

## 1 INFEZIONI DEL TORRENTE CIRCOLATORIO

File: Emo\_090119.doc (da file: Emo\_AG\_081016 rev 1.doc)

Ultima revisione Emo MR 09/03/09

### 1. SCOPO DEL DOCUMENTO

Questo documento descrive le procedure e le indagini per la diagnosi microbiologica (emocoltura) delle infezioni del torrente sanguigno (Blood Stream Infections: BSI) sostenute da batteri (esclusi i micobatteri) e da funghi.

Parte dal presupposto che l'emocoltura può contribuire in modo ottimale alla gestione del paziente con BSI solo se sono coinvolti clinici e microbiologi, definendo ed applicando un percorso ottimale che inizia con la formulazione di un sospetto clinico e la decisione di effettuare l'esame, passando attraverso un corretto e ben definito approccio metodologico di laboratorio, per concludersi con le decisioni terapeutiche fondate sui risultati dell'emocoltura.

### 2. INTRODUZIONE

L'emocoltura, per ricerca di batteri o miceti nel sangue, costituisce un importante contributo del microbiologo alla gestione dei malati con sepsi, endocardite, infezioni correlate a cateteri endovascolari (Catheter Related Blood Stream Infection CRBSI), con febbre di origine ignota, ovvero con infezioni localizzate quali: la polmonite, l'artrite settica.

La presenza di microrganismi nel sangue può avere carattere transitorio (presenza di microrganismi per un breve periodo, ad esempio a seguito di estrazioni dentarie, cateterizzazione urinaria, manovre strumentali invasive), intermittente (o "transitoria ricorrente", associata ad infezioni localizzate o sistemiche), continua (tipica delle infezioni endovascolari, quali l'endocardite, la tromboflebite settica, le infezioni associate alla presenza di dispositivi endovascolari quali i cateteri venosi centrali-CVC).

L'isolamento di batteri o funghi dal sangue ha un importante valore diagnostico (conferma del sospetto clinico), prognostico e per la terapia (mirata sulla base dell'identità del microrganismo e dell'antibiogramma) e la letteratura internazionale è ormai concorde nell'attribuirgli lo stesso valore diagnostico di un esito microbiologico di un campione di liquor.

I tempi dell'emocoltura sono lunghi, rispetto alle esigenze cliniche. Una buona organizzazione del laboratorio, insieme ad alcuni accorgimenti di ordine tecnico-metodologico possono contribuire a ridurre i tempi di esecuzione e di trasmissione di risultati al clinico, ancorché preliminari (come l'esame microscopico su flacone positivo e/o i test "diretti")

Indagini effettuate nel nostro Paese hanno evidenziato difformità di comportamenti nelle abitudini prescrittive, nelle modalità di prelievo, nelle procedure diagnostiche microbiologiche, nell'interpretazione dei risultati nonché nella tempistica relativa alla reale fruibilità dell'esito microbiologico da parte del clinico.

Pare quindi utile proporre un "percorso diagnostico", basato sull'Evidence Medicine e sulle più recenti ed autorevoli linee guida internazionali.

Per semplicità, il testo che segue fa riferimento ai metodi per emocoltura automatizzati, largamente diffusi in Italia e nel mondo.

#### **In quali pazienti effettuare l'emocoltura ?**

In tutti i pazienti in cui ci sia anche solo il sospetto di una sepsi (ipertermia, ma in alcuni malati anche ipotermia). In molte unità operative è previsto il prelievo di routine in tutti i casi in cui la temperatura sia superiore ai 38°C. I costi dell'esame sono ampiamente giustificati dalle informazioni che si possono ricavare (conferma del sospetto diagnostico, identificazione della eziologia microbica ed indicazioni utili per la terapia antibiotica mirata).

46 **Quando effettuare l'emocoltura ?**

47 Prima di prescrivere l'antibiotico o prima di una sua nuova somministrazione (quando la quantità di  
48 antibiotico nel sangue è minima). Solo alcuni lavori hanno cercato di valutare il corretto timing per il  
49 prelievo. I dati della letteratura mostrano che all'entrata dei batteri nel circolo presenta una fase lag  
50 di circa un ora prima che appaia il brivido e/o la febbre.

51 Sebbene sia consuetudine raccogliere i campioni ad intervalli di 30-60min, la cosa è del tutto arbitraria  
52 come ha dimostrato anche Li et al (1). Soprattutto se è necessario iniziare una terapia antibiotica  
53 empirica i prelievi devono essere ravvicinati (2).Thompson (3) ha evidenziato che non ci sono variazioni  
54 significative nel tasso di positività se e quando i prelievi vengono effettuati al picco febbrile. Molti  
55 pazienti, inoltre, possono essere ipotermici anche nella fase batteriemica o sono in generale incapaci di  
56 attivare una risposta di tipo febbrile all'infezione.

57 **che La febbre da sola non è un utile indicatore, altri parametri dovrebbero essere considerati:**  
58 **ipotensione, numero dei globuli bianchi, la presenza/assenza di brivido, marcatori biologici (PCR,**  
59 **PCT ecc). Quindi importante è più che stabilire il corretto timing di prelievo è al contrario**  
60 **assicurarsi che il prelievo sia effettuato in maniera adeguata (in termini di volume di sangue**  
61 **prelevato, di numero di prelievi eseguiti e corretta procedura di prelievo) (4)**

62 Nella pratica comune i prelievi dovrebbero essere effettuati simultaneamente (o distanziati di 5-15 min  
63 l'uno dall'altro) alla comparsa della febbre e possibilmente prima dell'inizio della terapia.

64 Nei casi di endocardite acuta valgono le stesse considerazioni (la ripetizione può essere utile per  
65 monitorare il successo terapeutico)Nelle endocarditi subacute sono consigliati tre set di emocolture in  
66 30-60 min ed in caso di negatività altri 3 set dopo 24h. (CLSI M47A; 4, 5,6 .

67 **Quanti prelievi effettuare ?**

68 Per assicurare una maggiore sensibilità è bene effettuare 2 - 3 prelievi (tenendo in considerazione che  
69 ciascun prelievo deve essere composto da un flacone per aerobi ed uno per anaerobi) quindi un totale di  
70 4-6 flaconi.

71 I 3 prelievi:

- 72 - ottimizzano la sensibilità dell'esame (possibilità di isolare il patogeno in caso di sepsi) che è di: 65-  
73 80% con un prelievo, 80-88% con due prelievi, 96-99% con tre prelievi; (7,8)
- 74 - facilitano l'interpretazione dei risultati (soprattutto nei pazienti ricoverati nelle terapie intensive)  
75 nel caso di isolamento di germi di dubbio significato clinico (patogeni o contaminanti ?).

76 **Mai effettuare un solo prelievo nell'adulto: (volume di sangue analizzato è insufficiente e potrebbe**  
77 **essere causa di risultati falsamente negativi. In caso di positività è di difficile interpretazione: il**  
78 **germe isolato è un patogeno o un contaminante ?**

79 La singola emocoltura come coltura di sorveglianza (pazienti ICU e Ematologici) viene spesso  
80 erroneamente usata per predire la sepsi, nella realtà è di scarso valore ed aumentano solo i costi

81  
82 Non ci sono indicazioni ad effettuare più di tre prelievi: la sensibilità dell'esame aumenta solo di un  
83 modesto 7%, aumentano invece i costi ed i rischi di anemizzazione iatrogena del malato. Le modalità di  
84 prelievo, conservazione e invio dei flaconi devono essere codificate in procedure scritte da  
85 trasmettere a tutti i reparti e da esplicitare nella carta dei servizi del laboratorio.

86

87 **A che distanza di tempo devono essere effettuati i prelievi ?**

88 Procedere ai prelievi in rapida successione, a distanza di 5-10 minuti.

89 Nell'endocardite, in cui si ha una batteriemia continua, è preferibile, nelle forme subacute, prelevare a  
90 distanza di 30-60" (per documentare la batteriemia continua). Trascorse le prime 24h se i primi due-  
91 tre set risultano negativi, ripetere la campionatura.

92 Nel sospetto di infezione correlata a CVC, procedere come più oltre indicato.

93 **Il prelievo arterioso aumenta la possibilità di ottenere risultati positivi ?**

94 No. Non ci sono differenze rispetto al prelievo venoso e non trova indicazione per la diagnosi di sepsi.

95 **Il prelievo può essere effettuato da CVC ?**

96 Il prelievo da CVC è fortemente sconsigliato per la facilità di contaminazione.

97 Si effettua solo nel sospetto di infezione del catetere (e in tal caso si associa al contemporaneo  
98 prelievo da vena periferica), con le modalità riportate più avanti.

99 **Che flaconi usare ?**

100 Per ogni prelievo inoculare di norma due flaconi (1 per la ricerca di aerobi e 1 per anaerobi). Il prelievo  
101 anche in flaconi per anaerobi consente la crescita di batteri anaerobi stretti, inoltre, studi recenti  
102 hanno dimostrato come siano più performanti anche nel recupero dei comuni stafilococchi, enterococchi  
103 ed enterobatteri. Per il bambino sono disponibili flaconi pediatrici (per germi aerobi) che prevedono  
104 l'immissione di ridotte quantità di sangue (nei bambini la carica batterica - numero di batteri per ml - è  
105 maggiore che nell'adulto).

106 **Quanto sangue prelevare ed immettere in ogni flacone ?**

107 **Rappresenta la variabile più importante.** Diversi studi condotti sia con sistemi automatici sia in  
108 manuale dimostrano la relazione diretta che esiste fra il volume di sangue prelevato e la resa  
109 diagnostica di una emocoltura. Si consiglia di immettere 8 ml (non superare mai i 10 ml).  
110 Complessivamente devono essere prelevati 20-30 ml, suddivisi nei diversi flaconi. Raccogliendo 2-30ml  
111 si ha un incremento proporzionale della percentuale di positività (es passando da 2 a 20ml di sangue  
112 prelevato si passa dal 30 al 50% come percentuale di positività. Mentre l'incremento che si ottiene  
113 elevando il prelievo a 40 ml (vs 30 ml) è di un modesto 7% e quindi non ritenuto utile  
114 Nei flaconi pediatrici immettere 1-4 ml (anche in relazione al peso del bambino; non più dell'4,5%  
115 dell'intero volume ematico).

116 **Il tappo di gomma dei flaconi deve essere disinfettato ?**

117 Sì, il tappo non è sterile. Dopo aver tolto il cappuccio di plastica, disinfettare con lo stesso prodotto  
118 usato per l'antisepsi della cute, lasciando agire per lo stesso tempo.

119 **Utilizzare guanti per il prelievo ?**

120 Sì. I guanti devono sempre essere indossati a protezione dell'operatore.

121 Non sono necessari guanti sterili, a meno che non sia necessario palpare due volte la cute disinfettata  
122 per l'individuazione della vena. Eventualmente disinfettare i guanti con clorexidina

123 **Occorre disinfettare la cute prima del prelievo ?**

124 **Sempre !** Identificare il sito per il prelievo, quindi:

- 125 - pulire l'area cutanea identificata, per 7-8 cm di diametro, con una garza (anche non sterile)  
126 imbevuta di alcol isopropilico 70%, procedendo dal centro alla periferia, e lasciar asciugare, (meglio  
127 se con sfregamento vigoroso, mentre non sono necessari i movimenti concentrici)
- 128 - disinfettare la cute lasciando in sede un impacco con clorexidina 2% in soluzione alcolica per almeno  
129 30"; in alternativa usare tintura di iodio, sempre per 30"; evitare l'uso di iodio-povidone (richiede  
130 tempi d'azione superiori al 1.5 min),
- 131 - lasciare asciugare l'antisettico, senza rimuoverne l'eccesso con garza. Se si usa la tintura di iodio,  
132 pulire la cute dopo il prelievo

133 La clorexidina non può essere usata nei bambini di età inferiore ai due mesi (anche se alcuni studi  
134 recenti ne suppongono l'uso a concentrazione pari allo 0.5% anziché 2%. Ma i dati sono ancora  
135 preliminari). In alternativa è possibile usare iodio-povidone (Betadine®) che dovrà però essere lasciato  
136 in sito per almeno 2 minuti e rimosso dopo il prelievo.

137 **Come si effettua il prelievo ?**

138 Procedere come di seguito indicato.

- 139 - Prelievo con siringa: ago singolo (AS)(questa modalità facilita il controllo della quantità di sangue  
140 immessa nei flaconi):
  - 141 a. strofinare le mani con soluzione alcolica o eseguire il lavaggio sociale,

- 142 b. procedere alla disinfezione della cute e del tappo del flacone, come sopra descritto,  
143 c. indossare i guanti,  
144 d. introdurre l'ago in vena, prelevare 20-30 ml e distribuirli nella misura di 3-8 ml/flacone e comunque  
145 egualmente distribuiti nei falconi aerobi/anaerobi, usando l'accortezza d'inoculare prima il flacone  
146 per anaerobi e poi quello per aerobi (questo al fine di evitare che l'ossigeno risalga attraverso l'ago  
147 e diffonda nel sangue prelevato).  
148 e. tenere i flaconi in posizione verticale per controllare la quantità di sangue,  
149 f. eliminare con attenzione gli aghi (rischio di puntura, soprattutto con la farfalla) negli appositi  
150 contenitori

151 Con set di prelievo a doppio ago DA (farfalla) per la raccolta del sangue direttamente nei flaconi (es.  
152 vacutainer®) questo dispositivo di prelievo è generalmente preferito perché riduce i rischi di puntura  
153 accidentale per l'operatore, anche se non riduce quello di una possibile contaminazione nel prelievo,  
154 infatti la percentuale di contaminazione con il dispositivo a DA è del 3.7% contro il 2% dell'ago singolo:

- 155 a. strofinare le mani con soluzione alcolica o eseguire il lavaggio sociale,  
156 b. procedere alla disinfezione della cute e del tappo del flacone, come sopra descritto,  
157 c. indossare i guanti,  
158 d. inserire l'ago in vena e collegare il set di prelievo prima al flacone per aerobi, poi al flacone per  
159 anaerobi  
160 e. tenere i flaconi in posizione verticale per controllare la quantità di sangue immesso ed evitare un  
161 possibile reflusso del brodo o un volume eccessivo d'inoculazione. Usare l'accortezza di inoculare  
162 prima il flacone di aerobi e poi quello per anaerobi. La successione "flacone aerobio o anaerobio" è  
163 diversa nelle due modalità ed è finalizzata ad evitare l'immissione di aria nel flacone per anaerobi (i  
164 batteri anaerobi muoiono in presenza di ossigeno), in questo caso si deve lasciare fluire eventuale  
165 aria residua presente nel tubicino all'interno del flacone aerobio, prima d'inoculare quello per  
166 anaerobi.  
167 f. staccare il flacone dal connettore prima di togliere l'ago dalla vena.  
168 g. eliminare con attenzione il set di prelievo (rischio di puntura, soprattutto con la farfalla)

169 E' preferibile il prelievo con siringa: facilita il prelievo di una corretta quantità di sangue ed evita un  
170 possibile reflusso del brodo in vena.

171 Non esistono in commercio flaconi sottovuoto capaci di raccogliere una quantità definita di sangue;  
172 quindi la quantità immessa deve essere controllata dall'operatore.

173 Se il prelievo venoso è effettuato anche per raccogliere sangue per altre determinazioni, i flaconi per  
174 emocoltura devono essere inoculati per primi onde evitare contaminazioni.

#### 175 **E' opportuno cambiare ago prima di inoculare il sangue nei flaconi ?**

176 Mancano dati definitivi. Sembra che il cambio dell'ago riduca la quota di contaminazione, a fronte però  
177 di un maggior rischio di punture accidentali.

#### 178 **Si possono effettuare tutti i prelievi da un ago-cannula ?**

179 Solo se posizionata al momento allo scopo di eseguire emocolture, per la difficoltà a reperire il  
180 successivo accesso venoso. Non utilizzare un ago-cannula già in uso.

#### 181 **Quali le modalità di prelievo nel paziente con CVC, in cui si sospetti (o non si possa escludere) una 182 sepsi catetere-correlata ?**

183 In questo caso è indispensabile effettuare il prelievo:

- 184 a. da vena periferica e dal/i catetere/i, contemporaneamente, dopo aver disinfettato il raccordo con  
185 soluzione alcolica, se compatibile con il materiale del CVC, senza scartare la prima quantità di  
186 sangue prelevato perché è quella con la più alta concentrazione di microbi. Per ciascun prelievo  
187 utilizzare il solo flacone per aerobi in quanto le infezioni da catetere sono sostenute da aerobi.  
188 b. Immettere una stessa quantità di sangue in ciascun flacone (n° di tacche riportate sull'etichetta):  
189 ciò consentirà l'interpretazione dei risultati sulla base dei tempi di crescita.  
190 c. da vena periferica, un prelievo (set: aerobi + anaerobi), prelevato come di consueto

191 d. eventualmente un terzo prelievo con le modalità indicate al punto a o b.

192 **Come identificare i flaconi ?**

193 Secondo le modalità in uso nell'Azienda Ospedaliera. La Microbiologia deve essere in grado di  
194 riconoscere i diversi flaconi (sede e momento del prelievo)

195 **Come conservare e inviare i flaconi alla Microbiologia ?**

196 I flaconi, mantenuti a temperatura ambiente, dovrebbero pervenire alla Microbiologia entro le due ore  
197 dal prelievo ed essere immediatamente alloggiati negli appositi incubatori( CLSI) (in caso contrario  
198 potrebbe verificarsi una mancata positivizzazione (la crescita microbica potrebbe aver già raggiunto il  
199 plateau non essendo più rilevabile dai sistemi di detection dei sistemi automatizzati, ovvero ci potrebbe  
200 essere sofferenza microbica con la conseguente mancata crescita dei microrganismi). Preferire la  
201 conservazione a temperatura ambiente per un tempo massimo di 16-18h. Non refrigerare i flaconi

202 **L'emocoltura deve essere ripetuta nei giorni successivi ?**

203 No. Non ci sono indicazioni per il prelievo nei giorni successivi per il follow up, perché quest'ultimo si  
204 basa sui dati clinici.

205 Ci sono due eccezioni:

- 206 - l'endocardite (la persistenza dell'infezione può richiedere una modifica della terapia)
- 207 - le sepsi da *S. aureus* in cui il prelievo dopo 2 e 4 giorni può fornire utili indicazioni di complicanze  
208 infettive insorte per via ematogena (es. endocardite o osteomielite) o per estensione dell'infezione  
209 in altre sedi (tromboflebite settica, ascessi).

210 **3. INDAGINI MICROBIOLOGICHE**

211 **Scelta dei brodi per emocoltura**

212 Sono disponibili in commercio numerosi tipi di brodo, tutti con accettabili performance. La formulazione  
213 di base più diffusa è l'idrolisato di caseina di soia, a seguire il BHI, Columbia base, Brucella Broth.  
214 Contengono in genere anticoagulanti (es SPS), in grado di neutralizzare l'effetto del lisozima, inibire la  
215 fagocitosi, inattivare gli aminoglicosidi, ed in inibire, in parte la cascata del complemento.

216 Alcuni produttori forniscono, soprattutto per le formulazioni a base di soia, dei supplementi per  
217 facilitare la crescita dei germi "difficili" (quali: NAD e Emina)

218 Non esistono evidenze che supportino l'uso di terreni specifici e/ di flaconi dedicati alla la coltura dei  
219 miceti (9,10). L'uso di terreni contenenti inibitori degli antibiotici (es. resine o carbone) è dibattuto:  
220 rispetto ai corrispondenti brodi senza inibitori sembrano supportare meglio la crescita di stafilococchi  
221 (inclusi i contaminanti) e miceti.

222 **Modalità e tempi di incubazione**

223 Con i sistemi automatici, i flaconi vengono incubati a 35°C per 5 giorni (7 giorni i metodi manuali). Il 95-  
224 97% dei microrganismi cresce entro tre-quattro giorni di incubazione, anche per germi tradizionalmente  
225 ritenuti difficili: *Brucella*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter*, o HACEK.

226 E' raccomandata l'ispezione visiva al ricevimento dei flaconi pre-incubati per evidenziare una eventuale  
227 crescita microbica.

228 Non è necessario (diversamente a quanto in uso negli ultimi anni) prolungare l'incubazione nel sospetto  
229 di endocardite o di brucellosi.

230 **Rilievo della positività**

231 I sistemi automatici provvedono alla lettura ogni 10-24 minuti, segnalando eventuali flaconi positivi. Non  
232 è necessario procedere a sottocolture cieche.

233 Il microbiologo deve rilevare dallo strumento le positività più volte durante l'arco della giornata.

234

235 In caso di positività dell'emocoltura il microbiologo procede a:

- 236 - Esecuzione del Gram (in caso di negatività può essere utile la colorazione con arancio di acridina o  
237 un Gram usando come colorante di contrasto la carbofucsina) o più semplicemente con blue di  
238 metilene per evidenziare i batteri che hanno perso le affinità tintoriali. I risultati vengono  
239 trasmessi immediatamente al medico curante, per telefono e/o via fax e/o altra modalità rapida(  
240 telematica)
- 241 - Il referto riporta la positività dell'emocoltura e i caratteri morfologico-tintoriali dei microrganismi  
242 distinguendoli in: Stafilococchi e Streptococchi/Enterococchi, Cocchi Gram negativi, Bacilli Gram  
243 negativi, preferire alla definizione generica "difteroidi" con quella più specifica di "Bacilli Gram-  
244 positivi o Bacilli Gram-positivi pleomorfi"
- 245 - (a volte è possibile distinguerli in *Bacteroides/Haemophilus*, Enterobatteri, *Pseudomonas*), Bacilli  
246 Gram positivi, Miceti.

#### 247 **Sub-coltura delle Emocolture Positive**

248 -Tutte le emocolture positive devono essere sub-colturate su un set appropriato di terreni di coltura  
249 es: Trypticase Soy Agar + 5% sangue di montone o Agar Cioccolato (terreni in grado di assicurare la  
250 crescita dei germi anche più esigenti). Le sottocolture è bene che siano incubate in aerobiosi ed  
251 anaerobiosi e agar cioccolato in CO<sub>2</sub>. Sta a ciascuna Microbiologia decidere se seminare anche altri  
252 terreni per una più rapida identificazione dopo 24 ore di incubazione (es. agar lattosato per Gram  
253 negativi o terreno selettivo differenziale per Stafilococchi) o sulla base del risultato dell'esame  
254 microscopico.  
255

#### 256 **Test di identificazione diretti.**

257 Anticipano anche di 24 ore o più i risultati definitivi. Non esistono metodi validati o standardizzati, né  
258 indicazioni cogenti di letteratura sull'uso di test diretti. Diversi autori segnalano la possibilità di  
259 identificare i microrganismi con pannelli manuali, strumenti automatici, singoli test biochimici o metodi  
260 di biologia molecolare. Considerato il diverso significato clinico di *S. aureus* e Stafilococchi coagulasi  
261 negativi può essere utile effettuare una coagulasi rapida in provetta con lettura a 2 ore: il test è  
262 affidabile e poco costoso.

#### 263 **Antibiogramma diretto.**

264 Può essere effettuato con agar-diffusione, ma anche con sistemi automatici. Gli errori maggiori  
265 (referto errato di sensibilità) sono molto rari (< 1-2%). Gli inglesi ne raccomandano l'esecuzione su tutte  
266 le emocolture positive.  
267 L'esecuzione, o meno, dei test diretti, dovrebbe essere concordata con i clinici, definendo con loro le  
268 priorità e le indicazioni, ma soprattutto informando il clinico che trattasi di REFERTO PRELIMINARE  
269 da confermare con i tests da coltura tradizionale

#### 270 **Identificazione ed antibiogrammi definitivi**

271 Identificazione (a livello di specie, con l'eccezione degli Stafilococchi coagulasi negativi) ed  
272 antibiogrammi definitivi, sulle colonie isolate. . Deve sempre essere effettuata la MIC sui ceppi isolati.

#### 273 **Conservazione dei ceppi.**

274 E' bene conservare i ceppi:  
275 - sempre, per un breve periodo, conservando le piastre (meglio se sigillate) in frigorifero per una-due  
276 settimane (o i flaconi di emocoltura positivi).  
277 - Preferire, quando possibile, la conservazione a lungo, mediante congelamento a -20° o -80°c o altre  
278 modalità, degli isolati .

#### 279 **Risultati microbiologici di dubbia interpretazione**

280 1)Differenziare un contaminante da un reale patogeno in alcuni casi può rappresentare una vera sfida  
281 Si stima che la quota "non evitabile" di falsi positivi sia attorno al 2% (prevalentemente costituita da  
282 *CONS, Bacillus, Corynebacterium, Propionibacterium, Micrococcus*, streptococchi viridanti, *Aerococcus*

283 ecc. In questi casi soprattutto quando si isola un CONS in un paziente con CV è impossibile sulla base  
284 di una sola emocoltura (un solo prelievo) confermare la contaminazione o sospettare batteriemia  
285 catetere correlata.

286 2) Segnale di positività con striscio positivo al Gram e sottocoltura negativa. Sono stati osservati con  
287 specie di *Abiotrophia* spp (variante nutrizionale degli streptococchi), *S. pneumoniae* che hanno subito un  
288 certo grado di autolisi, e microrganismi esigenti che non sono in grado di svilupparsi sui terreni di  
289 coltura usati di routine. Si deve considerare l'utilizzo di terreni addizionali od arricchiti, incubazioni  
290 prolungate od atmosfere alternative per la crescita, considerando la loro morfologia al microscopio e le  
291 indicazioni cliniche

292 3) Segnale di positività, Gram e sottocoltura negativi. Verificare la curva di crescita dei sistemi  
293 automatici per escludere la possibilità di una sub-coltura falsamente negativa prima di ritenere il  
294 segnale falsamente positivo. I motivi della falsa positività sono spesso di tipo multifattoriale.

295 4) Segnale negativo con Gram e sottocoltura positiva. Microrganismi possono essere presenti nei brodi  
296 ma manifestare segnali di crescita minimi o assenti. Questa evenienza può presentarsi, ad esempio, nel  
297 caso di *Brucella* spp, *Francisella* spp, *Campylobacter* spp o *Legionella* spp, *Cryptococcus* e *Candida*  
298 *glabrata* quando si effettuino sottocolture cieche sulla base del sospetto clinico.

#### 299 **Biosicurezza**

300 Microrganismi cresciuti nei flaconi di emocolture e/o nelle sottocolture possono causare infezioni al  
301 personale di laboratorio a seguito di punture accidentali, o per contatto con la cute e le mucose, per  
302 aerosol.

303 E' importante ricordare, anche se non entriamo nel merito degli aspetti organizzativi, strutturali, della  
304 necessità di disporre di strumentazione adeguata e di cappe a flusso laminare, nonché di dispositivi di  
305 protezione individuale, previsti dalle ex L626 ora testo unico DL 81/2008.

306 Va sottolineato che le emocolture possono essere processate solo nelle microbiologie che possano  
307 assicurare la protezione della salute dei lavoratori e personale adeguatamente formato.

#### 308 **4. REFERTO ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

309 I risultati dell'emocoltura, positiva o negativa, possono avere un impatto importante nella cura del  
310 malato (critical values). Devono quindi essere comunicati al clinico tempestivamente, man mano si  
311 rendono disponibili, tenendo traccia della produzione / invio.

312 I meccanismi di comunicazione sono ovviamente legati all'organizzazione della microbiologia. Ciò  
313 nonostante si possono fornire alcune indicazioni.

#### 314 **Stato del campione**

315 Il clinico dovrebbe poter sapere in ogni momento se:

- 316 - È stata prescritta l'esecuzione dell'emocoltura
- 317 - Se il prelievo è stato eseguito
- 318 - Se il campione è pervenuto alla microbiologia (se si con quale tempistica, delta fra ora di  
319 prelievo e ora check in)
- 320 - Se sono state richieste indagini particolari
- 321 - Se c'è stata crescita di batteri/funghi
- 322 - Quali risultati sono disponibili (preliminari o definitivi)

323 Alcune microbiologi forniscono quotidianamente una risposta (es. "negativo a 24 ore", "negativo a 48  
324 ore", "indagine in corso, nessun risultato al momento")

#### 325 **Referti preliminari**

- 326 - Al primo riscontro di positività, dovrebbero essere tempestivamente (entro 60') comunicati al  
327 clinico i risultati del Gram.
- 328 - Le modalità di comunicazione, a voce e/o per scritto, devono essere concordate con i clinici per  
329 assicurare una comunicazione rapida ed accurata e la ricezione da parte del clinico, ma

330 soprattutto secondo modalità che consentano la tracciabilità degli evinti e in conformità alla  
331 norma UNI EN ISO 9001.

- 332 - Referti preliminari (identificazione o antibiogrammi diretti) devono essere trasmessi per via  
333 cartacea o elettronica (in entrambi i casi il referto preliminare deve poter essere facilmente  
334 identificato come preliminare rispetto al definitivo).
- 335 - Il referto finale deve riportare l'identificazione e l'antibiogramma definitivo dell'/degli  
336 isolato/i. Deve indicare chiaramente eventuali dati discordanti con i risultati preliminari,  
337 specificando che i dati finali rappresentano il dato corretto.

### 338 **Contaminanti**

339 I microrganismi isolati da emocoltura possono non avere un ruolo eziologico, ma di contaminazione. La  
340 contaminazione, anche nelle migliori casistiche, non scende al di sotto del 2% (11).

341 La microbiologia può contribuire a ridurre la contaminazione delle emocolture, diffondendo indicazioni  
342 sulle corrette modalità di raccolta (prassi già molto diffusa negli Ospedali italiani), promuovendone  
343 l'applicazione e verificandone il rispetto.

344 Microrganismi contaminanti (quali: *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp, *Propionibacterium* spp,  
345 Stafilococchi coagulasi negativi, *Aerococcus* spp, *Micrococcus* spp) possono però in particolari  
346 situazioni assumere il ruolo di veri patogeni.

347 La microbiologia dovrebbe:

- 348 - Dotarsi di un algoritmo interpretativo per riconoscere i contaminanti e valutare periodicamente i  
349 tassi di contaminazione<sup>[U1]</sup>.
- 350 - Ridurre al minimo l'identificazione dei contaminanti dovrebbe (es. per bacilli Gram positivi escludere  
351 *Listeria* spp, *Bacillus anthracis*,, tenendo presente lo stato immunitario del paziente.
- 352 - Non effettuare l'antibiogramma sui contaminanti oppure effettuarlo senza però riportare i risultati  
353 nel referto a meno che non sia presente in almeno di set di emocoltura.
- 354 - Conservare per alcuni giorni i contaminanti così da consentire ulteriori approfondimenti in caso di  
355 successivi isolamenti dello steso germe.
- 356 - Eseguire invece sempre identificazione di specie ed antibiogramma in caso di isolamenti multipli da  
357 uno stesso paziente
- 358 - Riportare una nota a commento del risultato sottolineando il possibile / probabile significato di  
359 contaminazione del microrganismo isolato.
- 360 - Diffondere annualmente, insieme ai dati sui patogeni, i tassi di contaminazione, suddivisi per  
361 reparto di provenienza.

## 362 **5. ENDOCARDITE**

363 L'endocardite infettiva (EI) rappresenta l'infezione delle valvole cardiache e/o di altre aree  
364 dell'endocardio.

365 Si manifesta di solito in soggetti con pre-esistenti lesioni cardiache, protesi valvolari, difetti congeniti,  
366 esiti di malattia reumatica o malattie valvolari degenerative dell'anziano. Sulla superficie endocardica  
367 danneggiata si deposita un coagulo di fibrina e piastrine che viene colonizzato da microrganismi  
368 penetrati nel torrente circolatorio, formando in tal modo delle vegetazioni infette. Sulla superficie, ma  
369 anche nella parte profonda della vegetazione, possono essere presenti microrganismi vitali, condizione  
370 che rende difficile il trattamento con antimicrobici. La diagnosi si basa sui criteri diagnostici di Duke,  
371 in cui gioca un ruolo importante la positività dell'emocoltura.

372 Nel sospetto di endocardite causata da *Staphylococcus aureus*, le emocolture devono essere eseguite il  
373 più presto possibile per evitare, data la virulenza del microrganismo, ritardi nel trattamento. Le  
374 endocarditi da *S.aureus* si possono sviluppare in corso di sepsi anche su valvole normali e possono essere  
375 una temibile causa di infezione ospedaliera.

376 Nei casi di endocardite subacuta si raccomanda il prelievo di 3 set, distanziati di almeno 30-60'. In caso  
377 di negatività può essere utile ripetere il prelievo (2 set) nella giornata successiva ed effettuare  
378 sottocolture almeno in agar cioccolato, incubando in CO<sub>2</sub> per 48-72 ore.



- 379 In caso di persistente negatività considerare:  
380 - La falsa negatività legata a precedente terapia antibiotica  
381 - l'eziologia da microrganismi non coltivabili o difficilmente coltivabili (es. *Tropheryma whippelii*,  
382 *Rickettsia* spp, *Bartonella* spp) o con specifiche esigenze colturali (es. *Abiotrophia* spp,  
383 *Granulicatella* spp)  
384 - diagnosi con procedure alternative (tecniche di concentrazione: Isolator, sierodiagnosi o tecniche  
385 molecolari)

## 386 6. BATTERIEMIE CATETERE CORRELATE

387 L'inserzione di cannule e di cateteri intravascolari (CVC), che assicurano un accesso permanente al  
388 torrente circolatorio, costituisce uno strumento sempre più utilizzato nella cura dei pazienti (per la  
389 somministrazione di liquidi o farmaci, per il monitoraggio emodinamico e l'emodialisi, ecc.).

390 Una possibile e temibile complicanza dei CVC è rappresentata dal possibile instaurarsi di una infezione  
391 (catheter-related bloodstream infection), dovuta a microrganismi che si annidano in biofilm adesi alla  
392 parete dei cateteri (colonizzazione della cannula o hub) o che colonizzano prima causando infezione  
393 poi la sede di inserzione della cannula (o exit site).

394 Nonostante la loro frequenza, le infezioni catetere correlate sono di difficile diagnosi.

395 Clinicamente si possono avere quadri molto suggestivi (infiammazione dell'exit site e febbre), ma anche  
396 quadri sfumati con assenza di infiammazione locale e segni clinici aspecifici suggestivi di sepsi.

397 Il microbiologo può contribuire alla diagnosi - senza rimuovere il CVC - (diagnosi conservativa)  
398 effettuando indagini su prelievi della cute pericaterale o sul brush endoluminale e successiva  
399 colorazione con arancio di acridina, anche se su questa ultima procedura numerosi autori sostengono  
400 che il rischio di disseminazione a distanza dei germi che hanno colonizzato il CVC post brushing è molto  
401 elevato.

402 La diagnosi di infezione catetere correlata può basarsi anche sull'uso di emocolture comparative  
403 eseguendo il prelievo contemporaneamente da CVC e da vena periferica. Ovvero dopo la rimozione del  
404 catetere (diagnosi non conservativa)- eseguendo indagini colturali della punta (non oggetto di questo  
405 documento).

406 Due i metodi diagnostici:

- 407 - la coltura quantitativa (lisi- centrifugazione, Isolator Oxoid Unipath). E' forse il metodo di  
408 riferimento, ma poco utilizzato in Italia.  
409 - la coltura con strumenti automatici, confrontando i TD da CVC e vena periferica è uno degli  
410 strumenti più agevoli a patto che i prelievi siano effettuati contemporaneamente e giungano in  
411 tempi brevi al laboratorio

412 Si pone diagnosi microbiologica di infezione CVC-correlata quando si ha l'isolamento di uno stesso  
413 microrganismo (stesso fenotipo ed antibiogramma) da entrambi i prelievi, e il campione prelevato da  
414 CVC, rispetto a quello prelevato da vena periferica,

- 415 - ha carica più elevata (> di 5 volte) (12) nella coltura quantitativa o  
416 - una crescita più rapida (120' nell'adulto, 150' nel bambino).

417 L'interpretazione dei risultati non è semplice e mira a distinguere l'infezione catetere correlata dalla  
418 contaminazione cutanea, dalla colonizzazione del catetere, da infezione in altra sede.

419

Risultati delle emocolture		Interpretazione
Isolamento di uno stesso ceppo da CVC e vena periferica	Carica o tempi di crescita significativi	Fortemente suggestivo di infezione CVC correlata, in assenza di altre fonti di infezione
	Carica o tempi di crescita non significativi	Suggestivo per /possibile infezione CVC correlata, in assenza di altre fonti di infezione
Positiva solo da		Inconclusivo per infezione CVC correlata. Possibile

CVC		colonizzazione del catetere o contaminazione durante la raccolta
Positiva solo da vena periferica		Inconclusivo per infezione CVC correlata. Suggestivo però in caso di isolamento di <i>S. aureus</i> o <i>Candida</i> spp, in assenza di altre fonti di infezione
Negativa da CVC e da vena periferica		Infezione catetere correlata: improbabile

420

421

422

423

424

425

Quando, a fronte di un forte sospetto clinico, si decida di rimuovere il catetere è importante inviare la sempre la punta del catetere alla microbiologia per indagini colturali (tecnica del roll plate di Maki o in brodo di Cleri, non oggetto di questo documento).

E' il caso di ricordare che il 75-85% dei cateteri sono rimossi senza necessità a seguito della comparsa di febbre ( 13).

426

## 7. INFEZIONI FUNGINEE

427

428

429

Sono ben documentate in pazienti politraumatizzati, con ulcerazioni gastrointestinali, con accessi vascolari, immunodepressi, specie se sottoposti a terapia antibiotica ad ampio spettro. E soprattutto se per lunghi periodi

430

431

Infezioni da funghi filamentosi non sono infrequenti in pazienti affetti da AIDS, malattie ematologiche maligne, trapianto di midollo o di organi solidi.

432

433

434

I funghi crescono in genere entro i cinque giorni di incubazione, con alcune eccezioni: tra i lieviti *C. glabrata* e *C. neoformans*, tra i funghi filamentosi *Fusarium* spp, *Scedosporium* spp *Scopulariopsis*, *Exophiala* e, benché rari in Italia, i funghi dimorfi.

435

436

437

Devono essere quindi previste e concordate con i clinici modalità di indagine diverse dai sistemi automatici. Il sangue sarà raccolto terreni bifasici (in aerobiosi, agitando nelle prime 24 ore) o in provette per lisi-centrifugazione, incubando a 27-30°C e 35-37°C fino a 4 settimane.

438

## 8. BATTERI "DIFFICILI"

439

Comprendono organismi di raro riscontro, responsabili però di infezioni anche gravi.

440

441

442

- ***Abiotrophia* e *Granulicatella***. Già noti come varianti nutrizionali di Streptococchi sono importanti responsabili di endocarditi. Possono non crescere sui comuni terreni al sangue (crescono invece su agar cioccolato)

443

444

445

446

- ***Bartonella***. Può crescere nell'emocoltura, ma lentamente. La diagnosi più frequente si ottiene con i sistemi sierologici in alternativa si ricorre ai sistemi molecolari. Tuttavia la emocoltura può essere tentata ricorrendo all'utilizzo dell'isolator e usando come terreni di coltura Columbia blood agar base, cioccolato, o il BCYE incubando a 35°C in 5-7% di CO<sub>2</sub> e mantenendo le colture per 14-21 gg

447

448

449

450

451

452

453

454

- ***Brucella***. Cresce bene nelle emocolture. Sospettarla sempre a fronte di piccoli coccobacilli gram negativi, poco colorati, al Gram. Attenzione ai rischi di infezione per gli operatori ! Bactec e BacT/ALERT si sono dimostrati in grado di evidenziare la crescita dovuta alla attività metabolica di questo microrganismo in un tempo medio di 4 giorni. Una quota minima cresce in 9 giorni (3/97 emocolture osservate). Pertanto un tempo di osservazione di 10 giorni in linea teorica consente il reperimento del 100% dei positivi. *La percentuale di recupero del microrganismo è legata al volume di sangue prelevato con un numero di set di prelievi idoneo (2-3) si analizza un volume di sangue tale da rendere sufficienti i classici 5 giorni d'incubazione.*

455

456

457

458

- ***Campylobacter***. Le specie più comuni quali *C.jejuni*, *C.lari* e *C.fetus* vengono evidenziate dai sistemi automatici nei classici 5 giorni. Le subcolture richiedono terreni come Columbia blood agar base o selettivi per *Campylobacter* incubati nelle opportune condizioni di microaerofilia per almeno 3 giorni.

- 459 - *Helicobacter* viene isolato con maggiore frequenza in episodi di batteriemia soprattutto in pazienti  
460 immunocompromessi anche per questo microrganismi che si colora al Gram con difficoltà (meglio  
461 usare la fucsina) è bene usare terreni con formulazioni specifiche, garantire oltre alla microaerofilia  
462 l'opportuna percentuale di umidità (70-80%) e mantenere le colture in osservazione per almeno 7  
463 giorni
- 464 - *Francisella*. *Francisella tularensis* cresce nelle emocolture. Difficile riconoscerla nello striscio di  
465 Gram. Cresce su agar cioccolato, non sempre su agar sangue. Attenzione ai rischi di infezione per gli  
466 operatori !
- 467 - **Gruppo HACEK**. Responsabili di endocarditi ed altre infezioni. Crescono generalmente entro cinque  
468 giorni di incubazione. A fronte di un forte sospetto di endocardite può essere utile prolungare  
469 l'incubazione o effettuare sottocolture terminali (più che prolungare i tempi dell'emocoltura  
470 ricorrere alle tecniche di lisi-centrifugazione).
- 471 - *Legionella*. Può crescere nell'emocoltura in infezioni dopo trapianto o nei rari casi di endocardite  
472 (non invece nelle più frequenti infezioni polmonari). *Legionella*: si mantiene vitale nei media  
473 contenuti nelle bottiglie impiegate dai sistemi automatizzati, ma non si replica. Per il suo isolamento  
474 sono necessari terreni specifici come BCYE brodo o si può ricorrere all'isolator con sub coltura su  
475 BCYE mantenuto in atmosfera umida e per almeno 5 giorni. Tuttavia anche con l'isolator esistono  
476 delle criticità, la carica batterica presente nel sangue diminuisce in maniera significativa già dopo  
477 soli 30 min dal prelievo fino ad arrivare ad una possibilità di recupero del microrganismo di solo il  
478 10% dopo 15h. E' consigliato l'invio di un campione di urine per il test in microimmunocromatografia
- 479 - *Leptospira*. Richiede modalità colturali specifiche, diverse dalle emocolture tradizionali. Per  
480 evidenziare questo microrganismo le emocolture devono essere ottenute necessariamente durante i  
481 primi 7 giorni di malattia (la batteriemia non si protrae oltre) Il microrganismo non sopravvive a  
482 35°C, pertanto le emocolture dovrebbero essere incubate a 30°C e facendo ricorso a terreni  
483 specifici terreno semisolido contenente albumina ed ac. Oleico (come Ellinghausen-McCullough  
484 Johnson Harris o PLM-5) mantenendo le colture in osservazione per almeno 13 settimane: Nella  
485 pratica comune si ricorre all'approccio molecolare
- 486 - *Mycoplasma*. Richiede modalità colturali specifiche (es. glucosio SP4 a pH 4.5), diverse dalle  
487 emocolture tradizionali. *Mycoplasma*: *M.hominis* (implicato in sepsi post partum) ma il reale  
488 significato clinico è ancora in discussione. Può essere coltivato con i flaconi tradizionali dei sistemi  
489 automatizzati e subcolturato su agar sangue tradizionale .
- 490 - *M.pneumoniae* può causare sepsi, ma raramente i sistemi per emocoltura ne supportano la crescita  
491 (SPS interferisce con la sua vitalità, essendo privo di parete; e manca l'arginina come fattore di  
492 crescita indispensabile al suo metabolismo). Anche il Gram tradizionale non è percorribile occorre la  
493 colorazione con A.di Acridina e subcolture su terreno di Shepard A-7 o SP4. Nella realtà si  
494 preferisce più semplicemente ricorrere alla biologia molecolare.
- 495  
496  
497  
498  
499  
500  
501

502 **Hanno partecipato alla stesura:**

503  
504 **Cosbat: ( Coordinatore)dr Rassu Mario, Direttore Laboratorio di**  
505 **Microbiologia e Virologia Ospedale San Bortolo -Vicenza)**

506 **Dott. ssa Furlan Francesca laboratorio di Microbiologia e Virologia**  
507 **Ospedale San Bortolo -Vicenza)**

508 **Dott Pier Luigi Nicoletti Direttore laboratorio di Microbiologia e**  
509 **Virologia Azienda Ospedaliera Careggi -Firenze.**

510 **Dott.ssa Carla Fontana Laboratorio di Microbiologia Clinica**  
511 **Policlinico Università Tor Vergata Roma**

512 **Dott Giorgio Mucignat Biologia Molecolare Ospedale di Pordenone**

513 **Dott Marino Scarin U.O semplice di Microbiologia Ospedale di**  
514 **Rovigo**

515 **Dott GianPietro Pellizzer Direttore Divisione Malattie Infettive**  
516 **Ospedale San Bortolo - Vicenza**

517 **Dott Piero Marone Direttore Laboratorio di Batteriologia e**  
518 **Micologia-Fondazione IRCCS San Matteo ,di Pavia .**

519 **Dott Antonio Goglio Direttore Laboratorio di Microbiologia e**  
520 **Virologia Ospedali Riuniti -Bergamo**

521

522

523 Bibliografia

524 1) Li J, Plorde J., Carlson L. Effects of volume and periodicity on blood cultures. J Clin  
525 Microbiol. 1994;32:2829-2831.

526 2) Strand CL. Blood cultures: consensus recommendations in 1988: Microbiology no. MB88-1 (MB-  
527 172). American Society for Clinical pathologists Check Sample Continuing Education  
528 Program. Chicago: American Society for Clinical Pathologists; 1988.

529 3) Thompson RB Jr, Evans BL, Southerland JL. Collecting blood for culture. Generalist  
530 Microbiology Tech Sample No. G-1. American Society of Clinical Pathologists; 1991.

531 4) Jaimes F, Arango C, Ruiz G, Cuervo J, Botero J, Vélez G, Upegui N, Machado F. Predicting  
532 bacteremia at the bedside. Clin Infect Dis. 2004 38:357-62.

533 5) Bennet IL Jr., Beeson PB. Bacteremia: a consideration of some experimental and clinical aspects.  
534 Yale J Biol Med. 1954;26:241-262.

535 6) Riedel S, Bourbeau P, Swartz B, Brecher S, Carroll KC, Stamper PD, Dunne WM, McCardle T,  
536 Walk N, Fiebelkorn K, Sewell D, Richter SS, Beekmann S, Doern GV. Timing of specimen  
537 collection for blood cultures from febrile patients with bacteremia. J Clin Microbiol. 2008  
538 46(4):1381-5.

539 7) Washington JA. Blood cultures: principles and techniques. Mayo Clin Proc. 1975;50:91-95.

540 8) Cockerill FR III, Wilson JW, Vetter EA, et al. Optimal testing parameters for blood cultures. Clin  
541 Infect Dis. 2004;38:1724-30.

542

543 9) Fuller DD, Davis TE, Denys GA, York MK. Evaluation of BACTEC Myco/F Lytic medium for  
544 recovery of mycobacteria, fungi and bacteria from blood. J Clin Microbiol. 2001;39:2933-2936.

545  
546 10) Wilson ML, Davis TE, Mirret S et al. Controlled comparison of the BACTEC high-blood-  
547 volume fungal medium, BACTEC Plus 26 aerobic blood culture bottle, and 10-milliliter Isolator  
548 blood culture system for detection of fungemia and bacteraemia. J Clin Microbiol 1993;31:865-871.

549  
550 11) Dunne WM Jr., Nolte FS, Wilson ML. Blood Cultures III. Hindler JA, coordinating ed.  
551 Washington, DC: American Society for Microbiology; 1997.

552  
553 12) Blot F, Nitemberg G, Chachaty E, Raynard B, Germann N, Antoun S et al. Diagnosis of catheter-  
554 related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus  
555 peripheral-blood cultures. Lancet 1999;354:1071-7.

556  
557 13) Bouza E, Burillo A, Munoz P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment.  
558 Clin Microbiol Infect. 2002;8(5):265-274.

559 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Principles and Procedures for Blood Cultures*;

560  
561 **Proposed Guideline. CLSI document M47-A** [ISBN 1-56238-619-0]. Clinical and Laboratory  
562 Standards Institute,  
563 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.)

564  
565 **Cumitech 1B Blood Cultures III**  
566 W. M. Dunne Jr., F.S. Nolte, M.L. Wilson. Aprile 1997 ASM Press P.O. Box 605 Herndon, VA  
567 20172 USA

568 **Henry D. Iseberg** 1992 e 1994 ASM Press P.O. Box 605  
569 Clinical Microbiology Procedures Handbook e Supplement 1  
570 Herndon, VA 20172 USA

571  
572 Patrick R. Murray 2007  
573 Manual of Clinical Microbiology  
574 ASM Press P.O. Box 605  
575 Herndon, VA 20172 USA  
576 [www.evaluations-standards.org.uk](http://www.evaluations-standards.org.uk)

577  
578 **INVESTIGATION OF BLOOD CULTURES (FOR ORGANISMS OTHER THAN**  
579 **MYCOBACTERIUM SPECIES)**  
580 Issue no: 5 Issue date: 09.08.05 Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory  
581 Page 1 of 34  
582 Reference no: BSOP 37i5  
583 This SOP should be used in conjunction with the series of other SOPs from the Health Protection  
584 Agency  
585 [www.evaluations-standards.org.uk](http://www.evaluations-standards.org.uk) ([http://www.hpa.-standardmethods.org.uk/wg\\_bacteriology.asp](http://www.hpa.-standardmethods.org.uk/wg_bacteriology.asp)).

586  
587  
588 **INVESTIGATION OF INTRAVASCULAR CANNULAE AND ASSOCIATED SPECIMENS**  
589 Issue no: 4.1 Issue date: 03.05.05 Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory  
590 Page 1 of 16  
591 Reference no: BSOP 20i4.1

592  
593

594

595 :

596

597