



EMOCOLTURA

Dott.ssa Maria Rita Rossi

Laboratorio Unico Provinciale
U.O. Microbiologia

Emocoltura:

Test di laboratorio nel quale il sangue raccolto dal paziente è inoculato in flaconi contenenti terreno di coltura che consente la crescita e la rilevazione di microrganismi causa di infezioni.

OBIETTIVI EMOCOLTURA

- Confermare l'eziologia dell'infezione
- Identificare l'agente eziologico
- Guidare l'antibioticoterapia





EMOCOLTURA

Quali flaconi utilizzare?

Per ciascun prelievo inoculare 2 flaconi uno per aerobi e uno per anaerobi. Per i bambini sono disponibili flaconi pediatrici.

I flaconi BacT/ALERT in uso sono addizionati di resine per catturare eventuali antibiotici.

La diluizione del campione (10 ml in 30-40 ml di brodo) diluisce l'antibiotico ev. presente



Composizione brodo di coltura

Il terreno di coltura presente in tutte le tre tipologie di flacone è la stessa :

- Peptone di soia;
- Estratto di cuore o cervello;
- Menadione (Vitamina K3);
- Emina (Fattore X);
- Aminoacidi;
- Piridoxina cloridrato;
- Anticoagulante Sodio-Polianetol-Solfonato (SPS);
- Carbone attivato, molecola adsorbente in grado di consentire il recupero di microrganismi anche in campioni ematici ottenuti da pazienti in terapia antibiotica. Adsorbe anche componenti del sangue (complemento, lisozima, gamma-globuline e transferrina) che possono interferire o limitare la crescita batterica.



I flaconi si differenziano per :

- L'atmosfera: nel flacone anaerobio è costituita da Azoto sotto vuoto;
- Quantità di brodo presente: FA= 30ml, FN=40ml e PF=10ml.

Tali quantità sono stabilite sulla conoscenza che un'emocoltura, perché diventi positiva, deve contenere almeno 3 unità formanti colonia (Ufc) per ml.

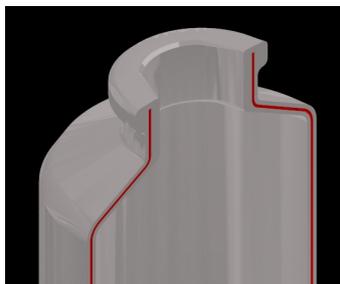
Nei pazienti batteriemici la concentrazione per ml di sangue è di norma 0,1-1 Ufc/ml, il recupero di batteri dal sangue aumenta del 3% per ogni ml di campione raccolto, quindi negli adulti sono necessari 10 ml per flacone, mentre sono sufficienti 1-2ml nel flacone pediatrico, per la più alta carica riscontrabile nelle batteriemie di neonati e infanti.

Inoltre è necessario rispettare tali quantità di inoculo per evitare il rilevamento di falsi-positivi, specialmente per quanto riguarda i batteri anaerobi, poiché i leucociti presenti nel sangue producono una quantità di CO₂ sufficiente a indicare positività nella coltura .



Tutti i flaconi Bact/ALERT sono formati da un triplo strato di policarbonato con una membrana di nylon interna.

Tale caratteristica rende i flaconi per emocoltura più sicuri in grado di garantire la sicurezza del personale.





FLACONI BACT/ALLERT E LIQUIDI BIOLOGICI

I flaconi BacT/ALERT® possono essere utilizzati per valutare la presenza di microorganismi nel sangue e in tutti i fluidi biologici (es. liquor, liquido pleurico, liquido ascitico, liquido pericardico etc.) fatta eccezione per le urine.

I flaconi BacT/ALERT® hanno ottenuto l'autorizzazione ufficiale (510(k) notification) dalla FDA (Food and Drug Administration) Americana e marcati CE per l'utilizzo nello screening di fluidi biologici.



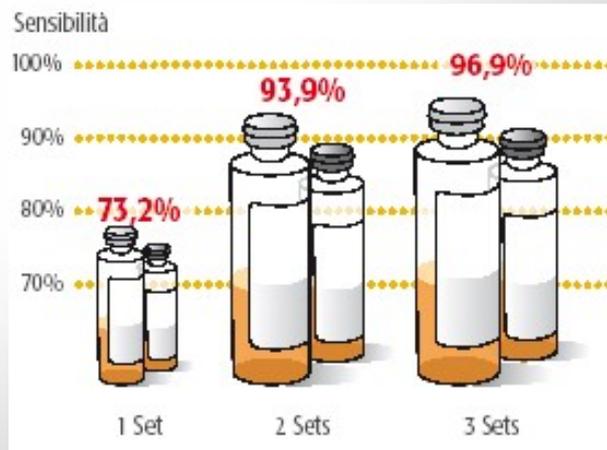
EMOCOLTURA

Quanti prelievi effettuare e perché?

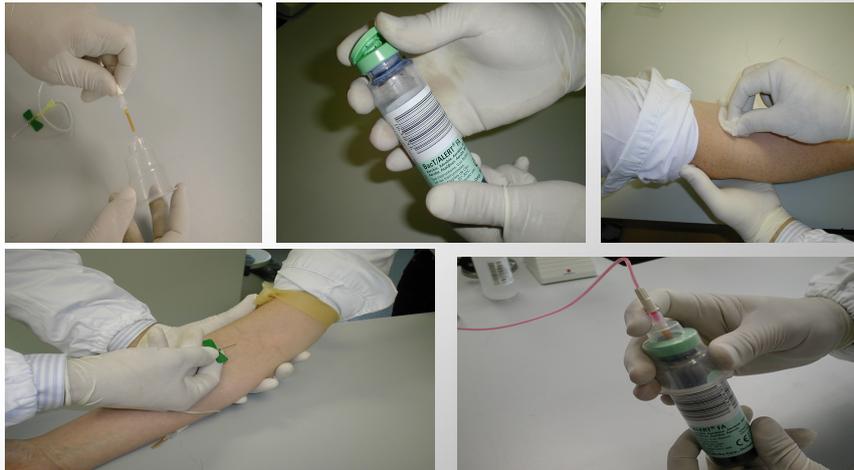
- **Eseguire 2 massimo 3 prelievi** nell'arco di 30-60 minuti (se necessario in rapida successione purché da punti diversi)
- Tre prelievi ottimizzano la sensibilità dell'esame (96-99%)
- Tre prelievi facilitano l'interpretazione dei risultati nel caso di isolamento di germi di dubbio significato: **patogeno o contaminante?**
- Mai effettuare un solo prelievo nell'adulto: lo scarso volume di sangue analizzato potrebbe dar luogo a falso negativo e in caso di positività è di difficile interpretazione: **patogeno o contaminante?**



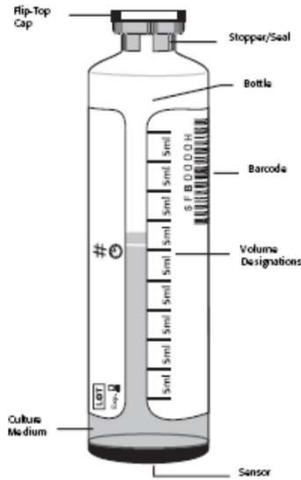
TRE PRELIEVI OTTIMIZZANO LA **SENSIBILITA'** DELL'ESAME



EMOCOLTURA Modalità di prelievo



L'attendibilità del risultato deriva dall'accuratezza del prelievo
Doc 287 AZ Indagini microbiologiche e sierologiche: indicazioni per il prelievo, la conservazione e l'invio dei campioni



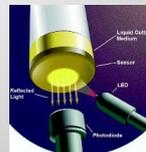
IMPORTANTE!

Segnare il livello appropriato sul flacone per il volume corretto di sangue da prelevare

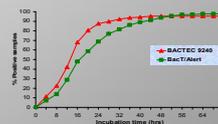
- 10 ml di sangue FA/FN
- 1-4 ml di sangue FP

EMOCOLTURA Conservazione del campione

- Mantenere i flaconi a temperatura ambiente
- Consegnare possibilmente entro 2 ore; è possibile consegnare in qualsiasi momento al laboratorio emocolture accettate come routine
- La data di accettazione deve essere quella del giorno in cui viene consegnato il prelievo, anche se festivo
- Non appena i campioni arrivano in laboratorio vengono alloggiati nel sistema analitico che inizia il monitoraggio della crescita batterica



Se il flacone non viene caricato precocemente potrebbe verificarsi una mancata positivizzazione perché la crescita batterica ha già raggiunto il plateau





BacT/ALERT 3D

Descrizione dello strumento



Il sistema di incubazione BacT/ALERT 3D è di tipo modulare. Il modulo di controllo utilizza un disegno a cassette e consente l'incubazione di 240 flaconi per modulo, suddivisi in quattro cassette, contenenti ciascuno 60 celle di incubazione in tre blocchi da venti celle.

Possono essere abbinati fino a 6 moduli.

Il monitoraggio dei flaconi in incubazione è continuo, le letture vengono eseguite ogni 10 minuti fino alla formulazione del risultato.

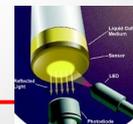
Al momento della sua installazione, tutte le celle del modulo di incubazione vengono "calibrate" per creare una curva di calibrazione di riferimento per gli algoritmi di analisi delle letture dei flaconi.

Il Bact/Alert 3D è interfacciato bidirezionalmente al sistema informatico del laboratorio.

Peculiarità dello strumento è la possibilità di caricamento anche al di fuori degli orari di servizio del laboratorio. Il caricamento può essere eseguito anche da personale non qualificato, inserendo semplicemente i flaconi nelle celle disponibili. Successivamente sarà compito del T.S.L.B. associare al flacone i dati anagrafici relativi al paziente e al tipo di flacone.



Principio di rilevamento



In caso di crescita batterica, l'aumento della concentrazione di CO₂ disciolta nel brodo di coltura, provoca un abbassamento del pH a cui segue un cambiamento di colore dell'indicatore contenuto all'interno del sensore.

A differenza di altri tipi di sensori fluorescenti, il sensore colorimetrico BacT/ALERT 3D non è influenzato dalla luce e garantisce una maggiore affidabilità dei risultati, ciò soprattutto nei casi di introduzione ritardata del flacone.

Una volta introdotti nella cella di incubazione, i flaconi sono monitorati continuamente, 24ore su 24, per la creazione della curva di crescita. Durante la lettura un led, situato sul fondo di ogni cella di incubazione, emette un fascio di luce diretto verso il sensore colorimetrico. La quantità di luce riflessa dal sensore viene rilevata da un riflettometro che trasmetterà la lettura al computer gestionale per l'analisi algoritmica, in base alla quale verrà discriminato il campione in positivo o negativo.

Il software di gestione, mediante l'utilizzo di sofisticati algoritmi, è anche in grado di distinguere tra la CO₂ prodotta dai microrganismi e quella generata dal campione ematico in analisi (processi catabolici del sangue e attività residua dei globuli bianchi).



EMOCOLTURA

Tempi di incubazione:

Con i sistemi automatici i flaconi vengono incubati a 35°C per 5 giorni

Non è necessario protrarre l'incubazione nel sospetto di endocardite o

Brucellosi **se vengono rispettati il n° di campioni e il volume di sangue**

Tempo medio di positivizzazione:

Sistemi automatizzati

- 57% = 12 ore
- 82% = 24 ore
- 95-97% entro tre - quattro giorni anche per germi tradizionalmente ritenuti difficili: *Brucella*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter* o *HACEK* (Haemophilus, Actinobacillus, Cardiobacterium, Eikenella, Kingella)



PROCEDURE in CASO di POSITIVITA' Esame microscopico



Da ogni flacone positivo viene effettuato un esame microscopico per confermare la presenza di batteri o miceti, il risultato viene prontamente referato in attesa di identificazione biochimica ed antibiogramma

E' possibile avere informazioni telefoniche preliminari sull'andamento delle colture e referto scritto del microscopico eseguito su campioni positivi

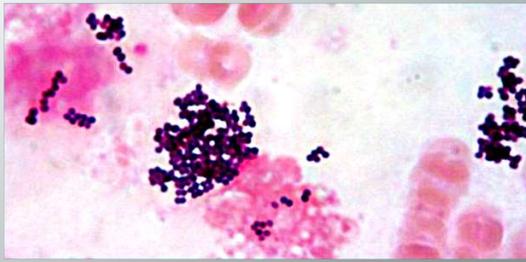
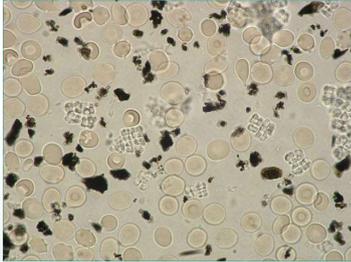
Laboratorio di Microbiologia
Tel 236.427





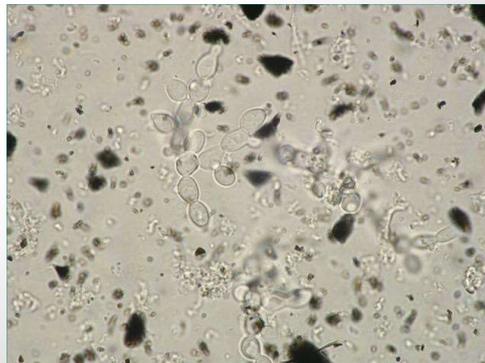
Emocoltura: referto **preliminare** scritto in caso di positività

Esame	Esito	U.M.	Intervalli Riferimento
SANGUE V.CENTRALE Esame microscopico GRAM :	Flaconi aerobio ed anaerobio POSITIVI , referto preliminare. Seguiranno identificazione ed antibiogramma. Presenza di Cocchi Gram positivi		
SANGUE V.PERIFERICA Esame microscopico GRAM :	Flaconi aerobio ed anaerobio POSITIVI , referto preliminare. Seguiranno identificazione ed antibiogramma. Presenza di Cocchi Gram positivi		



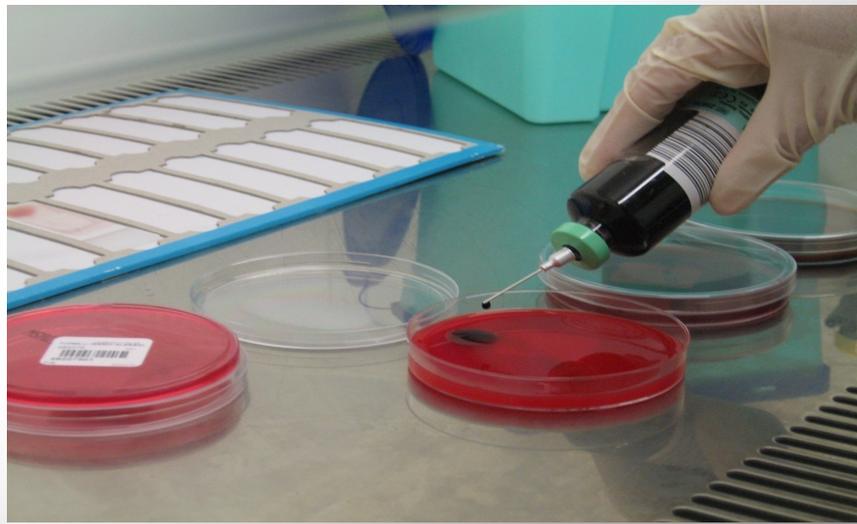
Emocoltura: referto **preliminare** scritto in caso di positività

Esame	Esito	U.M.	Intervalli Riferimento
SANGUE V.PERIFERICA Esame microscopico GRAM :	Flacone aerobio POSITIVO , referto preliminare. Seguiranno identificazione ed antibiogramma. Presenza di: FLORA MICOTICA		

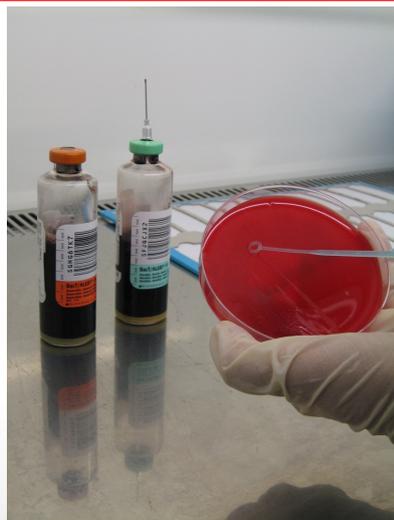




Sub coltura delle emocolture positive



Sub coltura delle emocolture positive

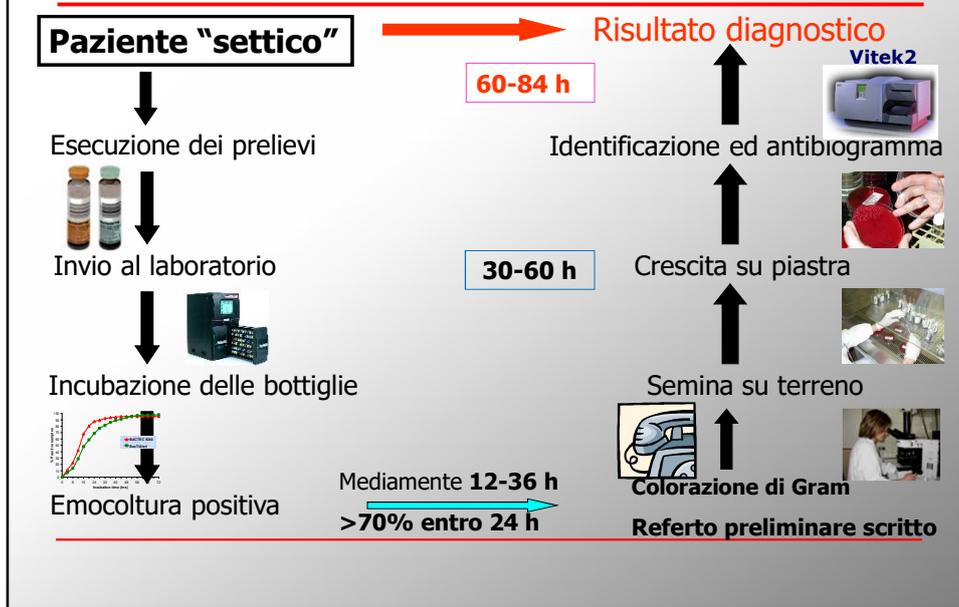


Identificazione e
antibiogramma
sulle colonie isolate

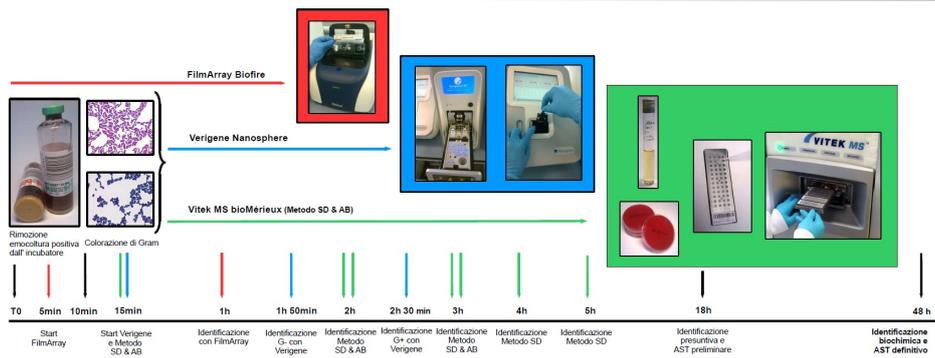




Emocolture: diagramma di flusso



Riduzione del TAT legata alla utilizzazione delle nuove metodiche



Cellini A., Damiano R., Casadei P., Colasurdo A., Rustignoli G., Pedna M.F., Sambri V.
 U.O. Microbiologia, Centro Servizi Laboratorio Unico Area Vasta Romagna, P.le
 Liberazione 60 Pievesestina di Cesena 47522 (FC) AMCLI 2014