

PROCEDURA GENERALE SANITARIA

Cod. PGS-DIOT-05-21

Procedura Operativa SEPSI

Elenco emissioni/approvazioni/revisioni

Rev.	Autorizzazioni		
	Redazione	Verifica	Approvazione
0.0	<p>Componenti del gruppo di redazione:</p> <p>Dott. Domenico Dell'Edera [REDACTED]</p> <p>Dott. Antonio Mazzarella [REDACTED]</p> <p>Dottessa Angela Abbasciano [REDACTED]</p> <p>Dott.ssa Caterina Coretti [REDACTED]</p> <p>Dott. Francesco Riccardi [REDACTED]</p> <p>Dott. Rocco Di Leo [REDACTED]</p> <p>Dott. Giacinto Asprena Libonati [REDACTED]</p> <p>Dott. Antonio Gallo [REDACTED]</p> <p>Dott. Carlo Quinto [REDACTED]</p> <p>Dott. Vincenzo Pierro [REDACTED]</p> <p>IL DOCUMENTO È STATO REDATTO: Dott. Domenico Dell'Edera Dott. Antonio Mazzarella Dottessa Angela Abbasciano Dott.ssa Caterina Coretti</p>	<p>Direttore Dipartimento Integrazione Ospedale Territorio Dr. G. ANNESE [REDACTED]</p> <p>Direttore U.O.S.D. Direzione Sanitaria Ospedale Policoro Dr. F. RICCIARDI [REDACTED]</p> <p>Dirigente Medico e Risk Manager Aziendale Dr. A. MOLINO [REDACTED]</p> <p>Dirigente U.O.S.D. SCQ Dott.ssa A. BRAIA [REDACTED]</p> <p>Resp. I.D.F. Gestione Sistema Documentale della Qualità Dott.ssa C. GENTILE [REDACTED]</p> <p>Direttore S.I.C. Medicina Legale e Gestione del Rischio Clinico Dr. A. DI FAZIO [REDACTED]</p>	<p>Direttore Sanitario Aziendale ff Dott.ssa Lucia D'AMBROSIO [REDACTED]</p>

Ratifica	DATA 20/11/2024	Direttore Generale: Avv. Maurizio Nunzio Cesare FRIOLI: [REDACTED]
----------	-----------------	---

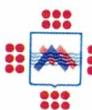
Distribuzione:

copia originale

copia in distribuzione controllata copia in distribuzione non controllata

Note:

La responsabilità dell'eliminazione delle copie obsolete della Procedura è dei destinatari di questa documentazione. Le copie aggiornate sono presenti nella rete intranet aziendale

 <p>azienda sanitaria locale matera</p>	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 2/22

INDICE

1. PREMESSA	3
2. SCOPO/OBIETTIVO.....	3
3. CAMPO DI APPLICAZIONE	3
4. ABBREVIAZIONI, DEFINIZIONI, TERMINOLOGIA.....	3
5. PROCESSO/MODALITA' OPERATIVE	4
6. DIAGRAMMA DI FLUSSO	9
7. SCELTA DELLA STRATEGIA TERAPEUTICA EMPIRICA	9
8. GESTIONE DELLE EMOCOLTURE NEL LABORATORIO DI PATOLOGIA CLINICA E MICROBIOLOGIA .	13
9. RUOLO CARDINE del LABORATORIO NELLA GESTIONE DEL PAZIENTE SETTICO	15
10. PROPOSTA DI IMPLEMENTAZIONE CON INNOVATIVI TEST MOLECOLARIDA SANGUE INTERO	18
11. RIFERIMENTI NORMATIVI E DOCUMENTALI	20

 <p>azienda sanitaria locale matera</p>	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 3/22

1. PREMESSA

La sepsi è una delle patologie più preoccupanti a livello mondiale ed è destinata ad incidere in maniera sempre più impattante in termini di *outcome* del paziente e spesa per il Sistema Sanitario; è un'infezione grave caratterizzata da un'elevata mortalità: 50 milioni di nuovi casi/anno nel mondo e 11 milioni di morti ¹. Circa l'80% dei casi sono di origine comunitaria, mentre la quota di sepsi correlata all'assistenza, seppure non stimabile in maniera accurata, è di circa il 20%².

L'approccio alla sepsi richiede un'azione coordinata multidisciplinare che meglio rappresenta la corrispondenza fra *diagnostic stewardship* e *antimicrobial stewardship* ³.

Le evidenze scientifiche dimostrano, infatti, come l'utilizzo di percorsi diagnostici basati sulla combinazione di nuove tecnologie consenta un approccio diagnostico fast impattando positivamente sulla early targeted therapy ⁴.

2. SCOPO/OBIETTIVO

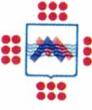
Il presente documento si pone l'obiettivo di standardizzare l'approccio clinico e microbiologico al paziente ricoverato che sviluppa un quadro di sospetta sepsi nei diversi setting intraospedalieri.

3. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente documento si applica nel Presidio Ospedaliero di Policoro dell'ASM di Matera.

4. ABBREVIAZIONI, DEFINIZIONI, TERMINOLOGIA

Batteriemia	è il riscontro di microrganismi nel flusso sanguigno (emocultura). Può verificarsi spontaneamente durante le infezioni tissutali o per la permanenza di cateteri urinari o endovenosi (EV), dopo interventi odontoiatrici, gastrointestinali, genitourinari, cura delle ferite o altre procedure ed è solo una delle possibili cause di evoluzione in sepsi.
Sepsi	secondo l'attuale definizione pubblicata dall'European Society of Intensive Care Medicine e della Society of Critical Care Medicine, è intesa come una disfunzione d'organo causata da una disregolata risposta dell'ospite all'infezione del microrganismo presente nel torrente circolatorio ⁵ .
Shock settico	è un sottoinsieme della sepsi, in cui le anomalie circolatorie e metaboliche cellulari sono tali da aumentare la mortalità in maniera significativa. Questa nuova definizione mette in evidenza due aspetti fisiopatologici dello shock di notevole importanza: l'insufficienza circolatoria con presenza di ipotensione e l'alterazione del metabolismo cellulare con incremento della concentrazione sierica di lattati.

 <p>azienda sanitaria locale matera</p>	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 4/22

5. PROCESSO/MODALITA' OPERATIVE

Al fine di una corretta gestione della sepsi è auspicabile l'utilizzo di un approccio che preveda:

- Identificazione precoce del paziente settico utilizzando **score di rischio**;
- esami biochimici ed esami colturali prima che si inizi una **terapia antibiotica**;
- somministrazione della **terapia empirica** più precocemente possibile.

Score di rischio

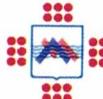
Per il riconoscimento del paziente settico e la valutazione del danno d'organo il clinico utilizza il **SOFA score** (Sequential Organ Failure Assessment) punteggio che misura il rischio di mortalità basato sul grado di disfunzione di sei categorie cliniche prevedendo sei punteggi distinti uno per ciascuno dei sistemi analizzati. Il punteggio finale si basa sulla valutazione del sistema respiratorio e cardiovascolare, della funzionalità epatica e renale, della coagulazione e dello stato neurologico.

Si monitorano:

- Frequenza cardiaca.
- Pressione arteriosa.
- Frequenza respiratoria.
- Pressione venosa centrale.
- Risposte del sistema nervoso centrale attraverso la scala di valutazione della coscienza.
(Glasgow Come Scale).
- Valori di INR, PT e PTT, AST, ALT, creatinina.

Il punteggio viene calcolato ogni 24 ore, dal momento dell'ammissione in reparto sino alla dimissione.

Nel paziente che presenta preesistenti alterazioni dei parametri valutati nel SOFA score deve essere considerato l'incremento di 2 punti dai valori di partenza (Tabella 1).

 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 5/22

SISTEMA	Punteggio				
	0	1	2	3	4
Respirazione PaO ₂ /Fio ₂ (mmHg)	≥ 400	< 400	< 300	< 200 con supporto respiratorio	< 100 con supporto respiratorio
Coagulazione Piastrine (n.o /mmq)	≥ 150.000	< 150.000	< 100.000	< 50.000	< 20.000
Epatico Bilirubina (mg/dl)	< 1.2	1.2 – 1.9	2.0 – 5.9	6.0 – 11.9	≥ 12.0
Cardiovascolare	Map ≥ 70 mmHg	Map < 70 mmHg	Dopamina < 5 mcg/kg/min o dobutamina	Dopamina 5.1 - 15 o nor.≤ 0.1 mcg/kg/min	Dopamina > 15 o nor.> 0.1 mcg/kg/min
Sistema Nervoso Centrale GCS (Glasgow Coma Scale)	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
Renale Creatina (mg/dl)	< 1.2	1.2 – 1.9	2.0 – 3.4	3.5 – 4.9	> 5.0
Diuresi (ml/die)				< 500	< 200

Tabella 1. Punteggio SOFA score

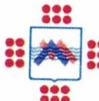
Nel tentativo di rendere più immediato ed efficace il riconoscimento del paziente settico anche in condizioni di scarsa disponibilità di risorse e nelle fasi precoci, è stato introdotto il concetto di quick SOFA (qSOFA).

Esso si basa sull'utilizzo di 3 parametri obiettivi:

- livello di coscienza alterato;
- pressione arteriosa sistolica (PAS) ≤ 100 mmHg;
- frequenza respiratoria (FR) ≥ 22/min.

In presenza di almeno due di questi parametri alterati in associazione ad una infezione si pone il sospetto di sepsi; in questi pazienti il rischio di morte è elevato ed è necessario attuare i protocolli di gestione appropriati.

Di seguito si riportano il protocollo sepsi da seguire entro la prima ora, entro la terza ora se il paziente è ancora in pronto soccorso (Tabella 2) e lo schema riassuntivo per differenziare la sepsi e lo shock settico (Figura 1)

 <p>azienda sanitaria locale matera</p>	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 6/22

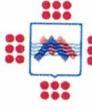
qSOFA (positivo se ≥ 2)	
Frequenza respiratoria a 22 atti/min	
Alterazione dello stato di coscienza (identificato come GCS < 15 o alterazione riconosciuta dall'operatore)	
Pressione arteriosa sistolica < 100 mmHg	

PROTOCOLLO SEPSI

ENTRO LA 1[^] ORA
misurare il lattato
infondere liquidi
ottenere esami culturali emocolture + eventuali altre colture in base al quadro clinico (prima della terapia antibiobica)
somministrare antibiotico ad ampio spettro
monitorare la diuresi
avviare le indagini per la ricerca del focus infettivo

ENTRO LA 3 ORA (SE IL PAZIENTE È ANCORA IN PS)
ricontrollare il lattato
monitorare l'infusione di liquidi
considerare la gestione avanzata con amine
proseguire la ricerca del focus infettivo

Tabella 2. Protocollo sepsi 1[^] e 3[^]ora

 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 7/22

Criteri di diagnosi di sepsi e shock settico

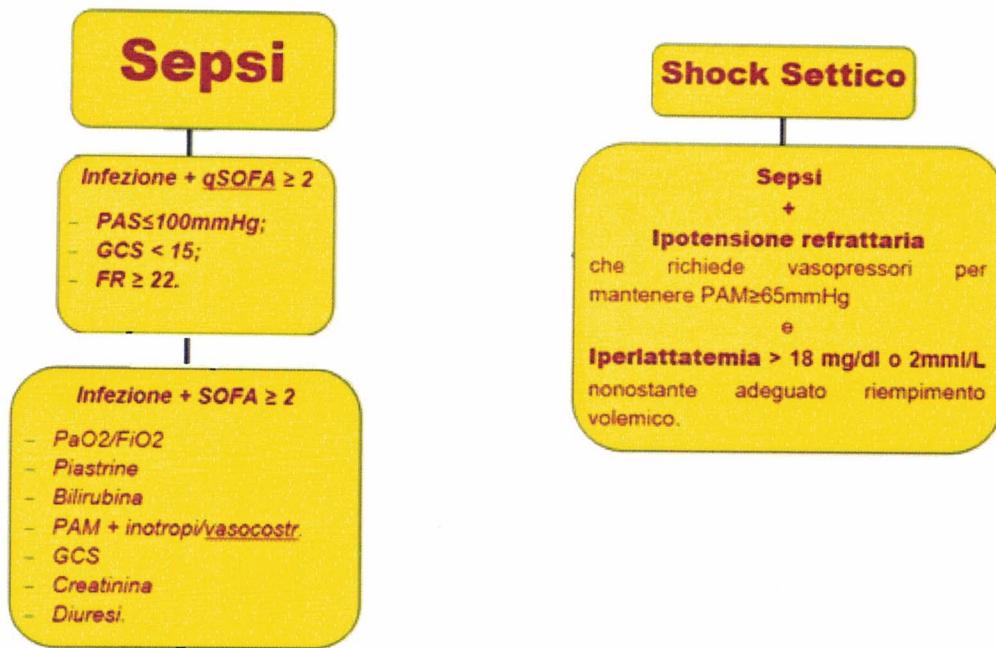
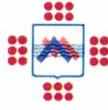


Figura 1 Criteri di diagnosi di sepsi e shock settico

Bisogna sottolineare come il qSOFA non possa essere considerato l'unico parametro di allerta. È opportuno identificare sistemi di monitoraggio adeguati in relazione alle diverse situazioni cliniche assistenziali del paziente.

 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 8/22

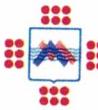
Indagini di laboratorio

I segni clinici della sepsi e dello shock settico devono essere integrati da esami di laboratorio utili a definirne la gravità (includendo i parametri del SOFA score) in una serie di esami ematici che si potrebbe definire **“Pannello Sepsi”** (Tabella 3). Di seguito è riportato il diagramma di flusso del percorso (figura 2)

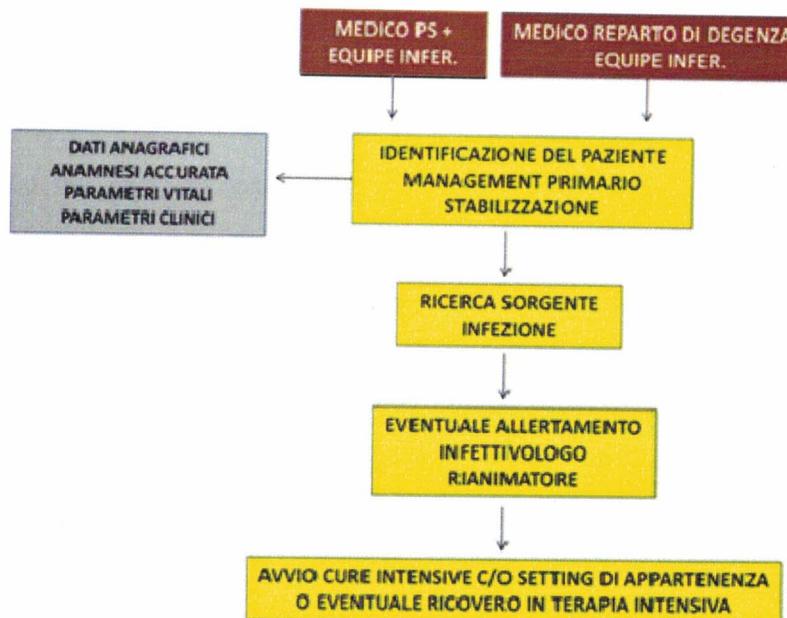
Esami da richiedere per inquadrare il paziente con sepsi

ESAMI EMATICI PANNELLO SEPSI
EMOGASANALISI ARTERIOSA + LATTATI
EMOCROMO
CREATININA
UREA
NA/K/CL
GLICEMIA
ALT/AST
PCR
BILIRUBINA TOTALE E DIRETTA
PROVE EMOGENICHE (INR, PT, PTT)
PROCALCITONINA*
*se non disponibile in urgenza da eseguire entro 12ore.

Tabella 3. Pannello Sepsi

 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 9/22

6. DIAGRAMMA DI FLUSSO



7. SCELTA DELLA STRATEGIA TERAPEUTICA EMPIRICA

La scelta dell'antibiotico da utilizzare in terapia empirica costituisce un compito impegnativo per il Clinico. È necessario conoscere le caratteristiche dei singoli farmaci e formulare una precisa "ipotesi diagnostica".

Si dovrà presupporre che ci si trovi di fronte a un'infezione e che sia di probabile natura batterica, valutando:

- i sintomi del paziente;
- l'eventuale imaging;
- i parametri biochimici.

La scelta del farmaco va orientata verso i microrganismi potenzialmente in causa, in base alle conoscenze sui dati di sensibilità locale e sull'impiego dell'antibiotico più selettivo e specifico possibile, rispettando così gli ecosistemi batterici non implicati nel processo infettivo; solo così sarà possibile instaurare una terapia ragionata.

La terapia empirica può essere descritta come la migliore terapia ipotetica finché non sono disponibili informazioni microbiologiche certe sull'organismo responsabile e sulla sua

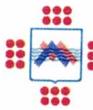
 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 10/22

suscettibilità agli antibiotici.

La tempestiva somministrazione di un'appropriata terapia antibiotica entro 60 minuti “dall’identificazione” della sepsi previa raccolta dei campioni microbiologici (emocolture e prelievi dal sospetto sito di infezione) è essenziale per un efficace trattamento: ogni ora di ritardo si associa ad un significativo incremento della mortalità ⁶.

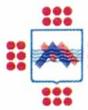
Tale terapia deve essere rivalutata a 48-72 ore per provvedere ad una *de-escalation* o a una rimodulazione.

Nelle tabelle 4, 5 e 6 sono riportate le indicazioni terapeutiche che prendono in considerazione il coinvolgimento dei diversi patogeni probabili inclusi i ceppi multi resistenti, quali Enterobatteri, Pseudomonas, *Staphilococcus aureus* Meticillino-Resistenti (MRSA).

 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 11/22

INDICAZIONI TERAPEUTICHE Prima linea	ALTERNATIVE	NOTE
Pazienti da comunità Cefotaxime 2 gr x 3 + Gentamicina 2 mg/Kg x 3	Alternativa a Ceftazidime Ceftriaxone 2 gr o Ceftazidime 2 gr x 3 o Cefepime 2 gr x 3	 Valutare per antifungino: durata 2-4 settimane
Paziente ospedalizzato o con fattori di rischio Piperacillina/Tazobactam 4.5 gr x 4 + Amikacina 15mg/Kg/die monosomministrazione +/- Vancomicina 500mg x 4	 Amoxicillina/Clavulanico 2.2 gr x 3 o Ampicillina/Sulbactam 3 gr x 4	
Se presente patologia addominale o pelvica + Metronidazolo 1 gr dose carico quindi 500 mg x 4 o Clindamicina 600 mg x 2	Alternativa a Gentamicina Amikacina 15mg/Kg/die	
	Alternativa a Piperacillina/Tazobactam Ceftazidime 2gr x 3 o Meropenem 1 gr x 3	
	Alternativa ad Amikacina: Ciprofloxacin 400 mg x 3	

Tabella 4. Sepsi di origine ignota

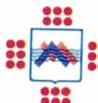
 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 12/22

INDICAZIONI TERAPEUTICHE Prima linea	ALTERNATIVE	NOTE
Oxacillina 2 gr x 6 + Piperacillina/Tazobactam 4.5 gr x 4	Vancomicina 500 mg x 4 o Teicoplanina 12 mg /Kg ogni 12 h (dose di attacco) poi 12 mg/Kg/die + Cefotaxime 2 gr x 3	Durata terapia: Gram negativi 10-14 gg Staphylococcus aureus 2-4 settimane

Tabella 5. Sepsi in tossicodipendente

PATOGENI	1 SCELTA	2 SCELTA	3 SCELTA
Bacilli Gram negativi – Enterobatteri – P.aeruginosa	Cefepime 2 g x 3 o Ceftazidima 2 g x 3	Pip/Tazobac. 4.5 g x 3-4 con Amikacina 15 mg/Kg al gg o Levofloxacina 500 mg x 2 o Ciprofloxacina 400 mg x 3	Meropenem 1 g x 3 o Imipenem 500 mg x 4
Cocchi Gram positivi – S.aureus MRSA – S. coagulasi negativi	In associazione o meno con Vancomicina 15-20 mg/Kg ogni 12 h o Teicoplanina 12 mg/Kg die dopo dose di carico		

Tabella 6. Terapia empirica nel paziente ospedalizzato

 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 13/22

8. GESTIONE DELLE EMOCOLTURE NEL LABORATORIO DI PATHOLOGIA CLINICA E MICROBIOLOGIA

In questa sezione si forniscono alcune indicazioni di gestione delle emocolture che prendono in considerazione gli aspetti pre-analitici e analitici dal Reparto fino all'arrivo in Laboratorio.

È importante sottolineare come una buona organizzazione insieme ad alcuni accorgimenti di ordine tecnico-metodologico possano contribuire a ridurre i tempi di esecuzione e trasmissione dei risultati, ossia il turn around time (TAT), rendendo la diagnosi microbiologica uno degli strumenti più impattanti sull'outcome del paziente.

Un'emocultura va prescritta in risposta al sospetto clinico di batteriemia associata non solo alla sepsi ma anche a una malattia infettiva localizzata come polmonite, meningite, osteomielite, endocardite, infezioni del tratto urinario ed infezioni di endoprotesi ^{7 8}.

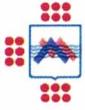
Gli indicatori clinici che inducono alla prescrizione dell'esame sono:

- la valutazione di segni di infezione localizzata con possibile coinvolgimento sistemico;
- la febbre o l'ipotermia;
- la presenza di brividi;
- la frequenza cardiaca elevata;
- la riduzione della pressione arteriosa;
- la variazione della frequenza respiratoria;
- l'alterato stato di coscienza.

A corredo di una clinica suggestiva, il laboratorio fornisce degli elementi utili nella valutazione globale, come la conta dei globuli bianchi nell'emocromo, la proteina C reattiva (PCR), la procalcitonina e i lattati ^{9 10 11}.

Sul timing di esecuzione delle emocolture alcuni accorgimenti sono raccomandabili:

- La batteriemia spesso non correla con segni e sintomi specifici, pertanto, non è indicato attendere la comparsa di brivido e/o del picco febbrile per eseguire il prelievo;
- L'esame deve essere eseguito prima dell'inizio della terapia antibiotica empirica, questo tuttavia non deve causare ritardi nell'iter terapeutico ⁵.

 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 14/22

Le Linee Guida ¹² raccomandano di ottenere emocolture (almeno 2 set, ciascuno costituito da un flacone aerobio ed uno anaerobio) e colture microbiologiche da tutti i siti sepsigeni potenziali primadell'inizio della terapia antimicrobica ⁵.

Il volume di inoculo rappresenta la variabile più importante. Si raccomanda, indipendentemente dalle modalità di prelievo, che vengano prelevati almeno 30/40 mL di sangue in modo da preparare quattro flaconi (due per gli aerobi e due per gli anaerobi) contenenti ciascuno 8-10 ml di sangue; questo consente di mantenere un rapporto sangue/brodo di coltura tra 1:5 e 1:10 (rapporto ottimale)¹².

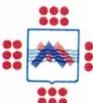
Un volume di sangue >10 mL/flacone può determinare risultati falsi negativi o falsi positivi e la raccolta di una eccessiva quantità di sangue in ogni flacone va evitata ¹³.

Per il paziente pediatrico sono disponibili flaconi dedicati: questi possono essere inoculati con un volume di sangue minimo di 1 mL; il volume di sangue massimo per una singola emocoltura pediatrica è di 4 mL.

L'invio di una singola emocoltura nell'adulto (laddove non rientri in una "aggiunta" ad un protocollo diagnostico di endocardite o candidemia) può essere eseguito in casi selezionati (es. nella gestione del paziente critico in reparti ad alta intensità oppure nei pazienti ematologici). Il valore diagnostico rimane modesto a causa dell'impossibilità di attribuire la corretta interpretazione ad un eventuale positività dovuta ad un microrganismo contaminante ¹⁴. Non vi sono evidenze significative che il prelievo di sangue arterioso aumenti la sensibilità rispetto al prelievo venoso, al contrario aumenta i rischi di isolamento dei contaminanti ¹⁰. Il prelievo da catetere venoso centrale (CVC) si effettua solo nel sospetto di infezione catetere-correlata.

I flaconi dovrebbero essere inviati in laboratorio nel più breve tempo possibile, entro 2 ore dal prelievo (conservare i flaconi per emocoltura per un tempo >2 ore a temperatura ambiente non è raccomandato) ¹⁵⁻¹⁶.

Incubare quanto prima un flacone pone gli eventuali patogeni nelle condizioni ottimali di crescita e questo si traduce in una riduzione del tempo di positivizzazione e quindi del TAT. La lunga permanenza all'esterno di alcuni sistemi di incubazione automatica dedicati può causare una mancata positivizzazione strumentale ¹⁷ in quanto la crescita microbica potrebbe aver già

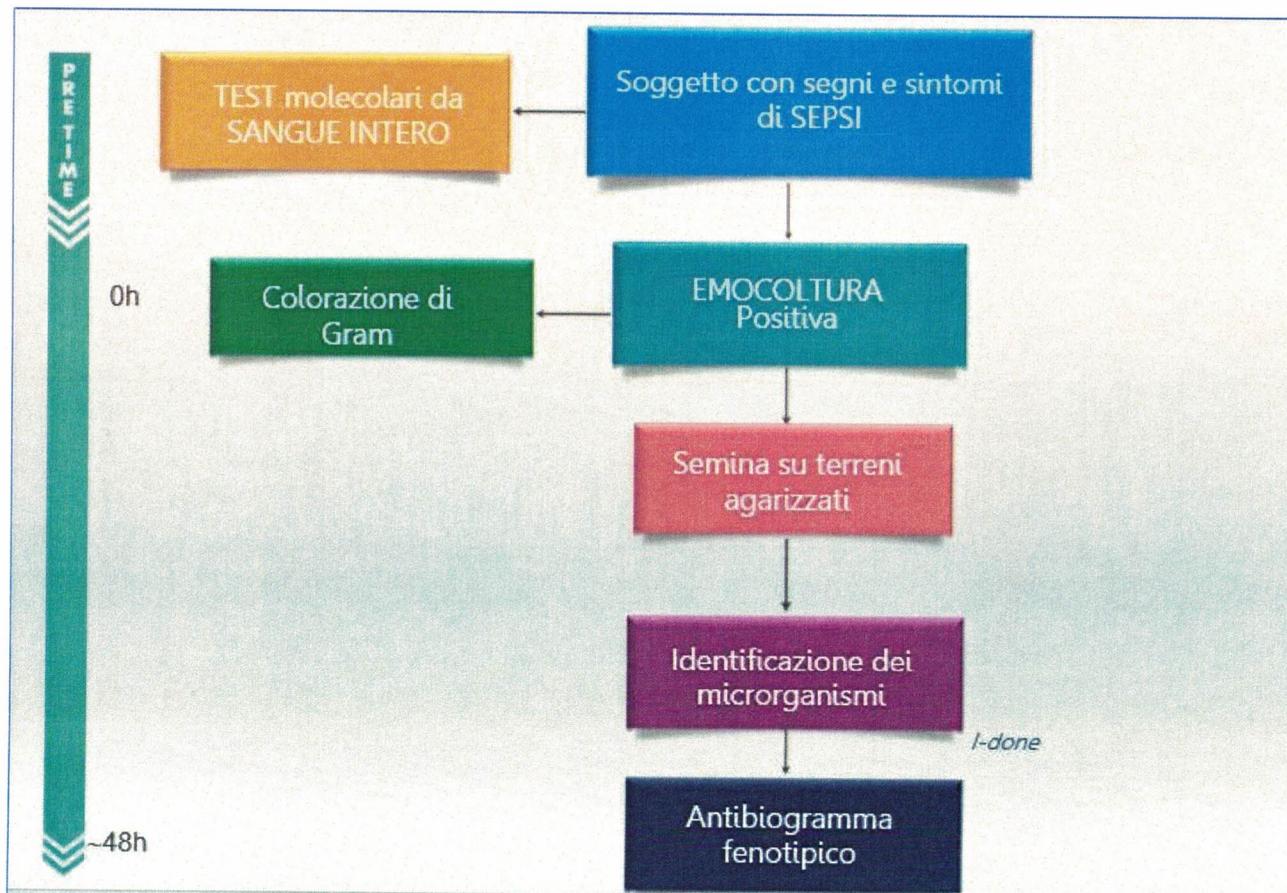
 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 15/22

raggiunto il plateau fuori dal sistema e non essere più rilevabile dai sistemi di "detection" degli incubatori automatizzati, ovvero ci potrebbe essere sofferenza microbica, con la conseguente mancata crescita dei microrganismi. I flaconi per emocoltura non devono essere mai refrigerati a 4°C.

9. RUOLO CARDINE del LABORATORIO NELLA GESTIONE DEL PAZIENTE SETTICO

L'inizio di una terapia empirica entro la prima ora dal sospetto clinico di sepsi, se da un lato riduce il tasso di mortalità, dall'altro può avere effetti negativi sull'aumento dei patogeni multiresistenti. Recentemente sono state introdotte tecniche innovative e rapide che consentono una notevole riduzione dei tempi di refertazione e permettono di iniziare più precocemente una terapia target.

Nel seguente algoritmo (Flow Chart 1) sono descritti i possibili percorsi diagnostici eseguibili partendo sia da emocoltura positiva (microbiologia tradizionale) sia, agendo in "pre-time", direttamente da sangue intero.



 <p>azienda sanitaria locale matera</p>	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 16/22

Flow Chart 1

Le emocolture giunte in laboratorio sono incubate in Sistemi di Monitoraggio Automatizzati che mantengono i flaconi in osservazione continua. Il periodo di incubazione standard raccomandato è di 5 giorni ad una temperatura di 35 ± 2 °C^{16,18}.

I flaconi che si positivizzano devono essere prontamente rimossi dall'incubatore al momento della segnalazione strumentale.

Vengono di seguito descritti l'iter standard per il processamento delle emocolture positive e il percorso di screening rapido direttamente da SANGUE INTERO.

Esame microscopico dopo emocoltura positiva

Si procede con l'indagine microscopica che consiste nell'allestimento e l'osservazione di un vetrino con striscio sottile sottoposto a colorazione di Gram. Devono essere valutate e annotate le caratteristiche morfologico-tintoriali dei microrganismi classificandoli, in relazione alla morfologia (cocchi, bacilli, batteri pleomorfi, lieviti) e alla colorazione (batteri gram-positivi, gram-negativi e gram-variabili)¹⁶. Le informazioni ottenute nell'indagine microscopica e il tempo di positività della emocoltura costituiscono informazioni sufficienti per un "referto preliminare scritto e firmato dal Dirigente Responsabile" da condividere con il Clinico.

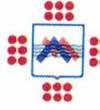
Sub-coltura su terreni agarizzati

Le emocolture positive devono essere sottoposte a sub-coltura su terreni solidi per valutare la crescita dei microrganismi. Per ogni flacone positivo, tre o quattro gocce devono essere seminate su adatti terreni di coltura che ne permettano la crescita inclusi i terreni di Agar Cioccolato per i microrganismi più esigenti e di Sabouraud dextrose agar per la crescita di lieviti.

Le piastre devono essere immediatamente incubate a 35 ± 2 °C e in 5% CO₂ con incubazione overnight.

I flaconi anaerobi positivi devono essere seminati aggiuntivamente anche su un terreno per anaerobi non selettivo, non differenziale arricchito con vitamina K ed emina che deve essere incubato in condizioni di anaerobiosi ad una temperatura di 35 ± 2 °C.

La maggior parte dei microrganismi aerobi o anaerobi facoltativi crescono dopo 24-48h di

 <p>azienda sanitaria locale matera</p>	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 17/22

incubazione. Per gli anaerobi stretti e per i miceti si raccomanda di prolungare il tempo di incubazione¹⁶.

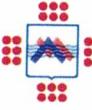
Identificazione e antibiogramma

Dopo la crescita su piastra si procede con l'identificazione e l'antibiogramma fenotipico utilizzando la Strumentazione fornita in Laboratorio.

L'antibiogramma permette la valutazione del profilo di sensibilità verso diversi antibiotici. I valori di Minima Concentrazione Inibente (MIC) devono essere interpretati mediante valutazione comparativa con valori soglia o breakpoints. I breakpoints vengono stabiliti, per ciascuna combinazione specie-antibiotico, da Comitati Nazionali e Internazionali: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ed European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

I risultati degli antibiogrammi devono essere adeguatamente interpretati per guidare la scelta terapeutica. A tal fine contribuiscono le informazioni cliniche dei pazienti e il confronto tra Specialisti.

Compatibilmente con la propria organizzazione di laboratorio i tempi di identificazione possono ridursi attraverso l'implementazione di tecnologie più rapide (vedi tecnologia Spettroscopia con lettura a infrarossi ATR-FTIR) e mediante la rilevazione di geni e/o meccanismi di resistenza che possono fornire indicazioni terapeutiche al Clinico.

 <p>azienda sanitaria locale matera</p>	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 18/22

10. PROPOSTA DI IMPLEMENTAZIONE CON INNOVATIVI TEST MOLECOLARIDA SANGUE INTERO

Per i pazienti critici e/o quelli a rischio di una più rapida progressione clinica, “il tempo” (la sepsi è una patologia tempo dipendente) e la precisione diagnostica, si trasformano in *chance* di sopravvivenza del paziente impattando in modo significativo anche sulla spesa e la somministrazione di antibiotici. Recentemente sono state introdotte, come utilizzo in screening, tecniche innovative e rapide che consentono una riduzione dei tempi di identificazione partendo da campione di SANGUE INTERO in modo da anticipare i tempi di positivizzazione dell’emocultura^{19,20}.

Utilizzando tale approccio, le sepsi possono oggi essere affrontate dal Clinico in modo totalmente rivoluzionario. In diagnostica rapida, infatti, l’informazione ottenuta sia con tecnica molecolare sia fenotipica, è fruibile dal Clinico in tempi molto rapidi (3 – 6 ore) superando uno dei problemi principali della Microbiologia tradizionale, ovvero, il fattore tempo che influenza in modo significativo l’outcome del paziente specialmente se critico.

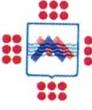
La doppia informazione ottenuta dai due percorsi, molecolare e microbiologico tradizionale, secondo una filosofia definita di *dual approaches* è utile al Clinico perché tale dato non è sostituibile reciprocamente ma è **COMPLEMENTARE**.

L’introduzione di tali sistemi diagnostici all’interno di un flusso di lavoro routinario, dati gli elevati costi e la richiesta di competenze tecniche specialistiche peculiari, deve tuttavia essere dedicata a pazienti selezionati. Il Clinico ha il compito di stratificare e identificare i pazienti da avviare al percorso rapido sulla base di uno *score* includente parametri microbiologici, clinici e bioumorali.

Solo i pazienti ad alto rischio necessitano di un percorso rapido microbiologico dedicato. I pazienti a medio e basso rischio non vengono messi da parte ma continuamente rivalutati con l’intento di individuare prontamente segni clinici di peggioramento tali da rendere necessaria una nuova valutazione del rischio e/o un passaggio al percorso rapido.

L’introduzione di tali metodiche deve quindi essere effettuata garantendo l’appropriatezza d’uso per sfruttarne al massimo i vantaggi. Fondamentale è mantenere il rapporto stretto e continuativo durante tutto il processo tra Microbiologo e Clinico.

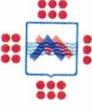
È importante ricordare che la diagnosi diretta da sangue intero elude i limiti di identificazione dei batteri a crescita colturale più lenta ed è di supporto nei casi in cui il paziente abbia già ricevuto

 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 19/22

antimicobici. Inoltre, l'elaborazione di volumi minori di campioni di sangue rispetto alle emocolture rende questi metodi molecolari particolarmente utili per pazienti pediatrici nei quali è difficile ottenere volumi maggiori di sangue ²¹.

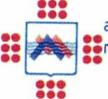
I sistemi molecolari comprendono oltre all'identificazione anche la rilevazione genotipica dei marcatori di resistenza senza la necessità di arricchire i microrganismi con una coltura.

Gestendo i PCR-Setup, i campioni vengono caricati nello Strumento senza manipolazione. L'integrazione della piattaforma con il LIS consente la totale tracciabilità del campione, nel rispetto delle normative vigenti.

 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 20/22

11. RIFERIMENTI NORMATIVI E DOCUMENTALI

1. Schlapbach LJ, Kissoon N, Alhawsawi A, Aljuaid MH, Daniels R, Gorordo-Delsol LA, Machado F, Malik I, Nsutebu EF, Finfer S, Reinhart K. World Sepsis Day: a global agenda to target a leading cause of morbidity and mortality. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2020;319.
2. Markwart R, Saito H, Harder T, Tomczyk S, Cassini A, Fleischmann-Struzek C, Reichert F, Eckmanns T, Allegranzi B. Epidemiology and burden of sepsis acquired in hospitals and intensive care units: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*. 2020;46.
3. Mangioni D, Viaggi B, Giani T, Arena F, D'Arienzo S, Forni S, Tulli G, Rossolini GM. Diagnostic stewardship for sepsis: the need for risk stratification to triage patients for fast microbiology workflows. *Future Microbiol*. 2019;14.
4. Tiseo G, Brigante G, Giacobbe DR, Maraolo AE, Gona F, Falcone M, Giannella M, Grossi P, Pea F, Rossolini GM, Sanguinetti M, Sarti M, Scarparo C, Tumbarello M, Venditti M, Viale P, Bassetti M, Luzzaro F, Menichetti F, Stefani S, Tinelli M. Diagnosis and management of infections caused by multidrug-resistant bacteria: guideline endorsed by the Italian Society of Infection and Tropical Diseases (SIMIT), the Italian Society of Anti-Infective Therapy (SITA), the Italian Group for Antimicrobial Stewardship (GISA), the Italian Association of Clinical Microbiologists (AMCLI) and the Italian Society of Microbiology (SIM). *Int J Antimicrob Agents*. 2022;60.
5. Rhodes, A., Evans, L.E., Alhazzani, W. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* 43, 304–377 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6>
6. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, Machado FR, McIntyre L, Ostermann M, Prescott HC, Schorr C, Simpson S, Joost Wiersinga W, Alshamsi F, Angus DC, Arabi Y, Azevedo L, Beale R, Beilman G, Belley-Cote E, Burry L, Cecconi M, Centofanti J, Yataco AC, De Waele J, Dellinger RP, Doi K, Du B, Estenssoro E, Ferrer R, Gomersall C, Hodgson C, Møller MH, Iwashyna T, Jacob S, Kleinpell R, Klompas M, Koh Y, Kumar A, Kwizera A, Lobo S, Masur H, McGloughlin S, Mehta S, Mehta Y, Mer M, Nunnally M, Oczkowski S, Osborn T, Papathanassoglou E, Perner A, Puskarich M, Roberts J, Schweickert W, Seckel M, Sevransky J, Sprung CL, Welte T, Zimmerman J, Levy Executive Summary: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for the Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med*. 2021 Nov 1;49(11):1974- 1982
7. Viscoli C. Bloodstream Infections: The peak of the iceberg. *Virulence*. 2016;7(3).
8. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases di Bennett -Dolin - Blaser 2019

 azienda sanitaria locale matera	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 21/22

9. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315.
10. De Plato F, Fontana C, Gherardi G, Privitera GP, Puro V, Rigoli R, Viaggi B, Viale P. "Collection, transport and storage procedures for blood culture specimens in adult patients: recommendations from a board of Italian experts." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 57 (2019): 1680 - 1689.
11. Azim A. Presepsin: A Promising Biomarker for Sepsis. *Indian J Crit Care Med.* 2021;25(2)
12. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gonzalez MD, Harrington A, Jerris RC, Kehl SC, Leal SM Jr, Patel R, Pritt BS, Richter SS, Robinson-Dunn B, Snyder JW, Telford S 3rd, Theel ES, Thomson RB Jr, Weinstein MP, Yao JD. Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2024 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis.* 2024
13. Lin HH, Liu YF, Tien N, Ho CM, Hsu LN, Lu JJ. Evaluation of the blood volume effect on the diagnosis of bacteremia in automated blood culture systems. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013;46.
14. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. Executive Summary: Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62(4).
15. Willems E, Smismans A, Cartuyvels R, Coppens G, Van Vaerenbergh K, Van den Abeele A-M, et al. The preanalytical optimization of blood cultures: a review and the clinical importance of benchmarking in 5 Belgian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:1–8
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and Procedures for Blood Cultures. 2nd ed. CLSI guideline M47 (ISBN 978-1-68440-148-2). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2022.
17. Venturelli C, Righi E, Borsari L, Aggazzotti G, Busani S, Mussini C, Rumpianesi F, Rossolini GM, Girardis M. Impact of Pre-Analytical Time on the Recovery of Pathogens from Blood Cultures: Results from a Large Retrospective Survey. *PLoS One.* 2017; 12(1).
18. Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA and the ESCMID Study Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis (ESGBIES) Bloodstream infections - Standard and progress in pathogen diagnostics *Clin Microbiol Infect* 2020;26(2).
19. Peri AM. et al. New Microbiological Techniques for the Diagnosis of Bacterial Infections and Sepsis in ICU Including Point of Care. *Curr Infect Dis Rep.* 2021;23(8):12.

 <p>azienda sanitaria locale matera</p>	PROCEDURA GENERALE SANITARIA	COD: PGS-DIOT-05-21	
	Procedura Operativa SEPSI	REV. 0.0	Pagina 22/22

20. Iyer V, Castro D, Malla B, Panda B, Rabson AR, Horowitz G, Heger N, Gupta K, Singer A, Norwitz ER. Culture-independent identification of bloodstream infections from whole blood: prospective evaluation in specimens of known infection status. *J Clin Microbiol*. 2024 Mar 13;62(3):e0149823. doi: 10.1128/jcm.01498-23. Epub 2024 Feb 5. PMID: 38315022; PMCID: PMC10935643.
21. Opota O, Jaton K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2015.