colectarea a încă 2-3 seturi suplimentare de hemocultură.

Ca și la pacienții adulți, la cei pediatrici se colectează două-trei hemoculturi în 24 de ore. Deoarece bacteriile anaerobe sunt rareori recuperate de la pacienții pediatrici, studiile recomandă utilizarea doar a flacoanelor aerobe. Flacoanele anaerobe pot fi luate în considerare pentru nou-născuții de la mame care au avut ruperea membranelor în timpul nașterii sau corioamniotită maternă; infecție cronică orală sau sinusală; celulită (în special perianală și sacrală); semne și simptome abdominale; plăgi mușcate; flebită septică; pacienți neutropenici cărora li se administrează steroizi.

6.3 INOCULAREA FLACOANELOR

La utilizarea unui set de colectare a sângelui cu fluturaș, flaconul aerob trebuie inoculat primul, pentru a preveni transferul de aer din dispozitiv în cel anaerob. Iar în cazul colectării cu seringă, primul se inoculează flaconul anaerob, pentru a evita pătrunderea aerului.

Standard preanalitic

Flacoanele inoculate trebuie să fie incubate cât mai curând posibil, timp ideal fiind de maxim 4 ore (tabelul 2).

Tabelul 2. Standard preanalitic

Stadiul de investigare:	Standard:
Preanalitic	Timp ideal
De la colectare pâna la incubare	≤4 ore

În cazul în care probele nu pot fi transportate în decurs de 4 ore, ghidurile Societății Europene de Microbiologie Clinică și Boli Infecțioase (ESCMID) recomandă ca flacoanele de hemocultură, destinate testării cu utilizarea sistemelor automatizate, să fie păstrate la temperatura camerei, deoarece preincubarea în termostate poate duce la rezultate fals negative sau la creșterea timpului de detecție a rezultatului pozitiv. Însă flacoanele destinate testării prin metoda manuală trebuie incubate cât mai curând posibil.

Ghidurile internaționale recomandă laboratoarelor să stabilească o procedură privind gestionarea corectă a transportării probelor, în scopul asigurării integrității acestora și a unei durate de timp adecvat.

Formularul de însoțire a hemoculturilor trebuie să conțină:

- numele și prenumele;
- vârsta;
- diagnosticul pacientului;
- locul de unde a fost prelevată proba de sânge;
- tratamentul administrat;
- data și ora recoltării;
- volumul de sânge colectat.

Notă:

Probele nu trebuie refrigerate!

La utilizarea metodei manuale de testare a hemoculturii, în cazul suspjecției bacteriilor strict aerobe (ex. *Pseudomonas*, *Neisseria*) sau a levurilor, flaconul

trebuie ventilat imediat ce este primit în laborator, prin străpungerea septului flaconului, dezinfectat anterior, cu un ac steril. Acul poate fi îndepărtat odată ce presiunea din sticlă atinge nivelul presiunii atmosferice.

Flacoanele de hemocultură, destinate pentru utilizarea metodei automatizate, conțin CO₂, O₂ și N₂, ceea ce are un efect stimulant asupra creșterii și nu necesită ventilare.

Standardele internaționale recomandă verificarea prezenței semnelor de creștere, înainte de încărcare/incubare a flacoanelor transportate în laborator mai târziu de timpul recomandat. În cazul prezenței semnelor vizibile de creștere, se recomandă efectuarea unui frotiu Gram și a subculturii.

8 // METODOLOGIA DE PROCESARE A PROBELOR DE HEMOCULTURĂ

Pentru managementul eficient al pacientului cu infecție de flux sanguin este imperios necesară comunicarea către clinician a rezultatelor fiecărei etape de investigare a hemoculturii.

Din momentul detectării/semnalării pozitive a flacoanelor de hemocultură, rezultatele identificării și ale determinării sensibilității la antimicrobiene ale izolatelor trebuie raportate în limita timpului recomandat (tabelul 3).

Tabelul 3. Standard analitic

Etapa de investigare	Criteriu	Standard
Analitică		
Pozitivare la microscopie, identificarea și testarea sensibilității la antimicrobiene	Test efectuat	Timp recomandat pentru raportare
	Frotiu Gram	≤2 ore
	Testare Rapidă Antigen	≤2 ore
	Metode moleculare	Aceeași zi
	Identificare Directă/Automată	≤24 ore
	Identificare, metoda clasică	24-48 ore
	Testarea sensibilității (Directă/Automată)	≤24 ore
	Testarea sensibilității (metoda clasică)	24-48 ore

8.1 CONDIȚII DE INCUBARE

Timpul de incubare al flacoanelor de hemocultură diferă în funcție de metoda utilizată (manuală sau automatizată) și de microorganismul suspectat (vezi anexa 2). În general, flacoanele de hemocultură se incubează la 35-37°C, timp de 5-7 zile.

În cazul utilizării **metodelor manuale convenționale**, se recomandă incubarea hemoculturilor timp de 7 zile. Perioada de incubare poate fi prelungită mai mult de 7 zile, pentru microorganismele pretențioase nutritiv (*Bartonella*, *Legionella*, *Brucella*, *Nocardia*), fungii dimorfi și în cazul endocarditei sau dacă pacientul a fost supus unui tratament antimicrobian.

Perioada standard de incubare pentru hemoculturile de rutină, efectuate în **sisteme automatizate** este de 5 zile, inclusiv pentru *Brucella* spp., *Haemophilus* spp., *Actinobacillus* spp., *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens*, *Kingella* spp. și unii streptococi (*Abiotrophia* și *Granulicatella* spp.).

Datele unor studii realizate recent sugerează că perioada de patru sau chiar de trei zile de incubare, pentru unele sisteme automatizate, poate fi suficientă pentru a recupera 95-97% dintre bacteriile și levurile semnificative din punct de vedere clinic.

Agitația flacoanelor de hemocultură

Procedurile standardizate privind testarea hemoculturilor subliniază importanța agitației flacoanelor aerobe, în special în primele 24 de ore de incubare. Această tehnică contribuie la creșterea semnificativă a ratei de izolare și la reducerea timpului de detectare a microorganismelor, din cauza oxigenării crescute a mediului.

Sistemele automatizate permit agitarea continuă a flacoanelor, fără impact negativ asupra creșterii bacteriilor din flacoanele anaerobe.

8.2 METODE DE TESTARE A HEMOCULTURILOR (MANUAL ȘI AUTOMATIZAT)

Hemoculturile pot fi procesate în laborator fie manual, fie prin metode automatizate. Tehnic vorbind, metodele manuale se vor referi la metode care nu utilizează instrumente pentru a monitoriza creșterea microorganismelor. Hemoculturile manuale pot fi împărțite suplimentar în culturi pe bază de

bullion, monitorizate vizual („convenționale”) și culturi folosind mediile bifazice. Metodele automatizate folosesc instrumente pentru a detecta creșterea microbiană în medii cu bulion, prin monitorizarea produselor secundare ale metabolismului bacterian sau fungic.

8.2.1 Testarea manuală

Mediile utilizate pentru testarea manuală sunt: mediile convenționale, mediile bifazice și liză-centrifugare.

Mediile convenționale pentru testarea hemoculturii constau, de obicei, dintr-o pereche de flacoane aerobe și anaerobe. Mediile standard pentru microorganismele aerobe includ: infuzia de creier-inimă, Columbia sau bulion triptic de soia, iar pentru bacteriile microaerofile și anaerobe se recomandă mediul tioglicolat. Mediile pot fi suplimentate cu hemină, vitamina K1, L-cisteină pentru favorizarea creșterii microorganismelor pretențioase nutritiv. Volumul de bulion selectat pentru culturile convenționale trebuie să fie astfel încât să se obțină un raport de sânge-bulion de 1:5 sau 1:10. Unele flacoane comerciale întrunesc criteriile de mai sus și cu un singur tip de flacon se pot detecta microorganismele aerobe, anaerobe și fungi.

Mediile bifazice

Utilizarea unui flacon care conține atât agar, cât și bulion, a fost inițial concepută pentru izolarea speciilor de *Brucella* din sânge. Aceste medii „bifazice” de hemocultură s-au dovedit a fi eficiente și pentru recuperarea micetelor și a bacteriilor din sânge. Popularitatea acestei metode a scăzut, din cauza complexității pregătirii flacoanelor cu acest tip de mediu. În prezent, sunt disponibile medii comerciale, care constau dintr-un flacon ce conține bulion și un cilindru atașabil, acoperit cu un mediu pe bază de agar pe ambele părți. Flacoanele sunt disponibile într-o varietate de combinații ale mediilor și volume pentru a fi utilizate la pacienții pediatrici sau la adulți și pentru testarea unei game de microorganismele atât aerobe, cât și anaerobe. La fel, sunt disponibile și formule pentru recuperarea micobacteriilor. Avantajele mediilor bifazice pentru hemocultură, comparativ cu mediile convenționale, se datorează unei recuperări mai bune a bacteriilor aerobe, anaerobe și a fungilor și reducerii timpului de detectare prin recuperarea coloniilor izolate. Dezavantajele sistemelor bifazice sunt: probabilitatea mai mare de contaminare și rate scăzute de recuperare a bacteriilor anaerobe. Similar cu mediile de cultură convenționale, cele bifazice trebuie monitorizate vizual, timp de șapte zile.

Liză-centrifugare se referă la o metodă în care se realizează liza celulelor sanguine, urmată de separarea microorganismelor de componentele sângelui, prin centrifugare și prin însămânțarea sedimentului pe medii de cultură solide.

Performanța metodei de liză-centrifugare este echivalentă cu cea a mediilor bifazice, datorită obținerii coloniilor izolate și ratei majorate de recuperare a fungilor filamentoși și a micetelor levuriforme.

Notă:

Pentru îmbunătățirea ratei de recuperare a fungilor, ghidurile internaționale subliniază importanța selectării mediilor, în funcție de tipurile suspectate de fungi.

Pentru detectarea fungemiei, se recomandă utilizarea următoarelor medii:

- 1) flacoane cu bulion,
- 2) flacoane bifazice și
- 3) flacoane de liză-centrifugare.

Cu toate acestea, fungii dimorfi și filamentoși pot fi recuperați în mod cert numai în flacoanele bifazice și de liză-centrifugare. Utilizarea flacoanelor anaerobe pentru detectarea fungilor nu este recomandată.

Mediile bifazice pot fi utilizate pentru recuperarea micetelor levuriforme, a fungilor dimorfi și filamentoși, dar necesită o incubare mai îndelungată a hemoculturilor, timp de patru săptămâni. Pentru a obține o performanță optimă a mediilor bifazice, este necesară o agitare frecventă și domoală a flacoanelor în primele 24 ore de incubare. Rata de recuperare diminuată a fungilor dimorfi în mediile bifazice poate fi atribuită unei perioade de incubație insuficientă. Fungii dimorfi și filamentoși se depistează mai bine în flacoanele de liză-centrifugare, comparativ cu alte metode manuale de testare a hemoculturii. Pentru recuperarea optimă a micetelor din flacoanele de liză-centrifugare, sedimentul se inoculează pe mai multe medii agarizate și se incubează la diferite regimuri de temperatură (27-30°C și 35-37°C).

8.2.2 Testarea automatizată

Majoritatea sistemelor de monitorizare continuă a hemoculturilor disponibile comercial se bazează pe detectarea creșterii nivelului de CO₂, produs rezultat în urma metabolizării active a microorganismelor. Sistemele au un design modular care poate fi adaptat în funcție de numărul de hemoculturi procesate.

Sistemele automatizate presupun utilizarea unor flacoane cu medii speciale: aerobe și anaerobe; cu sau fără aditivi, concepute pentru îmbunătățirea recuperării microorganismelor de la pacienții supuși terapiei antimicrobiene.

Flacoanele aerobe ce conțin inhibitori ai agenților antimicrobieni permit o recuperare mai bună și o detectare mai rapidă a microorganismelor.

Pentru recuperarea micobacteriilor din sânge, sunt disponibile medii speciale.

Flacoanele de hemocultură destinate testării automatizate sunt dotate, în partea inferioară, cu senzor care este separat de mediul lichid printr-o membrană selectiv permeabilă pentru CO₂, provocând schimbarea culorii senzorului, detectată fie colorimetric sau fluorometric, în funcție de sistem.

Datele sunt colectate și transferate pe un computer, unde algoritmi software le analizează și le recunosc fie creșterea, fie producerea de CO₂. Sporirea semnificativă de CO₂ este semnalată vizual/sonor și astfel flacoanele pot fi extrase din sistem pentru efectuarea frotiului și a subculturii.

Neutralizarea agenților antimicrobieni

Studiile analizate relatează că în momentul prelevării probelor pentru hemocultură 28-63% dintre pacienți sunt supuși tratamentului antimicrobian, ceea ce reduce semnificativ recuperarea microorganismelor.

Unele flacoane de hemocultură, destinate sistemelor automatizate, conțin rășini de inactivare ale antibioticelor și alte materiale adsorbante, inclusiv cărbune, pentru a inactiva efectul antimicrobienelor.

8.3 PROCESAREA FLACOANELOR

Metodele manuale de testare a hemoculturii necesită o examinare vizuală zilnică sau de două ori pe zi (cel puțin în primele 3 zile) a flacoanelor pentru a detecta macroscopic prezența agentului microbian.

Creșterea macroscopică poate fi evidențiată prin:

- un depozit flocular deasupra stratului de sânge;
- turbiditate uniformă sau imediat sub suprafața mediului;
- hemoliză;
- coagularea bulionului;
- o peliculă la suprafață;

- producție de gaz;
- granule albe/colonii la suprafață sau în adâncul stratului de sânge
- schimbarea culorii sângelui.

La prezența semnelor de creștere vizibilă, se efectuează subculturi pe agar, sânge și ciocolată și/sau frotiu Gram din flacoane aerobe și anaerobe.

Unele microorganisme pot crește fără a produce modificări vizibile ale mediului, de exemplu pneumococii care au tendința să dezvolte autoliză și mor foarte rapid. Din acest motiv, se recomandă efectuarea subculturilor oarbe de rutină pe agar, ciocolată, după 18–24 ore de incubare.

Subcultură oarbă reprezintă o subcultură, efectuată ca procedură de rutină în laborator, indiferent de dovezile obiective ale creșterii microbiene.

Subcultura terminală este o etapă de rutină, realizată din flacoanele de hemocultură, fără semne vizibile de creștere, efectuată la sfârșitul perioadei de incubare. Se transferă câteva picături (folosind o pipetă Pasteur sterilă) din flaconul de hemocultură, în urma agitării, într-un tub cu bulion tioglicolat, care, la rândul său, este incubat și monitorizat timp de 3 zile.

Subcultura oarbă sau terminală nu este recomandată, în mod obișnuit, pentru flacoanele de hemocultură, dacă sunt utilizate sisteme automatizate (trebuie respectate instrucțiunile producătorilor), dar sunt indicate pentru sistemele manuale. Unele organisme precum *Neisseria* spp, *Brucella* spp, *Francisella* spp, *H. influenzae* și *Legionella* pot da semnale slabe sau pot fi prezente în mediile de hemocultură, fără a prezenta semne vizibile de creștere. Efecte similare au fost raportate pentru speciile de *P. aeruginosa* și *Candida*. Poate fi luată în considerare și subcultura oarbă de la pacienții unde prezentarea sau istoricul clinic este indicativ pentru astfel de microorganisme.

Notă:

Repetarea subculturilor din flacoane depistate anterior pozitive sunt inutile pentru detectarea bacteriemiilor polimicrobiene.

Sistemele automatizate monitorizează flacoanele aerobe și anaerobe la intervale regulate de timp. La semnalizarea prezenței microorganismelor, se efectuează frotiu Gram și subculturi pe medii agarizate. Utilizând sistemele automatizate, nu se recomandă efectuarea subculturilor terminale din flacoanele negative, la expirarea timpului de incubare (5 zile).

Procesarea flacoanelor pozitive

Se prelucrează septul flaconului de hemocultură cu dezinfectant corespunzător și se lasă să se usuce. Se extrag câteva picături din flaconul de hemocultură cu un ac de ventilație sau cu pipeta Pasteur sterilă, în funcție de tipul flaconului, și se inoculează pe fiecare placă de agar. Pentru obținerea coloniilor izolate, se repartizează inoculul cu o ansă sterilă.

Pacienților în stare critică se realizează o testare rapidă a sensibilității la antimicrobiene, direct din flaconul de hemocultură detectat pozitiv, conform metodologiei rapide a standardului EUCAST:

- Inoculare directă a mediilor MH, MH-F cu 100-150 μl de conținut al flaconului pozitiv de hemocultură (BD, bioMerieux și Thermo Fisher).
- Nu se centrifughează și nu se fac diluții ale inoculului – se inoculează direct pe mediu, conform standardului EUCAST pentru realizarea metodei *disc difuzie*.
- Plăcile se incubează timp de 4, 6 și 8 ore.
- Zonele diametrelor de inhibiție se citesc frontal, după scoaterea capacului plăcilor Petri.
- Breakpoint-urile sunt disponibile pentru fiecare specie și timp de incubare (4, 6 și 8 ore).
- Interpretarea rezultatelor sensibilității se efectuează după identificarea microorganismului prin metode rapide (MALDI-TOF, PCR rapid).
- Metoda este validată doar pentru următoarele specii:
 1. *Escherichia coli*
 2. *Klebsiella pneumoniae*
 3. *Pseudomonas aeruginosa*
 4. *Staphylococcus aureus*
 5. *Streptococcus pneumoniae*
 6. *Enterococcus faecalis* și *Enterococcus faecium*
 7. *Acinetobacter baumannii*
- Nu toate zonele diametrelor pot fi citite după 4 ore, în asemenea caz se recitesc peste 6 sau 8 ore. Incubarea nu poate fi extinsă peste noapte, dacă e necesară extinderea peste noapte, testarea sensibilității la antimicrobiene se efectuează conform EUCAST-lui regular.
- Se citesc diametrele zonelor de inhibiție doar când se poate identifica o margine evidentă, în caz contrar plăcile se reincubează și se citesc după 6 sau 8 ore.

- Valorile zonelor de inhibiție (breakpoint-urile) din AST Rapid EUCAST sunt destinate doar pentru testarea rapidă a sensibilității la antimicrobiene.

Aceste valori (breakpoint-uri) nu se utilizează pentru interpretarea antibiogramei efectuate cu inocul preparat din colonii.

Notă:

*Pentru a minimiza riscul de autoliză al anumitor microorganisme, cum ar fi *S. pneumoniae*, se recomandă efectuarea subculturii cât mai curând posibil, după ce flacoanele sunt detectate ca pozitive.*

Notă:

La procesarea flacoanelor pozitive (metoda manuală) se realizează subcultură din toate flacoanele setului, așa cum este descris mai sus, chiar dacă se detectează pozitiv doar un singur flacon.

Procesarea flacoanelor negative

Metoda automată

Din flacoanele negative, de regulă, nu se efectuează subculturi, decât doar pentru anumiți pacienți, la insistența medicului clinician.

Metoda manuală

Din toate flacoanele aerobe negative, după 24-48 ore, se efectuează subculturi, ulterior cele care nu au fost confirmate ca pozitive vor fi reincubate și monitorizate.

ATENȚIE!

Semnal pozitiv, dar cultură negativă (la toate sistemele automatizate):

- se examinează curba de creștere, pentru a exclude posibilitatea rezultatelor fals pozitive, din cauza numărului mare de leucocite sau a excesului de sânge inoculat;
- se ia în considerare posibilitatea unui microorganism cu creștere lentă sau pretențios, în raport cu starea clinică a pacientului și rezultatul frotiului Gram.

8.4 MICROSCOPIA

Flacoane pozitive (procesate prin metoda manuală și automată)

Se efectuează frotiu Gram din fiecare flacon detectat pozitiv, iar în cazul utilizării mediului bifazic se va realiza atât din mediul lichid, cât și de pe suprafața agarului.

1. Se agită ușor flaconul, prin inversare.
2. Se prelucrează septul flaconului de hemocultură cu dezinfectantul corespunzător și se lasă să se usuce.
3. Cu un ac de ventilație sau o pipetă Pasteur sterilă, în funcție de tipul flaconului, se aplică câteva picături de bulion pe o lamă de microscop.
4. Cu ajutorul unei anse sterile se etalează cultura pentru a realiza un frotiu subțire după Gram.

Notă:

Consultați instrucțiunile producătorilor cu privire la pregătirea frotiurilor din flacoanele care conțin cărbune.

În cazul microscopiei negative (microorganismele nu sunt puse în evidență):

1. Se investighează curba de creștere (la sisteme automatizate) și la prezența criteriilor de creștere ar fi informativ pregătirea frotiurilor, utilizând alte tehnici de colorație.
2. Se efectuează subculturi pe plăcile cu agar (vezi tabelul 4) și se readuce flaconul în sistemul automat, pentru a continua perioada de incubare, conform instrucțiunilor producătorului.
3. Se vor lua în calcul speciile de *Mycobacterium*.

8.5 MEDII DE CULTURĂ UTILIZATE LA IZOLAREA MICROORGANISMELOR DIN HEMOCULTURĂ

Izolarea microorganismelor din flacoanele de hemocultură se efectuează prin repicarea câtorva picături de bulion pe medii, în plăci, utilizând un ac de ventilație sau o pipetă Pasteur sterilă. Repartizarea materialului repicat se efectuează cu o ansă sterilă pe fiecare placă de mediu.

Tabelul 4. Medii de cultură utilizate, condiții de incubare și microorganismele țintă

Starea clinică	Biosubstrat cercetat	Medii de cultură standard
Toate	Sânge	Agar sânge ¹
		Anaerob Agar/Agar sânge
Pentru următoarele situații se adaugă:		
Starea clinică	Biosubstrat cercetat	Medii de cultură suplimentare
Suspecție la meningococemie/meningită Bacili Gram-negativi sau diplococi depistați microscopic	Sânge	Agar ciocolată ¹
Bacili Gram-negativi depistați microscopic	Sânge	MacConkey/CLED sau agar cromogen
Infecție mixtă sau anaerobă depistată prezumptiv microscopic	Sânge	Fastidious Anaerob Agar cu neomicină + disc cu metronida zol 5μg
Infecție sistemică, provocată de fungi ³	Sânge	Agar Sabouraud
Culturi primare negative și curbe de creștere pozitivă (se face însămânțarea din toate flacoanele) ⁴	Sânge	Agar sânge
		Agar sânge cu striu de <i>S. aureus</i>
		Anaerob Agar/Agar sânge
		MacConkey/CLED agar

¹ La depistarea streptococilor, prin microscopie, se aplică un disc impregnat cu optochină, pentru diferențierea *S. pneumoniae* de alte specii de streptococi.

² Incubarea poate fi prelungită până la 5 zile, în cazul admiterii rezultatelor fals negative sau după indicații clinice; plăcile se verifică după 40 de ore și se lasă la incubare până la 5 zile.

³ După indicații clinice, incubarea flacoanelor poate fi prelungită până la 3 săptămâni, pentru *Cryptococcus spp.* și până la 6 săptămâni pentru *Histoplasma spp.*

⁴ În caz de necesitate se investighează și alte specii de microorganisme.

Incubare			Citirea rezultatelor	Microorganism- țintă
Temp., °C	Cond. atm.	Timp		
35-37	5-10% CO ₂	40-48 ore ²	Zilnic	Orice microorganism este important
35-37	anaerobe	40-48 ore ²	≥ 40 ore până la 5 zile	Orice microorganism este important
Incubare			Citirea rezultatelor	Microorganism- țintă
Temp., °C	Cond.atm.	Timp		
35-37	5-10% CO ₂	40-48 ore	Zilnic	<i>Haemophilus</i> spp., <i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>
35-37	aerobe	16-24 ore	≥16 ore	<i>Enterobacteriaceae</i> , Microorganism nefermentative, <i>Pseudomonas</i> spp.
35-37	anaerobe	5-7 zile	≥40 ore până la 5 zile	Microorganism anaerobe
28-30	aerobe	5 zile	a 2-a și a 5-a zi	Fungi Micete
35-37	microaerofile	5 zile	≥3 zi și a 5-a zi	<i>Campylobacter</i> spp., <i>Helicobacter</i> spp.
35-37	5-10% CO ₂	40-48 ore	≥40 ore	<i>Abiotrophia</i> spp.
35-37	anaerobe	5 zile	≥40 ore și a 5-a zi	Microorganism anaerobe cisteino- dependente
35-37	aerobe	16-24 ore	≥16 ore	Microorganism anaerobe cisteino- dependente

8.6 IDENTIFICAREA

Toate izolatele cu semnificație clinică se identifică până la nivel de specie. Fiecare microorganism, considerat contaminant, nu necesită identificare până la nivel de specie. Izolatul cu semnificație clinică se păstrează cel puțin o săptămână.

Pentru a reduce timpul de la recoltare a hemoculturii până la momentul raportării rezultatelor (TAT), pot fi utilizate metode rapide de identificare și de testare a sensibilității la antimicrobiene. Au fost evaluate un șir de metode de identificare rapidă și de determinare a sensibilității la antimicrobiene: tehnica în tuburi (pentru coagulaza liberă), teste de seroidentificare (latex aglutinarea), metode automate (ID/AST, MALDI-TOF), tehnici moleculare single/multiplex. Este important de reținut că identificarea și testarea sensibilității la antimicrobiene se realizează din cultură pură de 16-24 ore, pentru a evita raportarea rezultatelor discrepante.

Datele științifice și ghidurile internaționale actuale au demonstrat necesitatea identificării rapide a agenților etiologici ai infecției fluxului sanguin și a genelor de rezistență ale acestora prin metode rapide/moleculare. Algoritmul reprezentat în anexa 3 permite terapia, țintită și precoce cu preparate antimicrobiene, care îmbunătățește managementul pacientului, reduce mortalitatea, durata spitalizării pacienților cu IFS și costurile îngrijirii medicale.

8.7 TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIMICROBIENE

În cazul stării critice a pacienților se recomandă realizarea testării rapide a sensibilității la antimicrobiene, direct din flaconul pozitiv, conform metodologiei EUCAST AST Rapid.

După cultivarea și identificarea microorganismului izolat, se realizează testarea sensibilității la antimicrobiene conform metodologiei EUCAST regular.

8.8 TRIMITEREA IZOLATELOR ÎN LABORATORUL DE REFERINȚĂ

În laboratorul de referință vor fi trimise izolatele din hemoculturi, care prezintă:

- rezistență neobișnuită (ex. *Staphylococcus aureus* rezistent la cefoxitină și sensibil la oxacilină; bacterii Gram-negative, sensibile la colistină) sau neașteptată;

- unul sau mai multe mecanisme de rezistență (*Enterobacteriaceae* producătoare de carbapenemaze; *Enterobacteriaceae* producătoare de β -lactamaze cu spectru extins; *Enterobacteriaceae* producătoare de β -lactamaze AmpC achiziționate; *Staphylococcus aureus* metilino-rezistent (MRSA); *Staphylococcus aureus* rezistent la glicopeptide; *Enterococcus* vancomicin-rezistent (VRE); *Streptococcus pneumoniae* penicilin-rezistent (PNSP); *Salmonella* spp. rezistentă la fluorochinolone, cefalosporine de GIII și aminoglicozide.
- unele deficiențe privind identificarea speciei și a mecanismelor de rezistență.

9 // RAPORTAREA REZULTATELOR

Rezultatele hemoculturii trebuie raportate exact, clar, fără ambiguitate, obiectiv, conținând informația corespunzătoare, necesară pentru interpretarea lor (vezi anexa 4.) Toate rapoartele emise trebuie păstrate ca înregistrări tehnice. Laboratorul trebuie să fie responsabil pentru toate informațiile furnizate în raport, cu excepția cazului în care informațiile sunt furnizate de personalul medical. Datele furnizate de personalul medical, trebuie să fie clar identificate. Atunci când informația este furnizată de personalul medical și poate afecta validitatea rezultatelor, acest lucru trebuie declarat în conținutul raportului.

Tabelul 5. Standard postanalitic

Stadiu de investigare:	Criteriu:	Standard:
Postnalitic		
Raportare negativ (de la recepția probei în laborator până la raportarea rezultatului)	Tip Raport	Timp eliberare
	Raport Preliminar Negativ	48 ore
	Raport Final Negativ	5-7 zile
Raportare pozitiv (de la recepția probei în laborator până la raportarea rezultatului)	Raport Preliminar Pozitiv (Eliberare rezultat prin: telefon, electronic)	în 2 ore de la disponibilitatea rezultatelor identificării/ antibiogramei (vezi tab. 3)
	Raport final pozitiv (electronic/scris)	5-7 zile

Raportul preliminar referitor la **cultura pozitivă** este transmis telefonic sau electronic. În caz de necesitate, este emis suplimentar și în formă scrisă.

În funcție de metodele utilizate și de rezultatele disponibile, raportul preliminar scris poate să includă:

1. Rezultatul colorației Gram, realizată din flaconul de hemocultură
2. Identificarea preliminară a izolatelor (bazată pe morfologia și microscopia coloniilor, rezultatele testelor rapide etc.)
3. Datele testării sensibilității la antimicrobiene

NOTĂ!

În cazul în care este posibil, raportul final scris/generat de computer va fi eliberat în aceeași zi, în maxim 24 de ore, după eliberarea celui preliminar verbal.

Rezultatele negative preliminare ar trebui raportate la 36 ore de la incubare pentru nou-născuți și la 48 ore pentru restul pacienților.

Raportul final este transmis scris/electronic și poate să includă una dintre următoarele mențiuni (transmise anterior verbal):

- *Testul a fost anulat* (proba neconformă)
- *Lipsa creșterii* – timpul total de incubare, conform protocolului de laborator
- *Hemocultură pozitivă*

Raportul final al hemoculturii pozitive cuprinde următoarele date:

1. Rezultatul final al colorației Gram
2. Identificarea finală a microorganismelor care au fost izolate, cu un comentariu în cazul unui rezultat incert (ex. posibilă contaminare)
3. Rezultatele finale privind testarea sensibilității la antimicrobiene

Raportul final atât pozitiv, cât și negativ scris/generat de computer va fi eliberat cât mai curând posibil, în termen de maxim 5-7 zile. În caz de necesitatea unei incubări extinse sau trimiterea izolatelor pentru confirmare la un laborator de referință, raportul final poate fi eliberat mai târziu.

NOTĂ!

Orice informații suplimentare, care ar putea afecta interpretarea rezultatului final, trebuie incluse în raportul scris (de exemplu, volumul insuficient de sânge colectat, nerespectarea timpului de transportare etc).

Pentru a minimiza contaminarea hemoculturii, fiecare laborator trebuie să dispună de politici care descriu:

- tehnica de colectare a sângelui ce reduce la minimum contaminarea;
- algoritmul standardizat pentru evaluarea izolatelor din hemoculturi, pentru a determina rata de contaminare (vezi fig. 1).

Chiar și atunci când sunt utilizate cele mai bune protocoale de colectare a sângelui, este dificil de obținut diminuarea ratei de contaminare sub 2%. Microorganismele asociate în mod obișnuit cu hemoculturi contaminate (ex: *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp., stafilococi coagulazo negativi, *Aerococcus* spp., *Micrococcus* spp.) sunt, de asemenea, capabile să provoace infecții sistemice.

În multe cazuri, un potențial contaminant este recuperat din unul sau din ambele flacoane, dintr-un singur set de hemocultură. Atribuirea semnificației clinice unui izolat dubios este dificilă, în cazul în care nu s-au recoltat din start 2 seturi de hemoculturi.

Una dintre provocările laboratorului microbiologic este evaluarea unui izolat cu potențial de virulență redus recuperat dintr-un singur set de hemocultură (unul sau ambele flacoane).

Toate izolatele se păstrează câteva zile pentru a putea fi efectuate teste suplimentare în cazul recuperării unui microorganism identic din hemoculturile ulterioare ale aceluiași pacient.

În cazul recuperării aceluiași microorganism din mai multe seturi de hemoculturi recoltate până la 24 ore (în dependență de clinica pacientului) se recomandă identificarea completă și testarea sensibilității la antimicrobiene a izolatului inițial.

Contaminarea hemoculturilor poate fi evitată prin prelucrarea meticuloasă a pielii și respectarea procedurilor aseptice pentru inoculare și subcultivare. Cu toate acestea, chiar și în condiții ideale, 3–5% din hemoculturi sunt contaminate cu microbiota pielii sau microorganisme din mediu (*Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp.).

Totuși, astfel de microorganisme pot fi implicate ca agenți patogeni în infecțiile de flux sangvin (IFS) și chiar pot provoca endocardită. Criteriile enumerate mai jos permit suspecția unei infecții adevărate:

- prezența izolatelor identice din două flacoane ale aceleiași set de hemocultură;
- izolarea aceleiași specii de microorganisme din mai multe seturi;
- evidențierea creșterii rapide (în 48 de ore) a microorganismelor;

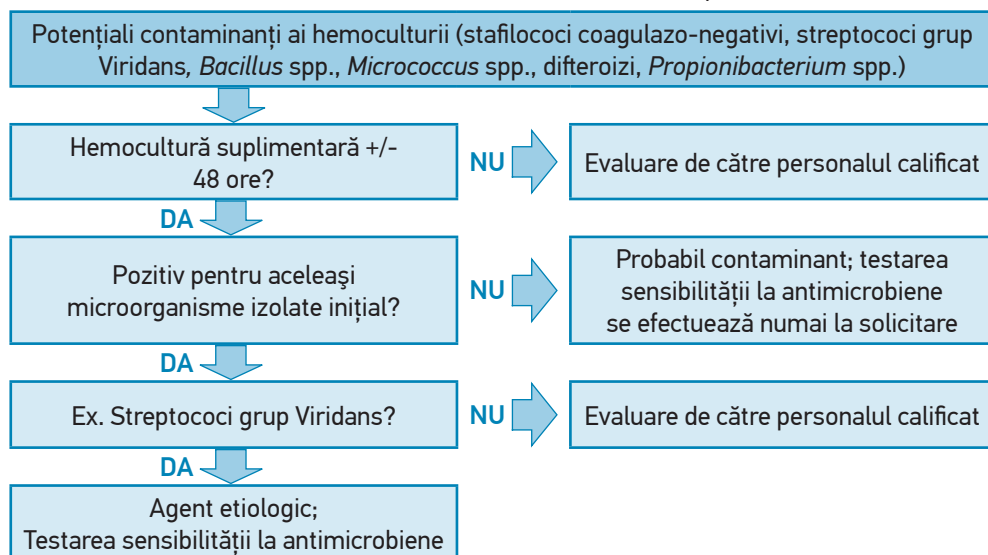
Toate rezultatele hemoculturii trebuie raportate clinicianului, inclusiv și a contaminanților presupuși cu mențiunea respectivă, de exemplu *Propionibacterium acnes* (comensal cutanat), *Staphylococcus epidermidis* (contaminant probabil) în scopul stabilirii unei comunicări eficiente între medicul clinician și personalul de laborator.

Identificarea a două sau mai multe specii de microorganisme poate indica o bacteriemie polimicrobiană la pacienții imunocompromiși, dar poate fi, de asemenea, cauzată de o contaminare.

Bacteriemia „anaerobă” este adesea polimicrobiană, de exemplu, unul sau mai mulți anaerobi pot fi asociați cu microorganisme aerobe în bacteremia fulminantă severă, în cazul traumatismelor majore sau intervențiilor chirurgicale la nivelul intestinului gros.

Contaminanții din hemoculturi sunt frecvent întâlniți și reprezintă o povară economică pentru sistemul de asistență medicală și confuzie pentru clinicieni. Pentru a minimiza riscul de contaminare a hemoculturii cu microbiota comensală, pielea trebuie asepticizată meticulos.

Fig. 1. ALGORITMUL DETERMINĂRII CONTAMINANȚILOR



În procesul de investigare a hemoculturii, la fiecare etapă este posibil a identifica punctele critice, care pot influența TAT-ul (turnaround times).

Termenul TAT, în acest context, se referă la timpul din momentul recoltării probei de sânge până la raportarea rezultatului hemoculturii.

TAT de laborator se referă la momentul de la primirea probei în laborator până la raportarea rezultatelor.

- Timpul de la recoltarea până la primirea probei în laborator – Timp de transport (TT).
- Timpul de la primirea până la încărcarea probei în sistemul automatizat/incubare.
- Timpul de la încărcarea până la înregistrarea pozitivă a probei – Timp de detectare (TTD).
- Timpul de la semnalizarea pozitivă a probei până la identificarea agentului microbial și rezultatele testării sensibilității la antimicrobiene.
- Timpul de la disponibilitatea rezultatelor identificării și a sensibilității la antimicrobiene până la raportarea rezultatului final.

Fiecare etapă a procesării hemoculturii depinde de mai mulți factori externi, inclusiv de transport, infrastructură, stabilirea priorităților și timpul de testare de către personalul de laborator, raportarea în timp util a rezultatelor identificării/sensibilității la antimicrobiene a agenților microbieni izolați (excepție fiind TTD).

Procesul de creștere a microorganismelor din flaconul cu hemocultură poate fi puțin influențat/accelerat după plasarea în sistemul automatizat.

Timpul, de la semnalizarea unui rezultat pozitiv până la rezultatele testelor de identificare și ale antibiogramei, poate fi subdivizat în două etape:

1. Timpul de la semnalizarea pozitivării probei până la descărcarea din sistemul automatizat
2. Timpul de la descărcare până la disponibilitatea rezultatelor frotiului Gram, ale identificării și ale antibiogramei.

Scăderea TAT-ului contribuie la obținerea rezultatelor rapide și la îmbunătățirea managementului pacientului, prin urmare laboratoarele microbiologice trebuie să determine eficiența costurilor pentru etapele unde sunt necesare investiții.

Raportarea la timp a rezultatelor hemoculturii permite ajustarea tratamentului antimicrobian empiric și îmbunătățirea *stewardship-ului antimicrobian.

*Stewardship-ul antimicrobian prevede optimizarea/individualizarea terapiei pacientului; prevenirea utilizării inadecvate a preparatelor antimicrobiene; reducerea rezistenței la antimicrobiene; îmbunătățirea efectelor și a siguranței terapiei asupra pacientului.

12 // FEREASTRA TERAPEUTICĂ

Pentru fiecare pacient există o perioadă de timp, în care acesta poate fi tratat cu succes, considerată drept „ferastră terapeutică”.

Există un moment, în afara ferestrei terapeutice, în care infecția poate fi ținută sub control sau poate fi eradicată, dar pacientul nu va supraviețui, din cauza leziunilor ireversibile ale organelor. Prin urmare, este necesară indicarea terapiei adecvate, inclusiv a celei antimicrobiene, în perioada *ferestrei terapeutice*.

Durata *ferestrei terapeutice* variază și poate fi scurtă sau indefinit de lungă, în funcție de microorganismul și de pacientul implicat. Prin urmare, abordarea optimă presupune prescrierea precoce a antibioticelor cu spectru larg, urmată de raportarea la timp a rezultatelor investigațiilor microbiologice clinicianului și ajustarea terapiei antimicrobiene.

Următoarele scenarii demonstrează influența potențială a rezultatului hemoculturii asupra succesului terapeutic al pacientului:

1. Tratament corespunzător, administrat în fereastra terapeutică și, ca urmare, pacientul supraviețuiește

Fereastra terapeutică reprezintă o perioadă de timp în care atât infecția, cât și pacientul pot fi tratați cu succes. Durata ferestrei terapeutice variază semnificativ. De exemplu, la un pacient tânăr, cu cistită, fereastra terapeutică poate fi extinsă pe o perioadă lungă. La cealaltă extremă, fereastra

terapeutică la pacientul septic, poate fi foarte scurtă. Administrarea întârziată a tratamentului adecvat în această perioadă este asociată cu eșec terapeutic. Diagnosticul sepsisului și terapia promptă, cu preparate antimicrobiene, constituie o acțiune cheie, de care depinde supraviețuirea pacientului.

2. Pacientului i se administrează tratament empiric antimicrobian necorespunzător pe durata ferestrei terapeutice și el nu supraviețuiește

Durata ferestrei terapeutice poate fi în acest caz foarte scurtă, până la câteva zile. Sepsisul evoluează într-o anumită perioadă de timp și atunci când pacientul este văzut pentru prima dată, starea lui poate fi stabilă, cu o fereastră terapeutică aparent lungă.

Administrarea tratamentului antimicrobian empiric inadecvat duce la pierderea timpului din fereastra terapeutică, deoarece este dificil a aprecia eficiența acestuia în primele 24-48 de ore.

Tergiversarea diagnosticului de sepsis, inclusiv indicarea hemoculturii, identificarea rapidă a agentului cauzal și testarea sensibilității la antimicrobiene se soldează cu decesul pacientului.

3. Pacientului i se administrează un tratament adecvat, dar în afara ferestrei terapeutice și el nu supraviețuiește

Rezultatele hemoculturii demonstrează că pacientului i se administrează un tratament necorespunzător. Cu toate acestea, rezultatul hemoculturii este primit prea târziu, în afara „ferestrei terapeutice” și chiar dacă este inițiat un tratament adecvat, decesul pacientului este inevitabil.

IFS putea fi eradicată cu preparate antimicrobiene, însă efectul infecției asupra pacientului a devenit ireversibil.

4. Pacientul i se administrează un tratament adecvat în fereastra terapeutică și el supraviețuiește

Rezultatul hemoculturii, primit în timp util în fereastra terapeutică, permite instituirea terapiei adecvate. Starea clinică a pacientului a fost stabilă la internare, dar deteriorată cu un tratament incorect, apropiindu-se rapid de sfârșitul ferestrei terapeutice. Însă investigarea hemoculturii, cu eliberarea rapidă a rezultatului, oferă oportunitatea tratamentului adecvat, în timp util și permite supraviețuirea pacientului cu infecție de flux sangvin.

Recomandări de recoltare a hemoculturii (cu seringă)

PASUL 1

VERIFICARE ID PACIENT ȘI PREGĂTIRE KIT



Confirmare ID pacient.



Preparare kit de recoltare.



Atenție la data expirării flacoanelor!

Nu se utilizează flacoane deteriorate sau cu semne de contaminare.



PASUL 2

PREPARARE FLACOANE PENTRU INOCULARE



Se dezinfectează mâinile cu alcool.



Se îndepărtează capacul de protecție și se dezinfectează septul flaconului.

PASUL 3

PREPARAREA LOCULUI DE VENIPUNCȚIE



Se aplică garoul.



Se palpează vena, se îmbracă mănuși sterile.



Se dezinfectează pielea, se lasă să acționeze. Recomandat (clorhexidina în 70% alcool isopropilic).

PASUL 4

RECOLTARE VENOASĂ



Se atașează acul la seringă.



Pentru a preveni contaminarea nu se palpează vena înainte de a introduce acul.
Se colectează proba.

PASUL 5

RECOLTARE VENOASĂ



Se colectează mai întâi flaconul anaerob.
Se colectează 10 ml pentru adulți.



Se repetă procedura pentru flaconul aerob (10 ml – adulți, pînă la 4 ml – copii)

PASUL 6

FINALIZAREA PROCEDURII



Se aruncă seringă și acul la deșeurile contaminate, se îndepărtează mănușile și se spală mâinile.



Se notează data și ora recoltării.
Se transportă în laborator cât mai repede posibil.

Sumar privind diagnosticul de laborator al hemoculturilor în funcție de agentul etiologic

Agent etiologic	Procedura de diagnostic	Volumul probei	Transportarea
<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i> Enterobacteriaceae <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp. HACEK ^a bacteria <i>Brucella</i> spp Anaerobic bacteria	Adulți: 2–4 seturi per episod septic Copii și sugari: ≥2 seturi de hemocultură	20–30 ml sânge per set în cel puțin 2 flacoane ^b Volumul de sânge depinde de masa corporală a copilului (vezi tabelul 1).	Flacoanele de hemocultură inoculate trebuie transportate în laborator în maxim 4 ore la temperatura camerei. Microorganismele supraviețuiesc în flacoanele de hemocultură chiar dacă nu sunt incubate imediat.
	2 sau mai multe tuburi de hemocultură liză-centrifugare ^c PCR Serologie pentru detecția IgM/IgG	10 ml sânge se inoculează direct în fiecare tub de liză-centrifugare 5 ml plasmă 5 ml ser	Flacoanele de liză-centrifugare se transportă la temperatura camerei și se vor procesa în maxim 8 ore Tuburi cu EDTA, la temperatura camerei, 2 ore Tuburi cu Clot Activator, la temperatura camerei, 2 ore
<i>Legionella</i> spp.	2 sau mai multe tuburi liză-centrifugare de hemocultură ^d Ag <i>Legionella</i> din urină (serotip 1)	10 ml sânge se inoculează direct în fiecare tub de liză-centrifugare 10 ml urină din jetul mijlociu ^e	Flacoane de liză-centrifugare se transportă la temperatura camerei, se procesează în maxim 8 ore Container închis, la temperatura camerei, 2 ore
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Coxiella</i> serologie (reacția imunofluorescentă) PCR	5 ml ser 5 ml ser	Tuburi cu Clot Activator, la temperatura camerei, 2 ore Tuburi cu EDTA, la temperatura camerei, 2 ore

Agent etiologic	Procedura de diagnostic	Volumul probei	Transportarea
<i>Tropheryma whipplei</i>	PCR	5 ml plasmă	Tuburi cu EDTA, la temperatura camerei, 2 ore
Funghi	Adulți: 2–4 seturi de hemocultură Copii și nou-născuți: ≥2 seturi de hemocultură	20–30 ml sânge per set inoculate în cel puțin 2 flacoane ^f Volumul depinde de greutatea copilului (vezi tabelul 1)	Flacoanele inoculate se transportă în laborator, maxim 4 ore, pentru o încărcare/incubare precoce. Fungii pot supraviețui în flacoanele de hemocultură, chiar dacă nu sunt incubate imediat. Pentru o recuperare mai bună a <i>Malassezia</i> spp.: - hemocultura necesită suplimentare lipidică; - este recomandat mediu liza-centrifugare.
Funghi filamentoși și dimorfi ^g	≥2 flacoane de mediu liză-centrifugare	10 ml sânge se inoculează direct în fiecare tub de liză-centrifugare	Tuburile de liză-centrifugare se transportă la temperatura camerei și se procesează în maxim 8 ore.

^a HACEK – include *Haemophilus (Aggregatibacter) aphrophilus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Aggregatibacter (anterior Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, și *Kingella kingae*.

^b În mod obișnuit, probele de sânge sunt împărțite în flacoane aerobe și anaerobe. Pot exista situații în care este prudent să omitem flaconul anaerob și să împărțim probe de sânge între 2 flacoane aerobe. Un exemplu este atunci când se suspectează *fungemia datorată levurilor*.

^c Rata de succes a recuperării *Bartonella* spp din sânge, chiar și atunci când se folosesc metode optime, este extrem de scăzută.

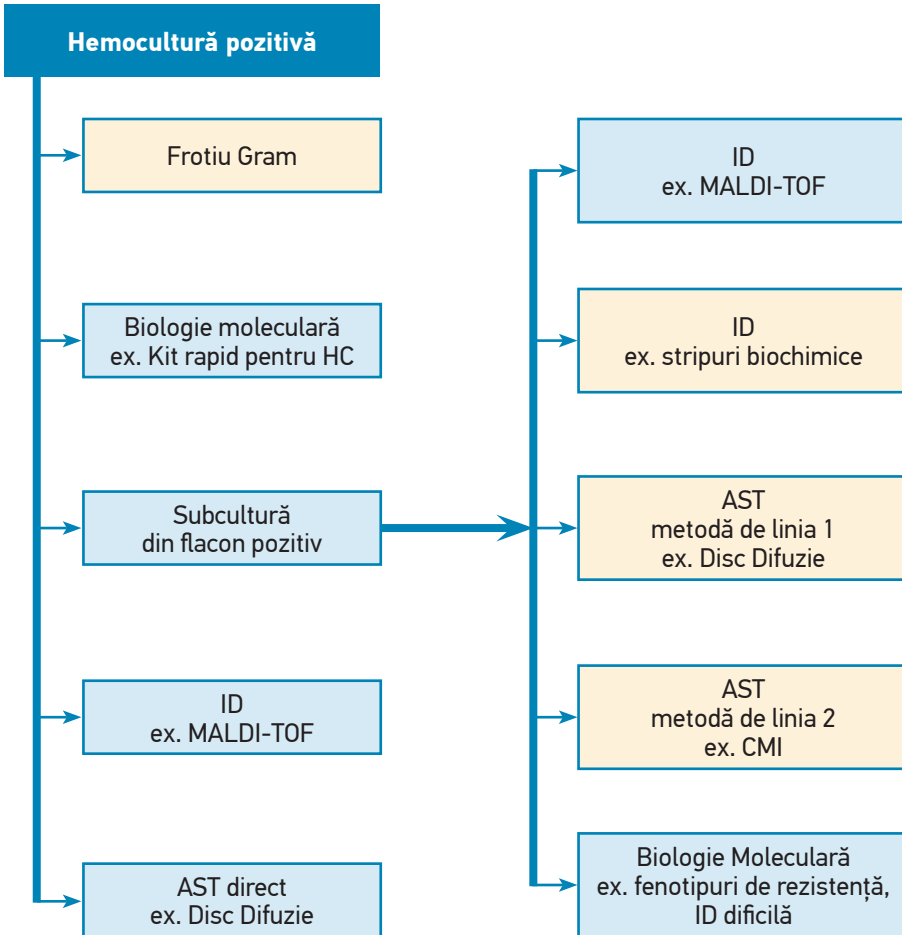
^d Bacteriemia cauzată de *Legionella* este ocazională și rareori este recuperată din sânge, chiar și atunci când se aplică tehnici optime.

^e Proba optimă este prima urină de dimineață.

^f Întrucât levurile sunt microorganisme aerobe, când se suspectează *fungemia datorată acestora*, ar fi prudent, în cadrul unei serii de culturi de sânge, să se inoculeze cel puțin 1 eșantion de sânge în 2 flacoane aerobe, în schimbul inoculării obișnuite (flacon aerob și anaerob). Alternativ, poate fi utilizat flacon cu mediu de bullion, conceput pentru un randament sporit de recuperare a levurilor sau de liză-centrifugare.

^g Unii funghi dimorfici (de exemplu, *Malassezia* spp.) pot fi vizualizați în frotiu de sânge periferic la pacienți, folosind una dintre colorații pentru evidențierea fungilor.

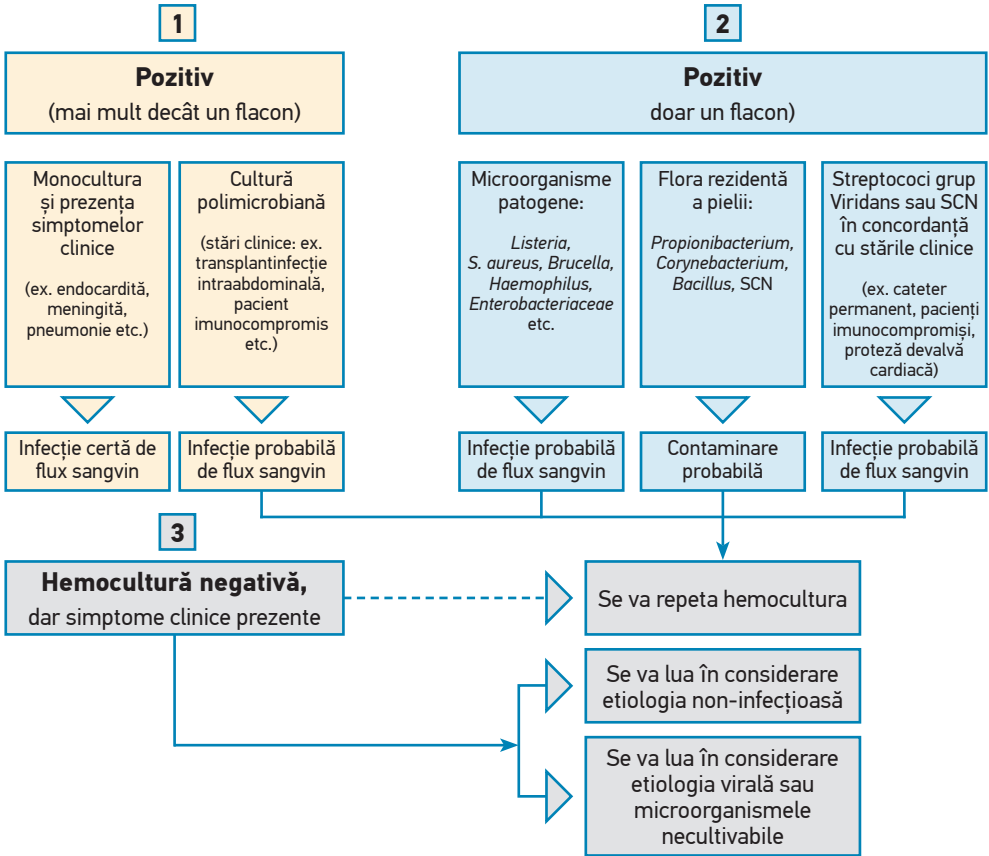
Exemplu de testare a hemoculturii



Abrevieri: ID – Identificare, AST – Testarea Sensibilității la Antimicrobiene, CMI – Concentrație Minimă Inhibitoare, HC- hemocultură.

În funcție de laborator, întregul proces poate include de la 6 până la 12 sub-procese de testare. Mai multe metode de identificare (de exemplu, metoda ID MALDI-TOF și kit rapid de biologie moleculară pentru HC) pot coexista în proces, în funcție de strategiile existente. Albastru: sub-procese partajate cu alte metode de testare microbiană; roșu: subprocese specifice/obligatorii metodei de testare a culturii de sânge.

Interpretarea și raportarea rezultatelor hemoculturii





REFERINȚE:

1. Antillon M., Saad N.J., Baker S. The Relationship Between Blood Sample Volume and Diagnostic Sensitivity of Blood Culture for Typhoid and Paratyphoid Fever: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *J Infect Dis*, 2018 Nov 10;218(suppl_4):S255-S267.
2. Baron E.J., Scott J.D., Tompkins L.S. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. In: *Clin Infect Dis*. 2005;41:1677-1680.
3. Baron E.J., Weinstein M.P., Dunne Jr. W.M. et al. Cumitech 1C, Blood Cultures IV. Coordinating ed., E.J. Baron. In: *ASM Press*, Washington D.C. 2005.
4. Bille J., Roberts G.D., Washington J.A. Retrospective comparison of three blood culture media for the recovery of yeasts from clinical specimens. In: *Eur J Clin Microbiol*. 1983;2:22-2.
5. Bille J., Stockman L., Roberts G.D. et al. Evaluation of a lysis-centrifugation system for recovery of yeasts and filamentous fungi from blood. In: *J Clin Microbiol*. 1983;18:469-471.
6. Bokhari A. M. Bacterial Sepsis, In: *MBBS*, Feb 05, 2019.
7. Buchan B.W., Ginocchio C.C., Manii R. et al. Multiplex identification of gram-positive bacteria and resistance determinants directly from positive blood culture broths: evaluation of an automated microarray-based nucleic acid test. In: *PLoS Med* 2013;10:e1001478.
8. Caplan L.M., Merz W.G. Evaluation of two commercially prepared biphasic media for recovery of fungi from blood. In: *J Clin Microbiol*. 1978; 8:469-470.
9. Cecconi M., Evans L., Levy M., Rhodes A. Sepsis and Septic Shock, 2018 Jul 7;392(10141):75-87. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30696-2. Epub 2018 Jun 21.
10. Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd. In: *Standards for the Medical Laboratory*. 2010. 4.
11. Cockerill F.R., Wilson J.W., Vetter E.A. et al. Optimal testing parameters for blood cultures. In: *Clin Infect Dis*. 2004;38:1724-17.
12. Deresinski S. Principles of Antibiotic Therapy in Severe Infections: Optimizing the Therapeutic Approach by Use of Laboratory and Clinical Data. In: *Clinical Infectious Diseases* 2007;45:S177-S83.
13. Dunne W.M., Nolte F.S., Wilson M.L. Blood Cultures III. Hindler JA, coordinating ed. Washington, DC, In: *American Society for Microbiology*; 1997.
14. European Manual of Clinical Microbiology, 1st edition, ESCMID.
15. Fenollar F., Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. In: *Int J Antimicrob Agents* 2007;30 Suppl 1:S7-15.
16. Flayhart D., Borek A.P. et al. Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. In: *J Clin Microbiol* 2007;45:816-21.

17. Hall M.M., Mueske C.A., Ilstrup D.M. et al. Evaluation of biphasic medium for blood cultures. In: *J Clin Microbiol.* 1979;10:673-676.
18. Hamilton D.J., Amos D., Schwartz R.W. et al. Effect of delay in processing on lysis-centrifugation blood culture results from marrow transplant patients. In: *J Clin Microbiol.* 1989;27:1588-1593.
19. Hardy D.J., Hulbert B.B., Migneault P.C. Time to detection of positive BacT/Alert blood cultures and lack of need for routine subculture of 5- to 7-day negative cultures. In: *J Clin Microbiol* 1992;30:2743-5
20. Hardy D.J., Hulbert B.B., Migneault P.C. Time to detection of positive BacT/Alert blood cultures and lack of need for routine subculture of 5- to 7-day negative cultures. In: *J Clin Microbiol.* 1992;30:2743-27
21. Hautala T., Syrjala H., Lehtinen V. et al. Blood culture Gram stain and clinical categorization based empirical antimicrobial therapy of bloodstream infection. In: *Int JAntimicrobAgents* 2005;25:329-33.
22. Huang L., Lu B., Qin R. et al. PCR-ESI/MS for Molecular Diagnosis of Bloodstream Infections Directly From Blood Samples: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Clin Lab.* 2018 Jul 1;64(7):1153-1161.
23. Ilstrup D.M., Washington J.A. The importance of volume of blood cultured in the detection of bacteremia and fungemia. In: *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1983;1:107-11.
24. Janapatla R.P., Yan J.J., Chien M.L. et al. Effect of overnight storage of blood culture bottles on bacterial detection time in the BACTEC 9240 blood culture system. In: *JMicrobiolImmunolInfect* 2010;43:126-32.
25. Kellogg J.A., Manzella J.P., Bankert D.A. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. In: *JClinMicrobiol* 2000;38:2181-5.
26. Kerremans J.J., van der Bij A.K., Goessens W. et al. Immediate incubation of blood cultures outside routine laboratory hours of operation accelerates antibiotic switching. In: *JClinMicrobiol* 2009;47:3520-3.
27. Klaerner H.G., Eschenbach U., Kamereck K. et al. Failure of an automated blood culture system to detect nonfermentative gram-negative bacteria. In: *JClinMicrobiol* 2000;38:1036-41.
28. Kumar Y., Qunibi M., Neal T.J., Yoxall C.W. Time to positivity of neonatal blood cultures. In: *ArchDisChild Fetal Neonatal Ed* 2001;85:F182-F6.
29. Lagace-Wiens P.R., Alfa M.J., Manickam K., Karlowsky J.A. Thermostable DNase is superior to tube coagulase for direct detection of *Staphylococcus aureus* in positive blood cultures. In: *JClinMicrobiol* 2007;45:3478-9.
30. Lai C.C., Wang C.Y., Liu W.L. et al. Time to positivity in blood cultures of staphylococci: clinical significance in bacteremia. In: *JInfect* 2011;62:249-51.
31. Lemming L., Holt H.M., Petersen I.S. et al. Bactec 9240 blood culture system: to preincubate at 35 degrees C or not? In: *ClinMicrobiolInfect* 2004;10:1089-91.
32. Li J., Plorde J., Carlson L. Effects of volume and periodicity on blood cultures. In: *J Clin Microbiol.* 1994;32:2829-283.

33. Lu Y., Hatch J., Holmberg K. et al. Multi-center Evaluation of the BioFireR FilmArrayR Blood Culture Identification 2 Panel 24 for the Detection of Microorganisms and Resistance Markers in Positive Blood Cultures. In: *ID WEEK 2019*.
34. Martiny D., Debaugnies F., Gateff D. et al. Impact of rapid microbial identification directly from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on patient management. In: *ClinMicrobiolInfect* 2013;19:E568-E81.
35. Menchinelli G. et al. In vitro Evaluation of BACT/ALERT VIRTUO, BACT/ALERT 3D, and BACTEC TM FX Automated Blood Culture Systems for Detection of Microbial Pathogens Using Simulated Human Blood Samples. In: *Frontiers in Microbiology*, Feb 2019.
36. Menchinelli G., Liotti F.M., Giordano L. et al. Efficient Inactivation of Clinically Relevant Antimicrobial Drug Concentrations by BACT/ALERT or BACTEC TM 2 Resin-Containing Media in Simulated Adult Blood Cultures, In: *Università Cattolica del Sacro Cuore*, 2019 American Society for Microbiology.
37. Michael Miller J., Matthew J. et al. Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. In: *A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases*, 2018.
38. Miller N.S., Rogan D., Orr B.L., Whitney D. Comparison of BD Bactec Plus blood culture media to VersaTREK Redox blood culture media for detection of bacterial pathogens in simulated adult blood cultures containing therapeutic concentrations of antibiotics. In: *JClinMicrobiol* 2011;49:1624-7.
39. National Institute for Healthcare and Clinical Excellence. Antibiotics for early-onset neonatal infection: antibiotics for the prevention and treatment of early-onset neonatal infection. 2012.
40. Ntobeko N., Lindsey A., Stephen O. et al. Guideline for the optimal use of blood cultures, In: *Afr Med J* 2010; 100: 839-843.
41. Pammi M., Flores A., Versalovic J. et al. Molecular Assays for the Diagnosis of Sepsis in Neonates. In: *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Feb 25;2(2):CD011926.
42. Paolucci M., Landini M.P., Sambri V. How can the microbiologist help in diagnosing neonatal sepsis? In: *IntJPediatr* 2012:120-39.
43. Pohlman J.K., Kirkley B.A., Easley K.A. et al. Controlled Clinical Evaluation of BACTEC Plus Aerobic/F and BACT/ALERT Aerobic FAN Bottles for Detection of Bloodstream Infections. In: *J Clin Microbiol*. 1995;33:2856-2858.
44. Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline, M47-A Vol. 27 No. 17, Replaces M47-P, Vol. 26, No. 31, In: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
45. Qian Q., Eichelberger K., Kirby J.E. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by use of the direct tube coagulase test. In: *JClinMicrobiol* 2007;45:2267-9.
46. Richter S.S., Beekman S.E., Croco J.L. et al. Minimizing the workup of blood culture contaminants: implementation and evaluation of a laboratory-based algorithm. In: *J Clin Microbiol*. 2002;40:2437-2444.
47. Richter S.S., Beekmann S.E., Croco J.L. et al. Minimizing the workup of blood culture contaminants: implementation and evaluation of a laboratory-based algorithm. In: *J Clin Microbiol*. 2002;40:2437-2444.

48. Roberts G.D., Washington J.A. Detection of fungi in blood cultures. In: *J Clin Microbiol.* 1975;1:309-310.
49. Ronnberg C., Mildh M., Ullberg M. et al. Transport time for blood culture bottles: underlying factors and its consequences. In: *DiagnMicrobiolInfectDis* 2013;76:286-90.
50. Rowe A.T., June M.M. Sepsis in Older Adults. In: *Infect Dis Clin North Am.* 2017 Dec;31(4):731-742, doi: 10.1016/j.idc.2017.07.010.
51. Rowther F.B., Rodrigues C.S., Deshmukh M.S. et al. Prospective comparison of eubacterial PCR and measurement of procalcitonin levels with blood culture for diagnosing epticemia in intensive care unit patients. In: *JClinMicrobiol* 2009;47:2964-9.
52. Ruiz-Aragón J., Ballesterro-Téllez M., Gutiérrez-Gutiérrez B. Direct Bacterial Identification From Positive Blood Cultures Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2018 Oct;36(8):484-492.
53. Saito T., Iinuma Y., Takakura S. 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. In: *JInfectChemother* 2009;15:49-53.
54. Seegmuller I., Eschenbach U., Kamereck K., Miethke T. Sensitivity of the BacT/ALERT FA medium for detection of *Pseudomonas aeruginosa* in pre-incubated blood cultures and its temperature-dependence. In: *JMedMicrobiol* 2004;53:869-74.
55. Singer M., Deutschman C.S. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). 2016 Feb 23;315(8):801-10. doi:10.1001/jama.2016.0287.
56. Stockman L., Roberts G.D., Ilstrup D.M. Effect of storage of the DuPont lysis-centrifugation system on recovery of bacteria and fungi in a prospective clinical trial. In: *J Clin Microbiol.* 1984;19:283-285.
57. Sullivan K.V., Turner N.N., Roundtree S.S. et al. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) using the KeyPath MRSA/MSSA blood culture test and the BacT/ALERT system in a pediatric population. In: *ArchPatholLab Med* 2013;137:1103-5.
58. Tenney J.H., Reller B., Mirrett S. et al. Controlled evaluation of the volume of blood cultured in detection of bacteremia and fungemia. In: *J Clin Microbiol.* 1982;15:558-5.
59. UK Standards for Microbiology Investigations Investigation of blood cultures (for organisms other than *Mycobacterium* species). In: *Bacteriology*, B 37, Issue no: 8.2, Issue date: 05.09.19.
60. van der Velden L.B., Vos F.J., Mouton J.W. et al. Clinical impact of preincubation of blood cultures at 37 degrees C. In: *JClinMicrobiol* 2011;49:275-80.
61. Viganò E.F., Vasconi E., Agrappi C. et al. Use of simulated blood cultures for time to detection comparison between BacT/ALERT and BACTEC 9240 blood culture systems. In: *DiagnMicrobiol Infect Dis* 2002;44:235-40.
62. Washington J.A. Collection, transport and processing of blood cultures. In: *Clin Lab Med.* 1994;14:59-6.

63. Weinstein M.P. Blood Culture Contamination: Persisting Problems and Partial Progress. In: *J Clin Microbiol.* 2003;41:2275-2278.
64. Weinstein M.P., Reller L.B., Murphy J.R. et al. The clinical significance of positive blood cultures; a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. In: *Rev Infect Dis.* 1983;5:35-5
65. Weinstein M.P., Towns M.L., Quartey S.M. 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. In: *Clin Infect Dis* 1997;24:584-602.
66. Weinstein M.P., Towns M.L., Quartey S.M., 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. In: *Clin Infect Dis.* 1997;24:584-602
67. Wilson M.L. Blood cultures: introduction. In: *Clin Lab Med.* 1994;14:1-7.
68. Wilson M.L., Mirrett S., Reller L.B. et al. Recovery of clinically important microorganisms from the BacT/Alert blood culture system does not require testing for 7 days. In: *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1993;16:31-34.
69. Yagupsky P., Peled N., Press J. et al. Comparison of BACTEC 9240 Peds Plus medium and isolator 1.5 microbial tube for detection of *Brucella melitensis* from blood cultures. In: *J Clin Microbiol* 1997;35:1382-4.
70. Ziegler R., Johnscher I., Martus P. et al. Controlled clinical laboratory comparison of two supplemented aerobic and anaerobic media used in automated blood culture systems to detect bloodstream infections. In: *J Clin Microbiol* 1998;36:657-61.
71. Ziegler R., Johnscher I., Martus P. et al. Controlled Clinical Laboratory Comparison of Two Supplemented Aerobic and Anaerobic Media Used in Automated Blood Culture Systems to Detect Bloodstream Infections. In: *J Clin Microbiol.* 1998;36:657-661.
72. <https://www.cdc.gov/sepsis/what-is-sepsis.html> [accesat la 09.12.2019].
73. <https://www.global-sepsis-alliance.org/> [accesat la 06.02.2020].
74. <https://www.worldsepsisday.org/sepsis> [accesat la 10.03.2020].

