

**HDKM****Smjernice za uzimanje, obradu i interpretaciju rezultata hemokultura**

Marina Payerl-Pal<sup>1</sup>, Ivana Mareković<sup>2</sup>, Arjana Tambić Andrašević<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Zavod za javno zdravstvo Međimurske županije, Čakovec

<sup>2</sup> Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

<sup>3</sup> Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

## **SADRŽAJ**

### **1.0 UVOD**

### **2.0 TERMINI I DEFINICIJE**

#### **2.1. BAKTERIJEMIJA**

#### **2.2. KLINIČKE SLIKE VEZANE UZ BAKTERIJEMIJU**

#### **2.3. HEMOKULTURA**

### **3.0 PREDANALITIČKA FAZA**

#### **3.1. INDIKACIJE ZA UZIMANJE HEMOKULTURA**

#### **3.2. UZIMANJE UZORKA**

##### 3.2.1. Volumen krvi

##### 3.2.2. Broj setova hemokultura

##### 3.2.3. Vrijeme i mjesto uzimanja hemokultura

##### 3.2.4. Uzimanje hemokultura kod endokarditisa

##### 3.2.5. Uzimanje hemokultura pri sumnji na kandidemiju

##### 3.2.6. Uzimanje hemokultura pri sumnji na infekcije krvotoka povezane s intravaskularnim kateterom

##### 3.2.7. Ponavljanje prethodno pozitivnih hemokultura u svrhu praćenja uspješnosti liječenja

##### 3.2.8. Postupak uzimanja hemokultura

#### **3.3. POHRANA I TRANSPORT UZORAKA**

#### **3.4. KRITERIJI ZA ODBACIVANJE UZORAKA**

### **4.0 ANALITIČKA FAZA**

#### **4.1. HRANJIVI MEDIJI U BOČICAMA ZA HEMOKULTURU**

#### **4.2. ATMOSFERSKI UVJETI INKUBACIJE**

#### **4.3. VRIJEME INKUBACIJE**

#### **4.4. MANUALNO OBRADIVANJE HEMOKULTURA**

##### 4.4.1. Postupanje s pozitivnim bočicama

##### 4.4.2. Postupanje s negativnim bočicama

#### **4.5. AUTOMATIZIRANI SUSTAVI ZA INKUBACIJU HEMOKULTURA**

#### **4.6. POSTUPAK S POZITIVNIM BOČICAMA**

#### **4.7. KONTAMINACIJA HEMOKULTURA**

##### 4.7.1. Kriteriji za proglašenje izolata kontaminantom

#### **4.8. IDENTIFIKACIJA IZOLATA I TESTIRANJE OSJETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE**

##### 4.8.1. Brze i automatizirane metode identifikacije bakterija direktno iz pozitivnih hemokultura

4.8.1.1. MALDI-TOF masena spektrometrija

4.8.1.2. Fluorescencijska hibridizacija *in situ* s PNA probama (PNA/FISH)

4.8.1.3. Sustavi temeljeni na *multiplex* PCR i *filmarray* tehnologiji

4.8.2. Direktno otkrivanje uzročnika u uzorcima krvi

4.8.3. Testiranje osjetljivosti na antibiotike direktno iz pozitivnih hemokultura

#### **4.9. POSTUPAK S NEGATIVNIM BOČICAMA**

4.9.1. Infektivni endokarditis s negativnim hemokulturama

### **5.0 POST-ANALITIČKA FAZA**

#### **5.1. IZDAVANJE NALAZA**

5.1.1. Negativan nalaz

5.1.2. Pozitivan nalaz

#### **5.2. VREMENSKE NORME**

5.2.1. Predanalitička faza

5.2.3. Analitička faza

5.3.3. Postanalitička faza

### **6.0. OSIGURANJE KVALITETE**

#### **6.1. UNUTARNJA KONTROLA KVALITETE**

#### **6.2. VANJSKA KONTROLA KVALITETE**

#### **6.3. INDIKATORI KVALITETE**

#### **6.4. POHRANA UZORAKA**

### **7.0. LITERATURA**

## UVOD

Infekcije krvotoka su važan problem zdravstvenog sustava budući se u Europi svake godine zabilježi oko 1,200.000 epizoda infekcija krvotoka. Odgođena primjena adekvatnog liječenja povezana je s lošijim ishodom za bolesnika a brza i točna identifikacija uzročnika i rezultat osjetljivosti na antimikrobne lijekove značajno doprinose boljoj zdravstvenoj skrbi.<sup>1,2,3</sup>

Unatoč razvoju novih tehnologija, hemokulture se i dalje smatraju zlatnim standardom odnosno referentnom metodom u dijagnostici uzročnika infekcija krvotoka i sepse. Posebno značajnu ulogu za uspješnost hemokultura kao dijagnostičke metode te njihovu standardizaciju je imalo uvođenje automatiziranih sustava za inkubaciju hemokultura 90-tih godina prošlog stoljeća.<sup>4,5</sup>

Danas primjena hemokultura u dijagnostici infekcija krvotoka i sepse stoji pred novim izazovima. Zadnjih nekoliko godina došlo je do razvoja brzih metoda temeljenih na novim tehnologijama čija se uloga u procesu obrade hemokultura i utjecaj na poboljšanje liječenja i smanjenje mortaliteta još definira. Njihova pojava i implementacija sa sobom donosi i dodatna pitanja o njihovoj učinkovitosti i isplativosti koja će se teško vidjeti ukoliko se ne optimiziraju i ostali, osobito predanalitički parametri u postupku obrade: priprema mjesta venepunkcije, optimalni volumen krvi, što ranije započinjanje inkubacije odnosno stavljanje u uređaj za hemokulture, promptna obrada hemokulture koju je uređaj označio kao pozitivnu.<sup>6-14</sup>

Suboptimalni parametri predanalitičke faze su često povezani s organizacijom i načinom rada većine mikrobioloških laboratorija. Prema zadnjem istraživanju još uvijek se samo u 42 % europskih laboratorija inokulirane bočice za hemokulturu stavljaju u uređaj tijekom 24 sata / 7 dana u tjednu, samo 13 % laboratorija započinje obradu pozitivnih hemokultura tijekom 24 sata a manje od 5 % ima službu organiziranu na način da se tijekom 24 sata rezultati identifikacije i ispitivanja osjetljivosti validiraju i čine dostupnima kliničarima.<sup>15</sup>

U novije vrijeme važnost predanalitičkih čimbenika i njihov utjecaj na uspješnost dijagnostike dovela je i do prepoznavanja važnosti kontrole kvalitete i praćenja indikatora kvalitete tijekom obrade hemokultura na koje je također skrenuta pozornost ovim smjernicama.<sup>16</sup>

## 2. TERMINI I DEFINICIJE

### 2.1. BAKTERIJEMIJA

**Bakterijemija** je prisutnost živih bakterija u krvi dokazana pozitivnim hemokulturama.

**Kandidemija** je prisutnost blastokonidija *Candida* spp. u krvi dokazana pozitivnim hemokulturama. U hemokulturama rjeđe mogu porasti i ostale vrste gljiva (npr. *Fusarium* spp, *Scedosporium* spp), ali s obzirom da su izolati *Candida* spp. najčešći, smjernice se odnose i u tekstu se koristi isključivo termin kandidemija.

Prisutnost živih mikroorganizama u krvi pacijenta ima veliku dijagnostičku i prognostičku važnost. Kada se mikroorganizmi dijele brzinom koja prelazi kapacitet retikuloendotelnog sustava, koji ih uklanja iz krvi, rezultat je bakterijemija ili kandidemija. Perzistentna bakterijemija ili kandidemija može biti posljedica neuspjele obrane domaćina da lokalizira infekciju u primarnom žarištu i / ili neuspjelog pokušaja liječnika da ukloni, drenira ili na odgovarajući način liječi lokaliziranu infekciju.<sup>17</sup>

Najčešći izvori bakterijemije su intravaskularni kateteri, mokraćni sustav i donji respiratorni sustav te potom intraabdominalne infekcije, infekcije kože i mekih česti i bilijarni sustav. Bakterijemija se pojavljuje tijekom mnogih sistemskih i lokaliziranih infekcija prema raznim studijama u 50 do 80 % pacijenata s meningitisom, 5 do 30 % pacijenata s pneumonijom, 20 do 70% pacijenta s piogenim artritisom, 30 do 50 % pacijenata s osteomijelitisom i 5 do 90% pacijenata s infekcijama uzrokovanim gonokokima i meningokokima. Kod 13-21% bolesnika izvor bakterijemije ostaje nepoznat.<sup>18-20</sup>

Polimikrobna bakterijemija je relativno rijetka i nalazi se u otprilike 4,7% svih septičkih epizoda. U određenim populacijama pacijenata, hemokulture pozitivne na dva ili više mikroorganizama mogu varirati od 10% u djece do gotovo 30% u imunokompromitiranih pacijenata. Vađenje zuba predstavlja jedan od poznatih rizičnih faktora za polimikrobnu bakterijemiju. Polimikrobna bakterijemija sa *Pseudomonas aeruginosa* ima veći rizik smrtnosti i češća je kod starije populacije.<sup>21</sup>

Kandidemija nastaje kod bolesnika s rizičnim čimbenicima kao što su prisutnost intravaskularnih katetera, kirurški zahvati (osobito abdominalni), totalna parenteralna prehrana, imunosupresija zbog transplantacije solidnih organa i krvotvornih matičnih stanica, hematološke i ostale maligne bolesti te prethodna upotreba antibiotika.<sup>22</sup>

**Prolazna bakterijemija** je najčešći oblik bakterijemije koji traje samo nekoliko minuta ili sati te spontano nestaje uklanjanjem bakterija iz krvi fagocitozom u jetri i slezeni. Nastaje nakon manipulacije s inficiranim tkivima (npr. apsces, furunkul i celulitis), invazivnih postupaka na anatomskim mjestima s koloniziranom sluznicom (stomatološki zahvati, postupci u urologiji kao što su cistoskopija, dilatacija uretre i kateterizacija mokraćnog mjehura), usisnog pobačaja, endoskopskih postupaka te kirurških postupaka koji uključuju kolonizirana područja (transuretralna resekcija prostate, vaginalna histerektomija i debridement inficiranih opekline).<sup>17</sup>

**Povremena ili intermitentna bakterijemija** je karakterizirana cikličnim odstranjivanjem i ponovnim pojavljivanjem bakterija u krvi najčešće povezanim s postojanjem infektivnog žarišta kao što je nedrenirani apsces (intraabdominalni, zdjelčni, perinefritički ili jetreni apscesi, apsces prostate), pneumonija, pijelonefritis i osteomijelitis. Apscesi ovoga tipa su najčešći uzrok vrućice nepoznata porijekla.<sup>17</sup>

**Trajna ili kontinuirana bakterijemija** nastaje kod infekcije smještene unutar krvožilnog sustava, osobito kod akutnog i subakutnog infektivnog endokarditisa te infekcija vaskularnog presatka. Pri tome je najčešće riječ o bakterijemiji niskog stupnja odnosno prisutnosti izrazito malenog broja bakterija u krvi što otežava njeno otkrivanje. Ovaj obrazac je vidljiv i tijekom prvih tjedana tifusne groznice i bruceloze.<sup>17</sup>

## 2.2. KLINIČKE SLIKE VEZANE UZ BAKTERIJEMIJU

**Sepsa** je po život opasna disfunkcija organa uzrokovana nereguliranim odgovorom domaćina na infekciju. S obzirom da sistemni upalni odgovor mogu uzrokovati i čimbenici neinfektivne etiologije, često je teško bez pozitivnih hemokultura razlikovati upalni odgovor infektivne etiologije koji treba liječiti antibioticima od drugih stanja gdje primjena antibiotika nije potrebna.

**Septički šok** je podvrsta kliničkog sindroma sepse karakterizirana osobito dubokim cirkulacijskim, staničnim i metaboličkim abnormalnostima povezanim sa znatno većim mortalitetom nego li sama sepsa. Pacijenti sa septičkim šokom zahtijevaju vazopresore za održavanje srednjeg arterijskog tlaka  $\geq 65$  mmHg, imaju razinu laktata u krvi  $>2$  mmol/L usprkos nadoknadi volumena te smrtnost  $>40\%$ .

**Disfunkcija ili zatajenje organa** definira se pomoću SOFA score sustava (prema engl. *Sequential Organ Failure Assessment*) na skali od 0 do 4 vrednujući pri tome pojedine organske sustave (respiratorni sustav, koagulacija, kardiovaskularni sustav, jetra, središnji živčani sustav, bubreg).

Viši SOFA score povezan je s višim mortalitetom.<sup>23</sup> U izvanbolničkim uvjetima ili na općim odjelima bolnice kod bolesnika s infekcijom, praktičnije je primjenjivati brže primjenjivu inačicu ovog sustava, tzv. „quickSOFA“ (qSOFA) sustav bodovanja za predikciju lošeg ishoda povezanog sa sepsom. qSOFA bodovni sustav uključuje: frekvenciju respiracije  $\geq 22$ /min, promjenu svijesti te sistolički krvni tlak od  $\leq 100$  mmHg.<sup>23</sup>

### 2.3. HEMOKULTURA

**Hemokultura** je dijagnostički postupak kojim se uzorak krvi nasađuje u tekuće hranilište (bujon) radi dokazivanja prisutnosti bakterija i gljiva u krvi. Jednim uzorkom hemokulture se smatra uzorak krvi dobiven jednom venepunkcijom (s jednog mjesta u isto vrijeme) inokuliran u jedan set hemokultura koji se može sastojati od jedne (kod male djece) ili više bočica bujona za hemokulture.

**Set hemokultura** se najčešće sastoji od jedne aerobne i jedne anaerobne bočice za hemokulturu. Pri sumnji na kandidemiju može se dodati treća bočica posebno namijenjena uspješnijem porastu gljiva (npr. Bactec Mycosis IC/F). Za djecu i novorođenčad set je jedna pedijatrijska bočica.<sup>24-26</sup> Ukoliko nije moguće izvršiti odvojene venepunkcije, poželjan volumen krvi se može uzeti pri jednoj venepunkciji i tada sve istovremeno inokulirane bočice (4 do 6 bočica) čine isti set (vidi 3.2.1. i 3.2.2.).

**Kontaminacija** je porast mikroorganizama u bočici za hemokulturu koji nisu prisutni u krvi bolesnika i predstavlja lažno pozitivni rezultat.

**Kontaminanti** su mikroorganizmi koji u hemokulturu budu inokulirani prilikom uzimanja ili presađivanja uzorka. Uobičajeni kožni kontaminanti uključuju koagulaza negativne stafilokoke (KNS), *Micrococcus* spp., difteroide (*Corynebacterium* spp.), *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes*, *Bacillus* spp. (osim *B. anthracis*), a i nalaz viridans streptokoka često predstavlja kontaminaciju. Iako nalaz spomenutih bakterijskih vrsta vrlo često predstavlja kontaminaciju, njihov nalaz ne može isključiti pravu bakterijemiju te je potrebno posebno ispitati njihovu kliničku značajnost prije odluke o načinu izdavanja nalaza (vidi 3.2.2. i 4.6.1.).<sup>24,26</sup>

**Stopa kontaminacije** je broj kontaminiranih uzoraka na 100 uzetih uzoraka.

**Osjetljivost i specifičnost testa hemokulture** ovise o postavljanju indikacije za uzimanje uzorka, a u slučaju intermitentne bakterijemije i o sposobnosti kliničara da predvidi fazu bakterijemije u trenutku uzimanja uzorka. Trećina bolesnika s teškom sepsom nema pozitivnu hemokulturu pa etiologija ostaje nedokazana, a osjetljivost hemokultura u otkrivanju kandidemije je 50%.

Kliničar indicira broj hemokultura i vrijeme kada će se one uzeti i pri tome je najvažnije voditi računa da se uzme dovoljan volumen krvi jer se s povećanjem volumena uzorka podiže osjetljivost testa (vidi 3.1.). Za podizanje specifičnosti testa bitno je uzeti barem dva uzorka (seta), svaki s različitih mjesta venepunkcije, što je bitno kod nalaza bakterijskih vrsta koje se smatraju čestim kontaminantima.<sup>24-27</sup>

### **Stopa pozitivnih hemokultura i broj kultura na 1000 bolničkih dana**

Ovisno o tipu bolnice, stopa pozitivnih hemokultura može biti viša ili niža. Ukoliko je pozitivitet ispod 5% ili iznad 15% potrebno je obratiti pažnju na pravilnu indikaciju za vađenje. Preporučeni broj hemokultura na 1000 bolničkih dana varira između 103 i 188.<sup>20,28-30</sup>



### 3. PREDANALITIČKA FAZA

**Predanalitička faza** uključuje postavljanje indikacije za uzimanje uzorka, prikupljanje i transport uzoraka te zaprimanje u laboratorij.

#### 3.1. INDIKACIJE ZA UZIMANJE HEMOKULTURA

Hemokulture je potrebno vaditi kada se sumnja na bakterijemiju i/ili sepsu. Klinički simptomi koji ukazuju na moguću infekciju krvotoka uključuju sljedeće:

- vrućica ( $\geq 38$  °C) ili hipotermija ( $\leq 36$  °C)
- šok, zimica, tresavice
- lokalne bakterijske infekcije (meningitis, endokarditis, pneumonija, pijelonefritis,...)
- abnormalno povišeni otkucaji srca
- nizak ili visok krvni tlak
- ubrzano disanje <sup>23,31</sup>

#### 3.2. UZIMANJE UZORAKA

##### 3.2.1. Volumen krvi

Volumen krvi za hemokulturu je najbitniji čimbenik koji utječe na otkrivanje bakterijemije ili kandidemije budući se kod većine odraslih za vrijeme bakterijemije ili kandidemije u krvi nađe niska koncentracija bakterija odnosno gljiva, često  $< 1 \times 10^3$  cfu/L ( $< 1$  cfu/mL). Eksperimentalni modeli i klinička istraživanja pokazuju da je kod 50 % infekcija krvotoka koncentracija bakterija u rasponu od svega 0.01-1 CFU/mL. Osjetljivost pretrage izravno je povezana s volumenom krvi inokuliranom u bočice za hemokulturu. Kod nezadovoljavajućih volumena se mogu javiti lažno negativni rezultati.<sup>32,33</sup>

Set hemokultura se sastoji od svih bočica napunjenih pri jednoj venepunkciji. Volumen krvi izvađen pri jednoj venepunkciji se podjednako raspodjeljuje u bočice koje čine isti set, najčešće u jednu aerobnu i jednu anaerobnu bočicu. Minimalni preporučeni volumen kod **odraslih** bolesnika je 20 mL tj. jedan set od dvije bočice (10 mL po bočici za hemokulturu), standardnim volumenom se smatra 40mL (najbolje raspoređenim u dva seta hemokultura), a dodatno se

osjetljivost testa može podići uzimanjem do 60 mL krvi (najbolje raspoređenim u tri seta hemokultura). Ukoliko je odrasloj osobi izvađen manji volumen krvi od preporučenog, prvo se inokulira aerobna bočica s preporučenim volumenom, a ostatak krvi se inokulira u anaerobnu bočicu. Preporuča se ovakav način inokulacije bočica jer je većina bakterijemija uzrokovana aerobnim i fakultativno anaerobnim bakterijama.<sup>24-26</sup>

Kod **djece** uzimanje hemokultura predstavlja izazov zbog poteškoća u određivanju potrebnog optimalnog ukupnog volumena prema čemu se mnogobrojne preporuke trenutno vrlo razlikuju. Duže vrijeme prisutno je uvriježeno mišljenje da je kod djece koncentracija bakterija u krvi za vrijeme bakterijemije obično viša negoli kod odraslih. Iako istraživanja pokazuju da su kod djece ipak u značajnom postotku prisutne bakterijemije niskog i vrlo niskog intenziteta, često citirane preporuke za preporučeni volumen krvi kod djece Kellog J.A. i suradnika nisu adekvatne za kliničku primjenu, osobito kod niske tjelesne mase ( $\leq 2$ kg) te novorođenčadi jer zahtijevaju uzimanje 4% ukupnog volumena krvi za koji je upitno hoće li ga pacijent ukoliko je u kritičnom stanju uspjeti nadoknaditi.<sup>34</sup>

S obzirom da konsenzusa još nema, prema dostupnoj literaturi trenutno se preporučuje uzimanje volumena krvi s obzirom na tjelesnu masu ili dob djeteta kako je prikazano u Tablici 1. Kod uzimanja krvi s obzirom na tjelesnu masu najprihvatljivijim se čini uzimanje 1 mL krvi kod djece tjelesne mase  $< 2$  kg, 1.5 mL kod tjelesne mase  $< 11$  kg i 7.5 mL kod tjelesne mase 11-17 kg. U istraživanjima se kod neonatusa i manje djece češće koristi određivanje optimalnog volumena krvi s obzirom na dob te se kod neonatusa većinom preporučuje volumen krvi od 0.5 do 1.0 mL.<sup>35-37</sup>

**Tablica 1.** Preporučeni volumen krvi kod djece prema tjelesnoj masi i dobi

Prema: Huber S, Hetzer B, Crazzolaro R, Orth-Höller D. The correct blood volume for paediatric blood cultures: a conundrum? Clin Microbiol Infect 2020; 26:168-173.

Volumen krvi prema tjelesnoj masi			Volumen krvi prema dobi		
Tjelesna masa (kg)	Ukupni volumen krvi <sup>a</sup> (mL)	Broj bočica	Dob	Ukupni volumen krvi <sup>a</sup> (mL)	Broj bočica
1.5-2.1	1.0	1	<12 mjeseci	1.0-3.0	1-2
2.2-11.1	1.5	1	12-48 mjeseci	3.0-4.0	1-2
11.2-17.1	7.5	3	5-9 godina	6.0-8.0	1-2
17.2-37.2	11.5	3	≥ 10 godina	20.0	2
>37.3	16.6	3			

<sup>a</sup>Ukupni volumen krvi koji treba uzeti i raspodijeliti u navedeni broj bočica

### 3.2.2. Broj setova hemokultura

Preporuča se uzeti dva do tri seta hemokultura po septičkoj epizodi slijedeći gore navedene preporuke o poželjnom volumenu krvi. Set hemokultura čine sve bočice inokulirane odjednom pri jednoj venepunkciji. Preporučeni standard za odrasle uključuje dva seta hemokultura, svaki uzet s drugog mjesta venepunkcije, pri čemu se svaki set sastoji od jedne aerobne i jedne anaerobne bočice tj. svaki set sadrži uzorak od 20 mL krvi. Osjetljivost pretrage se može povećati ako se uzme i treći set od dvije bočice, što će ukupno iznositi 60 mL krvi po septičkoj epizodi tj. unutar 24h. Ovakav klasični pristup višestruke venepunkcije s različitih mjesta se zasniva na pretpostavkama da ponavljajući uzorci doprinose povećanom volumenu ukupno inokulirane krvi, da uzorci uzeti s različitih mjesta venepunkcije omogućuju bolje razlučivanje kontaminanata od pravih uzročnika te da uzorci uzeti u razmaknutim vremenskim intervalima poboljšavaju izgled za dokazivanje intermitentne bakterijemije. Od 1990-tih prihvaćen je i alternativni pristup u kojem se standardni volumen krvi od 40 mL ili i veći volumen od 60 mL može izvaditi i prilikom samo jedne venepunkcije i potom razdijeliti u 4 ili 6 bočica bujona. U

tom slučaju sve četiri odnosno svih šest bočica se smatra jednim setom. Prednost jednog seta od 4 ili 6 bočica u odnosu na dva do tri seta od 2 bočice svaki, je u činjenici da samo jedna venepunkcija sa sobom nosi manji rizik od kontaminacije, jednostavnija je za izvesti, a kod kliničkih slika gdje je jasno da kožni kontaminanti ne mogu biti proglašeni klinički značajnima (npr. urosepsa), procjena kliničke značajnosti prema broju pozitivnih setova (vidi 4.7.) nije toliko bitna. Kod kliničkih slika gdje bakterijske vrste označene kao kožni kontaminanti (vidi 2.3.) mogu biti i uzročnici infekcije (npr. endokarditis, infekcije povezane uz strano tijelo), bitno je odgovarajući volumen krvi uzeti kroz dva ili više setova (odvojene venepunkcije s različitih mjesta) kako bi se lakše procijenila klinička značajnost nalaza (vidi 4.7.). Prednosti i nedostaci uzimanja istog volumena krvi putem jedne ili više venepunkcija su prikazani u Tablici 2.<sup>24,25,26,38-</sup>

**Tablica 2.** Karakteristike, prednosti i nedostaci uzimanja hemokultura putem jedne ili više venepunkcija

(Adaptirano prema: Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti J-J, Tattevin P. How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the-art. Front Microbiol 2016; 7:697)

	<b>Uzimanje krvi putem više venepunkcija</b>	<b>Uzimanje krvi jednom venepunkcijom</b>
Broj uzimanja krvi (venepunkcija)	2 do 3	1
Ukupan broj inokuliranih bočica	4 do 6	4 do 6
Broj setova	2 do 3	1
Ukupan volumen uzete krvi u 24h	40 mL do 60 mL	40 mL do 60 mL
Osjetljivost	Ista osjetljivost jer je uzet isti volumen krvi bez obzira je li taj volumen uzet jednom venepunkcijom ili višekratnim punkcijama	
Mogućnost kontaminacije	Umjerena (svaka dodatna venepunkcija je dodatna prigoda za kontaminaciju)	Niska
Specifičnost	<p>Veća</p> <p>Lakše procijeniti kliničku značajnost nalaza bakterijskih vrsta koje su česti kontaminanti (vidi 4.7.)</p> <p>Osobito bitno kod endokarditisa i infekcija krvotoka povezanih sa stranim tijelom (intravaskularnim kateterom)</p>	<p>Manja</p> <p>Teže procijeniti kliničku značajnost nalaza bakterijskih vrsta koje su česti kontaminanti</p> <p>Kod mnogih kliničkih slika je jasno da kontaminanti ne mogu imati kliničku značajnost, pa laboratorijski kriterij značajnosti nalaza nije tako bitan</p>
Izvođenje	<p>Skuplje, zahtjevnije</p> <p>Opasnost da se nakon prvog seta od 2 bočice ne uzme i predviđeni drugi i / ili treći set pa uzeti volumen ostane na 20 mL</p>	<p>Jednostavnija metoda, manje radno opterećenje za djelatnike, ugodnije za bolesnika od višestrukih venepunkcija</p> <p>Prije se može započeti s primjenom antimikrobnih lijekova</p> <p>Sigurnije da će se uzeti adekvatan volumen krvi ako se odjednom napuni 4 do 6 bočica</p> <p>Ponekad, osobito kod starijih pacijenata, nije moguće odjednom izvaditi veći</p>

		volumen krvi.
--	--	---------------

### 3.2.3. Vrijeme i mjesto uzimanja hemokultura

Većina smjernica preporučuje uzimanje hemokultura prije primjene antimikrobnih lijekova ili neposredno prije sljedeće doze ili promjene antibiotika, u vrijeme ili oko vremena temperaturnog maksimuma (obično kad temperatura dosegne 38.5°C) uz proizvoljno preporučeni vremenski interval od 30-60 minuta između pojedinih setova ukoliko je moguće toliko odgoditi primjenu antibiotika. Do sada, međutim, u kliničkim studijama nije utvrđeno optimalno vrijeme za uzimanje hemokultura. Općenito, vremenski interval između dva seta hemokultura nije kritični čimbenik. Pokazalo se da je osjetljivost pretrage ista u slučaju kada se dva seta hemokultura uzmu istovremeno ili s razmacima, no uzimanje hemokultura po mogućnosti prije primjene antibiotika znatno povećava osjetljivost pretrage.<sup>38</sup>

Venepunkcija je jedina adekvatna metoda za uzimanje hemokultura. Uzimanje krvi kroz intravaskularni kateter značajno povećava učestalost kultivacije kontaminanata s kože, a i nalaz bakterija u uzorku krvi iz intravaskularnog katetera može često biti odraz kolonizacije katetera, a ne nužno bakterijemije ili kandidemije. Hemokultura se može uzeti kroz intravaskularni kateter samo ako je istovremeno uzeta i hemokultura iz periferne vene što je osobito važno pri sumnji na infekciju krvi povezanu s intravaskularnim kateterom (vidi 3.2.6.).<sup>24-26,41-43</sup>

### 3.2.4. Uzimanje hemokultura kod endokarditisa

Kod sumnje na **endokarditis** je potrebno uzeti tri seta hemokultura. Nije potrebno obraćati pažnju na temperaturni maksimum jer se kod endokarditisa radi o kontinuiranoj bakterijemiji. Uzorke treba uzeti prije antimikrobne terapije i može ih se rasporediti proizvoljno tijekom 24-48 sati osim u slučaju akutnog endokarditisa kada dva seta hemokultura treba uzeti u vremenskom intervalu od 15-30 minuta.

Ako je bolesnik već na antimikrobnoj terapiji, potrebno je prekinuti davanje antimikrobnih lijekova i ponoviti hemokulture nakon vremenskog razdoblja koje odgovara najmanje šesterostrukom poluvremenu eliminacije primijenjenog antibiotika. Ako se ne dobije pozitivan rezultat, hemokulture se mogu ponoviti dva do tri dana kasnije te treba razmotriti mogućnost endokarditisa s negativnim hemokulturama i njegove moguće uzročnike (*Coxiella burnetii*,

*Bartonella* spp., *Tropheryma whipplei*, *Chlamydophila* spp., *Legionella* spp., *Brucella* spp., *Mycoplasma* spp.).<sup>44</sup>

### 3.2.5. Uzimanje hemokultura pri sumnji na kandidemiju

Pri sumnji na kandidemiju preporučuje se uzeti dva do tri seta hemokultura pri čemu se u setu uz aerobnu i anaerobnu bočicu može dodati i treća bočica posebno namijenjena uspješnijem porastu gljiva (npr. Bactec Mycosis IC/F). Hemokulture treba nastavljati uzimati svakodnevno dok traje sumnja na kandidemiju. Kod novorođenčadi i pedijatrijskih bolesnika u pogledu preporučenog volumena krvi vrijedi kao što je navedeno ranije pod 3.2.1.<sup>35,45</sup>

### 3.2.6. Uzimanje uzoraka pri sumnji na infekciju krvotoka povezanu s intravaskularnim kateterom

Za utvrđivanje infekcije krvotoka povezane s intravaskularnim kateterom uglavnom se koriste sljedeća tri pristupa:

#### a) Vrijeme do pozitiviteta hemokulture

Kada se kao kriterij koristi vrijeme do pozitiviteta hemokulture potrebno je istovremeno uzeti krv za hemokulturu iz periferne vene i iz katetera. Ukoliko je u hemokulturama uzetima s oba mjesta porastao isti mikroorganizam a uz to je hemokultura uzeta iz katetera postala pozitivna >2 sata prije negoli hemokultura uzeta iz periferne krvi, najvjerojatnije se radi o infekciji krvotoka povezanoj s intravaskularnim kateterom.

#### b) Kultura vrha katetera

Metoda po Makiju temelji se na uzimanju hemokulture iz periferne vene te kulturi distalnog dijela katetera (5 cm) nakon odstranjivanja. Ova semi-kvantitativna metoda sastoji se u valjanju distalnog dijela katetera po površini krvnog i čokoladnog agara te stavljanju u bujon (npr. tioglikolatni). Značajnim se smatra  $\geq 15$  CFU nakon 48 sati inkubacije na 37°C u aerobnim uvjetima. Nedostatak ove metode je otkrivanje prisutnosti mikroorganizama na vanjskoj a ne i onih na unutarnjoj površini katetera. Iako se ova metoda najčešće koristi te iako je samo 15 % infekcija krvotoka povezanih s intravaskularnim kateterima endoluminalnog podrijetla, postoje i metode koje omogućuju otkrivanje mikroorganizama u lumenu katetera pri čemu se nalaz izražava kvantitativno i pozitivnim se smatra nalaz  $\geq 10^3$  CFU/mL. Kvalitativno nasađivanje vrha

katetera je prilično zahtjevno i nosi sa sobom mogućnost kontaminacije pri manipulaciji te je semi-kvantitativna obrada puno raširenija u kliničkim mikrobiološkim laboratorijima.

### c) Kvantitativne hemokulture

Infekcija krvotoka povezana s intravaskularnim kateterom definirana ovom metodom temelji se na broju kolonija poraslim iz krvi uzete iz katetera koji je najmanje tri puta veći od broja kolonija u krvi dobivenoj iz periferne vene. Za kvantitativno određivanje broja poraslih mikroorganizama iz hemokultura moraju se koristiti posebni sustavi za kvantitativnu ili semi-kvantitativnu kultivaciju mikroorganizama u krvi.<sup>24.-26,41,46</sup>

### 3.2.7. Ponavljanje prethodno pozitivnih hemokultura u svrhu praćenja uspješnosti liječenja

Ponovno uzimanje hemokultura kod bolesnika kod kojih su prethodno bile pozitivne indicirano je u specifičnim slučajevima dok kod većine bolesnika za to u literaturi nema čvrstih dokaza te stvara nepotrebne dodatne troškove. Unatoč tome, zbog rizika od ozbiljnih komplikacija koje se mogu pojaviti kod bolesnika s perzistentnom bakterijemijom, osobito kod teških bolesnika, kliničari često indiciraju ponovno uzimanje hemokultura.

U slučaju **bakterijemije**, ponavljanje prethodno pozitivnih hemokultura je opravdano u slučajevima:

- bolesnika s endovaskularnom infekcijom (npr. bolesnici s endokarditisom, tromboflebitisom, implantabilnim kardioverter-defibrilatorom, kateterom za epiduralni pristup, vaskularnim presatkom)
- bakterijemije uzrokovane sa *Staphylococcus aureus* bez obzira radi li se od meticilin-osjetljivom (MSSA) ili meticilin-rezistentnom (MRSA) izolatu, pri čemu se kod ponavljajuće bakterijemije preporuča učiniti transezofagealni ultrazvuk, zbog čestih slučajeva endokarditisa u tijeku stafilokokne bakterijemije
- bakterijemije uzrokovane multirezistentnim bakterijama
- perzistiranja vrućice, leukocitoze ili ostalih znakova infekcije 72 sata nakon odgovarajuće antimikrobne terapije
- infekcije krvotoka povezane s intravaskularnim kateterom jer o rezultatu ponovljenih hemokultura ovisi odluka o trajanju antimikrobnog liječenja, odstranjivanju te uvođenju novog katetera



- infekcije na mjestima gdje antibiotici otežano prodiru, npr. apscesi, infekcije zglobova
- bakterijemija nepoznatog izvora jer u slučaju da bakterijemija perzistira potrebno je nastaviti tražiti izvor infekcije.<sup>47-50</sup>

**Kandidemija** dokazana pozitivnom hemokulturom je apsolutna indikacija za ponavljanje hemokulture. Ono je potrebno kako bi se utvrdio završetak kandidemije budući antifungalno liječenje treba trajati 14 dana od njenog završetka (odnosno od prve negativne hemokulture). Zbog toga je potrebno svakodnevno (ili barem svakih 48 sati) uzimati barem jedan set hemokultura. Od ostalih pretraga preporučuje se transezofagealni ultrazvuk te pregled fundusa oka kako bi se isključila diseminacija i zahvaćenost organa.<sup>51</sup>

### 3.2.8. Postupak uzimanja hemokultura

Tijekom cijelog postupka potrebno je primjenjivati aseptičnu tehniku. Krv za hemokulture se vadi iz vena, ne iz arterija (osim iznimno ako je stanje pacijenta takvo da nije moguće izvaditi krv iz vene). Kod hemokultura izvađenih iz intravaskularnih katetera i portova je zabilježen veći stupanj kontaminacija nego kod onih izvađenih iz vena.

Iako je postupak zamjene igle između venepunkcije i inokulacije bočice bio povezan s nešto manjim stopama kontaminacije, ovakav postupak se danas ne preporučuje zbog povećanog rizika ubodnog incidenta.

Korištenje nove tehnike ISDT (prema engl. *initial specimen diversion technique*) prilikom vađenja krvi za hemokulturu, kojim se odbacuje prvi mililitar krvi u kojem su najčešće prisutne kontaminante, moglo bi imati utjecaj na smanjenje kontaminacija.<sup>26,52-54</sup>

#### **Postupak vađenja uzorka krvi uključuje sljedeće:**

Osoba koja vadi krv treba nositi kiruršku masku te dezinficirati ruke (trenutak za higijenu ruku broj 2) i neposredno prije punktiranja navući nesterilne rukavice. Nakon što je određeno mjesto venepunkcije, potrebno je prebrisati gumeni čep bočice za hemokulturu vatom namočenom alkoholnim dezinficijensom i ostaviti da se osuši na zraku. Nakon toga je potrebno dezinficirati odabrano mjesto venepunkcije: prebrisati vatom namočenom alkoholnim dezinficijensom kružnim potezima od sredine prema periferiji, ostaviti da se osuši na zraku 1 minutu i ponoviti postupak dva puta. Nakon što je dezinficirano mjesto venepunkcije, više se ne smije palpirati vena, odnosno ako se to učini, treba ponoviti postupak dezinfekcije kože.<sup>55</sup>

Venepunkciju je najbolje obaviti preko adaptera koji se neposredno prije venepunkcije spoji s „butterfly“ sistemom za vađenje krvi. Ako takvi sistemi nisu dostupni, moguće je krv vaditi i inokulirati iglom i špricom, samo u tom slučaju treba prvo inokulirati anaerobnu bočicu, pa onda aerobnu (vidi Tablicu 3.) Bočice s inokuliranom krvi je potrebno nježno preokrenuti nekoliko puta da se spriječi zgrušavanje krvi. Nakon obavljenog postupka treba skinuti rukavice i dezinficirati ruke (trenutak za higijenu ruku broj 3).<sup>26,56,57</sup>

**Tablica 3.** Vađenje uzorka krvi za hemokulturu

Igla i šprica	„Butterfly“ set za uzimanje krvi
<ul style="list-style-type: none"> <li>- postaviti iglu na špricu</li> <li>- ne ponovno palpirati venu</li> <li>- ubosti venu na predviđenom mjestu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- spojiti „butterfly“ set za uzimanje krvi na kapicu adaptera</li> <li>- ne ponovno palpirati venu</li> <li>- ubosti venu na predviđenom mjestu</li> </ul>

Inokulacija bočica za hemokulturu

Igla i šprica	„Butterfly“ set za uzimanje krvi
<ul style="list-style-type: none"> <li>- prikupiti uzorak krvi</li> <li>- prenijeti krv u bočice, započevši s <b>anaerobnom</b> bočicom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- postaviti kapicu adaptera preko <b>aerobne</b> bočice i pritisnuti kako bi igla prošla kroz gumeni čep</li> <li>- bočicu držati uspravno ispod razine pacijentove ruke i paziti da se napuni krvlju točno do označene linije (10mL za odrasle)</li> <li>- kada je aerobna bočica inokulirana, bočicu izvaditi iz adaptera i umetnuti anaerobnu bočicu</li> <li>- ako se venepunkcija koristi za istovremeno vađenje krvi za druge analize, prvo treba uzeti krv za hemokulture, a potom za ostale pretrage</li> </ul>

### 3.3. POHRANA I TRANSPORT UZORAKA

Bočice za hemokulturu potrebno je dostaviti što prije (barem u roku od četiri sata) u laboratorij odnosno, što prije uložiti u uređaj za inkubaciju hemokultura, koji se može nalaziti i izvan laboratorija. Ukoliko to nije moguće, potrebno je inokulirane bočice do stavljanja u uređaj pohraniti na sobnoj temperaturi u periodu kojeg preporučuje proizvođač bočica (BioMerieux do 24 sata, BD ovisno o vrsti bočica do 12-20 sati ako su bočice prije stavljanja u uređaj prethodno

inkubirane na 35-37°C odnosno do 48 sati bez prethodne inkubacije). Bočice za hemokulturu se ne smiju čuvati u hladnjaku ili smrzavati.<sup>26,56,58</sup>

Studije su pokazale da automatizirani sustavi neće detektirati bakterije kao što su *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp. kao niti kvasce ukoliko se bočice kod odgođenog transporta čuvaju na 35-37 °C na odjelu („pre-inkubiraju“) prije dostave u mikrobiološki laboratorij. Osim lažno-negativnih rezultata, „pre-inkubacija“ može dovesti i do produženog vremena do pozitiviteta takve bočice.<sup>26,59,60</sup>

Uzorci moraju zadovoljiti kriterije za uzimanje i transport uzoraka, na svakoj bočici mora biti naznačeno ime i prezime pacijenta, datum i vrijeme vađenja krvi. Identifikacija osobe koja je vadila krv može biti na samoj bočici i/ili na uputnici. Kod više bočica istog pacijenta potrebno je naznačiti koje bočice pripadaju istom uzorku / setu (sve bočice inokulirane istovremeno iz istog mjesta venepunkcije, vidi 2.3.).

Hemokulture su hitni uzorci te se moraju uložiti u uređaj za inkubaciju hemokultura unutar 30 min od zaprimanja u laboratorij.

Bočice se smatraju pozitivnima i prije ulaganja u aparat ako sadržaj pokazuje znakove hemolize, замуćenosti, povišenog tlaka (ispupčeni gumeni čep/septum), te nešto od sljedećeg:

- senzor na dnu bočice žute boje (BioMerieux),
- krv boje čokolade, lizirana i/ili vrlo tamna krv u aerobnoj podlozi BD BACTEC Plus Aerobic/F (BD).<sup>56,58</sup>

Kod takvih bočica treba odmah napraviti subkulturu i mikroskopski preparat. Na svaki radni listić treba staviti inicijale kao potvrdu da je bočica pregledana kod zaprimanja.



**Slika 1.** Razlika između pozitivne i negativne bočice prema promjeni boje na senzoru na dnu bočice

### 3.4. KRITERIJI ZA ODBACIVANJE UZORAKA

Hemokulture predstavljaju dragocjeni klinički uzorak te prije odbacivanja treba kontaktirati odjel i o tome obavijestiti nadležnog liječnika. Ako se propust ne može ispraviti, zaprimljene hemokulture se odbacuju u sljedećim slučajevima:

- neobilježene bočice
- razbijene i oštećene bočice
- bočice koje propuštaju (cure)

## 4. ANALITIČKA FAZA

### 4.1. Hranjivi mediji u bočicama za hemokulturu

Bočice za hemokulturu se razlikuju po tipu i udjelu različitih dodataka i antikoagulansa, volumenu bujona, sastavu atmosfere iznad bujona i prisutnosti spojeva koji neutraliziraju antimikrobne tvari. Da se ukloni antibakterijsko djelovanje ljudske krvi potreban je omjer krvi i bujona od 1:15. Ukoliko se ne zadovolji odgovarajući omjer krvi i bujona, rezultat može biti lažno negativna kultura. Taj omjer se smanjuje na 1:5 i 1:10 dodatkom 0.05 % natrij polianetol sulfonata (SPS). SPS je najčešće upotrebljavani antikoagulans u bujonu bočica za hemokulturu. Njegova koncentracija je različita i varira u rasponu od 0.0125 % do 0.05 % ovisno o proizvođaču. SPS podržava rast većine bakterija inhibirajući baktericidni učinak seruma, fagocitozu stanica, neke antibiotike kao npr. aminoglikozide te inaktivirajući komplement i lizozim. SPS može, međutim, inhibirati porast nekih bakterijskih vrsta uključujući *Neisseria* spp., anaerobne koke, *Streptobacillus moniliformis*, *Capnocytophaga* spp. i *Gardnerella vaginalis*.<sup>61,62</sup>

Mediji za hemokulture sadrže i razne adsorbense kao što su kationske izmjenjivačke smole (rezini) i ugljen. Njihova primarna uloga je neutralizacija antimikrobnih lijekova unesenih u bočicu s bolesnikovom krvi, ali se smatra da rezini također omogućuju adsorpciju inhibitora bakterijskog rasta i mehaničku lizu stanica iz kojih će se osloboditi bakterije.<sup>13,15</sup>

Kod komercijalnih bujona za hemokulture, kakvi su danas u uporabi, neophodno je strogo poštivati preporuke proizvođača o volumenu krvi koji se treba inokulirati u svaku bočicu, što je obično naznačeno linijom do koje treba napuniti bočicu.

### 4.2. Atmosferski uvjeti inkubacije

Uobičajeno se jednim uzorkom inokulira bočica s aerobnim i jedna bočica s anaerobnim medijem. Ako se i radi o infekciji pri kojoj se ne računa na anaerobne bakterije kao moguće uzročnike, uputno je uzeti set aerobne i anaerobne bočice jer su mnoge medicinski važne bakterije fakultativni anaerobi i nekad brže porastu u anaerobnom mediju. Osim toga, set aerobne i anaerobne bočice se uzima i zbog minimalnog potrebnog volumena krvi (20mL) te u slučaju da se ne uzima anaerobna bočica, svakako u setu treba inokulirati najmanje dvije aerobne bočice.<sup>24,26</sup>

### 4.3. Vrijeme inkubacije

Za manualno obrađivane hemokulture preporučavala se inkubacija u trajanju od 7 dana na temperaturi 35-37 °C. Danas, uz korištenje automatiziranih sustava, dovoljna je inkubacija u trajanju od 5 dana koja omogućuje izolaciju i zahtjevnijih uzročnika kao što su *Brucella* spp., *Capnocytophaga* spp., *Campylobacter* spp., nutritivne varijante streptokoka (*Abiotrophia* spp. i *Granulicatella* spp.) i bakterije HACEK grupe (*Haemophilus* spp., *Actinobacillus* spp., *Cardiobacterium* spp., *Eikenella* spp. i *Kingella* spp.).<sup>63,64</sup>

Mnoge publikacije navode da je dovoljno četiri, neke navode čak i tri dana da se iz automatiziranih sustava izolira 95% do 97% klinički značajnih bakterija i kvasnica. Uz sve navedeno, preporuka je da se hemokulture rutinski inkubiraju pet dana u automatiziranim sustavima, a kod sumnje na posebno zahtjevne ili spororastuće mikroorganizme potrebna je konzultacija kliničara s mikrobiologom prije dostave uzorka, radi eventualne produžene inkubacije.<sup>20,57,65-67</sup>

### 4.4. Manualno obrađivanje hemokultura

Prije pojave uređaja za automatiziranu inkubaciju hemokultura, hemokulture su se obrađivale manualno, što će biti opisano u ovom poglavlju za slučaj kada uređaj za automatiziranu obradu možda privremeno neće biti dostupan.

Nakon inokulacije sa krvi, bočice se inkubiraju na 35°C u termostatu, tijekom sedam dana pri čemu se dnevno vizualno ispituje prisutnost znakova bakterijskog rasta u svakoj bočici. Promjene koje ukazuju na rast bakterija u bujonu hemokulture su zamućenje, hemoliza, promjena boje i proizvodnja plina.<sup>57,68</sup>

#### 4.4.1. Postupanje s pozitivnim bočicama

Ukoliko je bočica pri vizualnoj inspekciji makroskopski pozitivna, procesira se kao što je to opisano u poglavlju 4.6.<sup>57,68</sup>

#### 4.4.2. Postupanje s negativnim bočicama

Ukoliko je bočica pri vizualnoj inspekciji makroskopski negativna, subkultivira se prema shemi u Tablici 4.<sup>57,68</sup>



**Tablica 4.** Manualna obrada negativnih hemokultura

Dan inkubacije	Tip bočice	Medij	Uvjeti inkubacije
1	aerobna, pedijatrijska	KA  ČA ili KA + stafilokokna crta	CO <sub>2</sub> , 35°C/24-48 h
2 & 5	aerobna, pedijatrijska	KA  ČA ili KA + stafilokokna crta	CO <sub>2</sub> , 35°C/24-48 h
	anaerobna	BA	anaerobni uvjeti, 35°C/48 h

KA = krvni agar; ČA = čokoladni agar; BA = Brucella agar

Prilikom subkulture radi se i preparat po Gramu.

#### 4.5. Automatizirani sustavi za inkubaciju hemokultura

Od 1990. godine dostupni su automatizirani sustavi koji kontinuirano prate porast mikroorganizama u svakoj inokuliranoj bočici hemokulture koja se inkubira u uređaju. Najčešće se koriste BacT/ALERT (BioMerieux) i BACTEC (BD) sustavi. Primjena ovih sustava u usporedbi s dotadašnjom manualnom obradom hemokultura povećala je uspješnost i brzinu detekcije bakterijskog rasta u hemokulturama budući se bočice u uređaju neprestano okreću i sadržaj u njima se na taj način miješa, a bakterijski rast se neprestano prati očitavanjem svakih 10 minuta.<sup>69</sup> Većina sustava za kontinuirano praćenje se bazira na detekciji porasta proizvodnje CO<sub>2</sub> kao rezultata metabolizma bakterija koje se umnažaju ukoliko su prisutne u uzorku. Za svaki od sustava su dostupne bočice s različitim medijima, uključujući aerobne i anaerobne sa ili bez aditiva dizajnirane da što bolje oporave mikroorganizme. Detekcija rasta u sustavima je slična. Na dnu bočice za hemokulturu se nalazi senzor koji je od tekućeg medija odvojen membranom selektivno permeabilnom za CO<sub>2</sub>. Kako mikroorganizmi aktivnim metabolizmom proizvode CO<sub>2</sub>, on difundira preko membrane, istiskuje vodikove ione, dovodi do zakiseljavanja senzora koje rezultira promjenom boje što se detektira kolorimetrijski ili fluorometrijski, ovisno o sustavu. Fotoosjetljiva dioda osvjetljava senzor svakih 10 minuta. Reflektiranu svjetlost hvata foto detektor. Promjena u intenzitetu signala je proporcionalna pomaku emisije boje senzora koja je pak povezana s količinom otopljenog CO<sub>2</sub> u mediju. Podaci se skupljaju i prebacuju u računalo



koje pomoću algoritama analizira podatke i prepoznaje povišenje proizvodnje CO<sub>2</sub>. Bočice koje zadovoljavaju kriterije za značajan porast CO<sub>2</sub> uređaj označuje kao pozitivne.<sup>56,58,70-77</sup>

**Tablica 5.** Karakteristike automatiziranih sustava za kontinuirano praćenje hemokultura

Sustav	BacT/ALERT	BACTEC	VersaTREK
Proizvođač	bioMerieux	BD Diagnostic Systems	Trek Diagnostic Systems
Indikator rasta	Proizvodnja CO <sub>2</sub>	Proizvodnja CO <sub>2</sub>	Proizvodnja CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> i N <sub>2</sub> , potrošnja O <sub>2</sub>
Signal za pozitivnu HK	Vizualni i zvučni signal	Vizualni i zvučni signal	Vizualni i zvučni signal
Frekvencija provjere bočica	Svakih 10 min	Svakih 10 min	Svakih 12 min za bočice s mješanjem, 24 min za stacionarne bočice
Volumen krvi	10 ml, 4 ml za pedijatrijske bočice	10 ml, 5 ml za pedijatrijske bočice	max 5 ml (40 ml bočica), max 10 ml (80 ml bočica), min 0.1 ml
Dodatne indikacije	Nasađivanje drugih primarno sterilnih tekućina		

#### 4.6. Postupak s pozitivnim bočicama

Prebrisati gumeni čep vatom namočenom u alkoholni dezinficijens i ostaviti da se osuši na zraku. Sterilnom iglom i špricom ili „iglom za vađenje krvi iz pozitivne HK sa tupim završetkom“, probiti gumeni čep bočice, izvući otprilike 5ml bujona i nasaditi bujon na odgovarajuće podloge (Tablica 5) te napraviti mikroskopski preparat (kapnuti po jednu kap bujona na odgovarajuće podloge, zatim na predmetno staklo i razvući kapljicu u tanki sloj i posušiti preparat). Alternativno, aspirirani bujon se može prvo uštrcati u sterilnu epruvetu i potom ezom nasaditi kao što je gore opisano. Špricu s iglom odbaciti u posudu za oštri infektivni otpad. Preparat obojati po Gramu, te prema mikroskopskom nalazu odrediti daljnje testove (Tablica 7).<sup>78-83</sup>

**Tablica 6.** Presađivanje pozitivnih hemokultura

vrsta bočice	Preporučena podloga za subkultivaciju*	Uvjeti i vrijeme inkubacije
AEROBNA (AE)	Columbia agar + 5% ovčje krvi (KA) Čokoladni agar (ČA) ili KA sa stafilokoknom crtom	CO <sub>2</sub> inkubator; 18-24h
ANAEROBNA (AN)	Columbia agar + 5% ovčje krvi / 2x (KA <sub>AE</sub> i KA <sub>AN</sub> ) Čokoladni agar (ČA) ili KA sa stafilokoknom crtom	KA <sub>AE</sub> , ČA: CO <sub>2</sub> inkubator; 18-24h KA <sub>AN</sub> : lonac za anaerobne uvjete; 18-24h + 24h + po potrebi 48h
DJEČJA	Columbia agar + 5% ovčje krvi (KA) Čokoladni agar (ČA) ili KA sa stafilokoknom crtom	CO <sub>2</sub> inkubator; 18-24h

\* po potrebi, ovisno o kliničkoj slici, može se dodati i selektivna podloga za gljive; kod porasta kontaminanata uz neke kliničke slike uputno je ponovno presaditi hemokulturu na podlogu za gljive

**Tablica 7.** Direktni testovi iz pozitivnih hemokultura ovisno o mikroskopskom nalazu

Mikroskopski nalaz	direktni testovi
Bilo koji uzročnik	MALDI ToF identifikacija  Komercijalni testovi za identifikaciju bakterija iz pozitivnih hemokultura  Brzi test osjetljivosti na antibiotike
Gram pozitivni koki u lančićima ili parovima	Orjentacijski testovi: optohin disk, bacitracin disk, detekcija antigena
Gram negativni diplokokci	Detekcija antigena
miješani oblici bakterija	rijetko na KA i kromogena ploča (Uriselect) ili selektivne ploče Manitol Salt i MacConkey agar

U rijetkim slučajevima uređaj može proglasiti hemokulturu pozitivnom, ali mikroskopski nalaz i subkultura budu negativni. U ovom slučaju je važno pregledati krivulju rasta bočice prije nego što se bočicu proglasi lažno pozitivnom te indicirati drugo sađenje. Uzroci lažno pozitivnog nalaza mogu uključivati probleme sa opremom, volumen krvi puno veći od preporučenog ili krv s velikim brojem leukocita.<sup>56,58</sup>

#### 4.7. Kontaminacija hemokultura

Kontaminacije čine oko 50% svih pozitivnih hemokultura, a razlog čestim kontaminacijama leži u uporabi automatiziranih sustava i visoko kvalitetnih komercijalnih hranjivih medija koji mogu detektirati i mali broj mikroorganizama kakav je čest kod kontaminacija. Prihvatljiva stopa kontaminacije hemokultura je 3%. Kontaminirane hemokulture negativno utječu na zdravlje pacijenta, korištenje resursa i troškove liječenja. Oko polovice pacijenata s lažno pozitivnim hemokulturama je nepotrebno tretirana antibioticima, a s obzirom da su najčešći kontaminanti koagulaza negativni stafilokoki, najčešće nepotrebno primjenjivani antibiotik je vankomicin.<sup>84-93</sup>

Kontaminacije potječu iz različitih izvora: koža pacijenta, oprema za vađenje krvi i prijenos u bočice, ruke osoblja koje vadi krv, okoliš. Stopa kontaminacija je manja kada se uzorci krvi vade iz periferne vene nego kada se vade iz intravenskih katetera. Antiseptika koja se koristi za mjesto venepunkcije ne može biti potpuno učinkovita, jer je 20% bakterija kože smješteno u dubljim

slojevima kože, odnosno folikulima dlaka te žljezdama lojnica i znojnica. Najčešće korišteni antiseptici su proizvodi na bazi alkohola, klorheksidina i joda. U prevenciji kontaminacija, za pripremu kože za venepunkciju su alkoholni proizvodi bolji od ne-alkoholnih.<sup>94-99</sup>

Rutinsko korištenje sterilnih rukavica tijekom venepunkcije u odnosu na korištenje čistih, nesterilnih rukavica smanjuje nešto stopu kontaminacije, ali znatno povećava troškove vađenja hemokultura te se ne preporuča. Također, pad kontaminacije je uočen i kod promjene igle između venepunkcije i inokulacije u bočicu, ali se ne preporuča zbog povećanog rizika od ubodnog incidenata.<sup>100,101</sup>

Zbog manje mogućnosti kontaminacije i lakše manipulacije preporuča se korištenje „butterfly“ sistema s adapterom umjesto igle i šprice. Također, zbog manje mogućnosti kontaminacije, ukoliko se vadi krv za različite pretrage, preporuča se prvo inokulirati bočice za hemokulture, a potom ostale epruvete.<sup>85,102</sup>

#### **4.7.1. Kriteriji za proglašenje izolata kontaminantom**

Pripadnici kožne mikrobiote, od kojih su koagulaza negativni stafilokoki (KNS) najčešći, često kontaminiraju hemokulture, no iznimno mogu predstavljati i prave uzročnike.

U procjeni značajnosti nalaza bakterija koje su česti kontaminanti (vdi 2.3.) najbolje se pokazala procjena na osnovi nalaza istog uzročnika u barem dva ili više setova hemokultura. Stoga je, za razlučivanje kontaminanata od pravih uzročnika, neophodno uzeti najmanje dva seta hemokultura s različitih mjesta venepunkcije (vidi 3.2.2.). Ukoliko organizam raste u jednom od dva seta, najvjerojatnije se radi o kontaminaciji. Ukoliko isti organizam raste u oba seta, radi se najvjerojatnije o infekciji. Ukoliko se uzme više setova, vjerojatnost identifikacije prave infekcije raste s brojem uzetih uzoraka s velikom pozitivnom prediktivnom vrijednošću kada su svi setovi pozitivni.

Nalaz bakterija u jednoj ili više bočica istog seta se nije pokazao tako dobrim prediktorom kontaminacije ili prave bakterijemije. Najbolju interpretaciju kliničke značajnosti pruža kombinacija laboratorijskih kriterija za kontaminaciju i kliničke slike bolesnika, pri čemu su prisutnost stranog tijela (najčešće centralnog venskog katetera) i endokarditisa ključni u razmatranju moguće kliničke značajnosti bakterijskih vrsta koje se smatraju čestim kontaminantima.<sup>102-105</sup>

#### **4.8. Identifikacija izolata i testiranje osjetljivosti na antibiotike**

Postupci identifikacije se ne razlikuju od onih koji se primjenjuju u svrhu identifikacije izolata iz drugih uzoraka. Izvode se u skladu s laboratorijskim postupcima u svrhu identifikacije mikroorganizama.

Testiranje osjetljivosti na antibiotike izvodi se u skladu sa smjernicama Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) i smjernicama Europskog odbora za testiranje osjetljivosti na antibiotike, the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

U skladu s naputcima Odbora, izolate s neobičnom ili neočekivanom rezistencijom (npr. na vankomicin rezistentni *Staphylococcus aureus*, VRSA ili na karbapeneme rezistentne enterobakterije, KRE) potrebno je poslati u Referentni centar Ministarstva zdravstva za praćenje rezistencije na antibiotike.

##### **4.8.1. Brze i automatizirane metode identifikacije bakterija direktno iz pozitivnih hemokultura**

###### **4.8.1.1. MALDI-TOF masena spektrometrija**

U novije vrijeme brzu identifikaciju bakterija poraslih u hemokulturi omogućuje metoda MALDI-TOF (prema engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) masene spektrometrije. Princip metode temelji se na analizi uzorka koji se prvo primjenom matriksa i lasera kristalizira i ionizira pri čemu nastaju pojedinačni ioni koji se nakon ubrzavanja i razdvajanja na osnovu njihovog odnosa mase i naboja (mass-to-charge ratio;  $m/z$ ) analiziraju. Na ovaj način za svaki uzorak dobiva se karakterističan profil mase peptida koji se uspoređuje s profilima u dostupnoj bazi podataka na temelju koje se uzorak odnosno izolat identificira.

Dva su osnovna pristupa kojima se MALDI-TOF masena spektrometrija može primjenjivati kako bi se ubrzala identifikacija bakterija poraslih u hemokulturi: identifikacija direktno iz pozitivne bočice za hemokulturu te možda češće korištena identifikacija iz kratko inkubirane subkulture od nekoliko sati na krutoj podlozi.

Prilikom direktne identifikacije iz bočice za hemokulturu bujon iz bočice potrebno je prethodno obraditi nekim od brojnih dostupnih jeftinijih *in-house* i skupljih komercijalnih (Sepsityper™ kit, Bruker) protokola u svrhu ekstrakcije proteina koji omogućuju identifikaciju u roku od 20

odnosno 40 minuta. Stopa identifikacije ovom metodom može biti do 80% s izuzetkom kvasaca. Identifikacija iz diskretnog porasta nakon kratke inkubacije subkulture na krutoj podlozi ne zahtijeva dodatnu obradu uzorka i omogućuje točnu identifikaciju gram-negativnih bakterija već za četiri sata, a gram-pozitivnih bakterija nakon najmanje šest sati.

MALDI-TOF masena spektrometrija u usporedbi s ostalim automatiziranim metodama za otkrivanje uzročnika u pozitivnim hemokulturama ima prednost u odnosu na cijenu, mogućnost istovremene obrade većeg broja uzoraka te neograničeni panel mikroorganizama koje može identificirati.<sup>106-111</sup>

#### 4.8.1.2. Fluorescencijska hibridizacija *in situ* s PNA probama (PNA/FISH)

PNA/FISH je metoda koja omogućuje brzu identifikaciju gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija te *Candida* spp. direktno iz pozitivne hemokulture. Metoda se temelji na primjeni PNA proba koje se vežu za rRNA specifičnu za pojedini mikroorganizam te su potom vidljive pomoću fluorescentnog mikroskopa a rezultat je dostupan u roku do 90 minuta. Najčešće upotrebljavani komercijalni kit (AdvanDx, Woburn, SAD) može identificirati bakterije *Staphylococcus aureus*, koagulaza negativni stafilokok, *Enterococcus faecalis*, i ostale enterokoke, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* te pet vrsta *Candida* spp. - *Candida albicans/parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. glabrata/krusei*.<sup>112</sup>

Utemeljen na FISH metodi trenutno je dostupan i automatizirani sustav (AcceleratePheno System, Accelerate Diagnostics) koji omogućuje identifikaciju šest gram-pozitivnih (*S. aureus*, *S. lungdunensis*, *E. faecalis*, *E. faecium*, koagulaza negativni stafilokok, *Streptococcus* spp.) i osam gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*) te *C. albicans* i *C. glabrata* u vremenskom roku od oko dva sata. Navedeni sustav omogućuje i određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija široke palete antibiotika za bakterije prisutne u hemokulturi u roku od približno sedam sati.<sup>113</sup>

#### 4.8.1.3. Sustavi temeljeni na *multiplex* PCR i *filmarray* tehnologiji

Posljednjih nekoliko godina na tržištu postoje sustavi temeljeni na *multiplex* PCR i *filmarray* tehnologiji koji omogućuju identifikaciju bakterija i *Candida* spp. direktno iz pozitivne bočice za hemokulturu unutar 1 do 4 sata (FilmArray blood culture identification (BCID) panel, Biofire; Verigene, Nasphere). Komercijalni sustav temeljen na *filmarray* tehnologiji omogućuje identifikaciju ukupno 43 različita patogena uključujući i sedam vrsta *Candida* spp. kao i 10 različitih gena rezistencije. Prednost metode je jednostavna priprema uzorka u trajanju od dvije

minuta jer se svi potrebni reagensi nalaze već pripremljeni unutar kazete koja se s uzorkom stavlja u uređaj a rezultati su dostupni u roku od sat vremena.<sup>114-118</sup>

#### 4.8.2. Direktno otkrivanje uzročnika u uzorcima krvi

Za otkrivanje uzročnika direktno u uzorcima krvi trenutno se najviše očekuje od T2 magnetske rezonance (T2 Biosystems). Metoda se temelji na lizi eritrocita, koncentriranju stanica mikroorganizama i njihovoj lizi nakon čega slijedi amplifikacija DNA pomoću termostabilne polimeraze i specifičnih početnica te detekcija amplifikata aglomeracijom supramagnetskih čestica i T2 magnetske rezonance. T2 magnetska rezonanca ima limit detekcije 1 CFU/mL a panel obuhvaća šest bakterijskih uzročnika *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* te pet vrsta *Candida* spp. - *C. albicans*/*C. tropicalis*, *C. glabrata*/*C. krusei* i *C. parapsilosis*. Rezultat pretrage dostupan je u roku od tri do pet sati. Prema istraživanjima osjetljivost i specifičnost T2 magnetske rezonance za otkrivanje kandidemije je 90% odnosno 98% te prvi rezultati pokazuju i da bi se ova metoda kod kandidemije mogla koristiti i zbog svog prognostičkog značenja.<sup>119</sup>

#### 4.8.3. Testiranje osjetljivosti na antibiotike direktno iz pozitivnih hemokultura

Tradicionalno se vrijeme potrebno za kultivaciju pozitivne hemokulture na hranjivi agar i postavljanje disk difuzijskog testa osjetljivosti iz subkulture na agaru pokušavalo skratiti direktnim nasađivanjem bujona na agar za antibiogram. U doba kad bakterije nisu posjedovale razne mehanizme rezistencije, veća preciznost u izvođenju testa osjetljivosti možda i nije bila neophodna, no u današnje doba neophodno je testiranje osjetljivosti na antibiotike direktno iz hemokultura precizno izvesti sukladno EUCAST standardu (EUCAST Rapid AST directly from blood culture bottles).

Ukratko, 100 - 150 µL bujona pozitivne hemokulture se inokulira na agar ploče za antibiogram (MH ili MH-F, ovisno o vrsti bakterija), najkasnije unutar 18h od pozitivnog signala uređaja za inkubaciju hemokultura. Ploče se inkubiraju pod uobičajenim uvjetima, a vrijednosti promjera zone inhibicije se očitavaju uz otvorenu pokrovnu ploču točno nakon 4, 6 ili 8 sati inkubacije ovisno o tome kako brzo bakterije rastu i momentu kad zone inhibicije postanu jasno vidljive. Ako zone nisu vidljive niti nakon 8h inkubacije test se ne može nastaviti inkubirati već se smatra nevažecim. U tijeku je izrada EUCAST standarda za očitavanje rezultata nakon 24h, no to još nije dostupno u vrijeme izrade ovih smjernica. Granične vrijednosti veličine zone inhibicije se ne očitavaju prema uobičajenoj EUCAST tablici koja vrijedi za standardni antibiogram iz kulture, već

su naznačene u posebnoj EUCAST RAST tablici i strogo su specifične za bakterijsku vrstu, pojedini antibiotik i vrijeme inkubacije te je ograničenje ove metode činjenica da se u doba očitavanja antibiograma mora već znati identifikacija bakterije. Testiranje osjetljivosti direktno iz pozitivne bočice će, stoga, biti ograničeno na primjenu u laboratorijima koji mogu raditi brzu identifikaciju bakterija iz pozitivnih hemokultura (vidi 4.7.1.). Daljnje ograničenje ove metode je da je validirana samo za neke bakterijske vrste (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* i *Acinetobacter baumannii*) i neke antibiotike. Radi se, međutim, o najčešćim bakterijskim vrstama izoliranim u kliničkoj rutini i najvažnijim antibioticima za liječenje kritično bolesnih pacijenata.<sup>120,121</sup>

#### **4.9. Postupak s negativnim bočicama**

Nakon inkubacije od 5 dana, ako uređaj bočicu proglasi negativnom izdaje se nalaz „Kultura ostala sterilna“.

##### **4.9.1. Infektivni endokarditis s negativnim hemokulturama**

Infektivni endokarditis s negativnim hemokulturama može biti posljedica prethodno primijenjenoga antimikrobnog liječenja ili posljedica infekcije teško uzgojivim bakterijama kao što su gram-negativni štapići tzv. HACEK grupe (*Haemophilus spp.*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* i *Kingella kingae*) te intracelularnim bakterijama kao što su koksijela, bartonela i klamidija. Infektivni endokarditis uzrokovan HACEK grupom je rijedak i učestalost u istraživanjima varira od 0,5% do 6,1% infektivnih endokarditisa. Unatoč tradicionalno uvriježenom mišljenju da HACEK grupa bakterija sporo raste, u istraživanjima je pokazano da u automatiziranim sustavima za obradu hemokulture porastu prosječno za 3.4 dana te se produžena inkubacija hemokultura nije se pokazala učinkovitom u izolaciji ovih mikroorganizama.<sup>64</sup>

## **5. POSTANALITIČKA FAZA**

Bočicu s bujonom treba čuvati do izdavanja nalaza i pospremanja izolata.



## 5.1. Izdavanje nalaza

Rezultati hemokultura, bilo pozitivni ili negativni, su od kritične važnosti za pacijenta. Izvještaj kliničaru treba biti brzo dostupan i točan.

### 5.1.1. Negativan nalaz

Nalazi negativnih hemokultura se izdaju nakon isteka punih 5 dana.

### 5.1.2. Pozitivan nalaz

Odmah nakon što uređaj signalizira pozitivnu hemokulturu, označenu bočicu treba što prije obraditi i u što kraćem vremenskom razdoblju odjelnom liječniku usmeno (poželjno i pismeno) javiti preliminarni nalaz (mikroskopski nalaz i/ili brza identifikacija i osjetljivost uzročnika) . Uz usmeno javljanje, potrebno je zapisati na radnom listiću kada je i kome javljen nalaz te kratki sadržaj komunikacije (informaciju o pacijentu koja može imati utjecaja na daljnje vođenje pretrage, dogovorena terapija i sl).

Konačni nalaz se izdaje u pisanom obliku i sadrži:

- mikroskopski nalaz
- identifikaciju uzročnika
- osjetljivost uzročnika na antibiotike ukoliko se radi o klinički značajnom izolatu
- po potrebi komentar nalaza

## 5.2. Vremenske norme

S obzirom na veliki značaj nalaza hemokulture za teško bolesnog pacijenta, bitno je da u svim fazama obrade hemokultura dijelovi procesa ovisni o ljudskom čimbeniku prođu što brže. Tablica 7 prikazuje standardno vrijeme obrade (engl. „*turnaround time*“, TAT) u pojedinim fazama koje se ne bi smjelo prelaziti.

### 5.2.1. Predanalitička faza

Preporuka je da se hemokulture ulože u uređaj za inkubaciju i automatsko očitavanje što je prije moguće, idealno unutar 4 sata od vremena kad je uzorak uzet, a maksimalno do 24 sata pri čemu mogu postojati i specifične preporuke proizvođača uređaja. S obzirom da će vrijeme do pozitiviteta hemokulture biti tim kraće što se prije inokulirana bočica uloži u uređaj za inkubaciju, laboratoriji koji ne rade 24h/7d, mogu razmotriti postavljanje uređaja ispred laboratorija kako bi odjelni djelatnici i izvan redovnog radnog vremena laboratorija mogli ulagati hemokulture u uređaj za inkubaciju.<sup>122,123</sup>

### 5.2.2. Analitička faza

Nakon što uređaj signalizira da je određena bočica pozitivna, potrebno je što prije napraviti preparat obojen po Gramu i subkulturu.<sup>124</sup>

Za identifikaciju izolata očekivani TAT je 24-48 sati, računajući od vremena kada se organizam dobije u čistoj kulturi. Vrijeme potrebno za identifikaciju izolata ovisi o brzini rasta bakterijske vrste.

Za određivanje osjetljivosti, očekivani TAT je 24-48 sati od dovoljnog porasta čiste kulture, što također ovisi o bakterijskoj vrsti.

### 5.2.3. Postanalitička faza

Uključuje izvještavanje i komunikaciju vezane uz mikroskopski nalaz, nalaz kulture te konačni nalaz. Zadaća liječnika mikrobiologa je što ranije izvijestiti odjelnog liječnika o preliminarnim i konačnim rezultatima usmeno i pismeno. Spajanjem laboratorijskog i bolničkog informatičkog sustava brza komunikacija rezultata može biti olakšana, no u slučaju javljanja nalaza hemokultura elektronsko javljanje ne isključuje neophodnost usmenog komuniciranja rezultata.

**Tablica 8.** Standardno vrijeme obrade (engl. „*turnaround time*“, TAT) hemokultura

Proces	Aktivnosti	Vrijeme obrade (TAT)
<b>Predanalitička faza</b>		
Od uzimanja hemokulture do ulaganja u uređaj	uzimanje, transport uzoraka i ulaganje u uređaj	≤ 4 h
<b>Analitička faza</b>		
Od proglašenja bočice pozitivnom do mikroskopiranja, identifikacije i testiranja osjetljivosti	Subkultura	odmah nakon proglašenja bočice pozitivnom
	Bojanje po Gramu	
	Identifikacija	24-48 h
	Testiranje osjetljivosti	24-48 h
<b>Postanalitička faza</b>		
Od zaprimanja do izdavanja negativnog nalaza	Negativan nalaz	nakon 5 dana inkubacije
Od proglašenja bočice pozitivnom do izdavanja nalaza	Pozitivan mikroskopski nalaz	≤ 2 h
	Preliminarna identifikacija	ovisno o primijenjenoj dijagnostičkoj platformi
	Direktni antibiogram	≤ 8 h
	Konačna identifikacija i antibiogram	Istog dana kada su potvrđeni rezultati

## 6.0. OSIGURANJE KVALITETE

Vrijednost dijagnostike bakterijemija uvelike ovisi o odjelnim djelatnicima koji mogu doprinijeti kvaliteti pretrage na sljedeće načine:

- Dosljednim korištenjem aseptičke tehnike uzimanja uzorka
- Pravilnim izborom volumena krvi, broja uzoraka te vremena vađenja hemokultura
- Pravilnim označavanjem seta i vremena uzimanja uzorka na uputnici
- Dobrom procjenom odgovornog liječnika o pravilnoj indikaciji, mogućem uzročniku i interpretaciji rezultata

Odgovornost je kliničkih mikrobioloških laboratorija da pripreme pisane upute o uzimanju hemokultura, provode edukaciju osoblja o uzimanju hemokultura te pružaju povratne informacije osoblju o rezultatima praćenja indikatora kvalitete obrade hemokultura u određenom razdoblju.

Na laboratorijskim djelatnicima je odgovornost da provode unutarnju i vanjsku kontrolu laboratorijskih postupaka uključenih u obradu hemokulture.<sup>125,126</sup>

### 6.1. Unutarnja kontrola kvalitete

Unutarnju kontrolu kvalitete redovito provodi zaduženi djelatnik laboratorija i ona uključuje sljedeće postupke:

- kontrola uređaja – provodi se dnevna kontrola temperature
- kontrola bočica za hemokulture
  - rok trajanja i certifikat proizvođača se provjerava pri primitku
  - kontrola rasta: svaki novi LOT bočica se kontrolira ulaganjem u uređaj pozitivne (u laboratoriju inokulirane) i negativne bočice
- kontrola bojanja uzorka hemokulture po Gramu

Daljnja obrada izolata podliježe kontroli kvalitete pojedinih laboratorijskih postupaka identifikacije i testiranja osjetljivosti izolata.

## 6.2. Vanjska kontrola kvalitete

Svaki laboratorij treba sudjelovati u programu kontrole kvalitete za različite postupke, koji nudi vanjski davatelj usluge. Primjeri davatelja usluga vanjske kontrole kvalitete za široku paletu laboratorijskih postupaka su UK NEQAS i LABQUALITY.

## 6.3. Indikatori kvalitete

U svrhu praćenja kvalitete rada poželjno je pratiti sljedeće indikatore dobre kliničke i laboratorijske prakse:

- Praćenje volumena krvi u bočicama za hemokulture
- Vrijeme od uzimanja hemokulture do vremena ulaganja inokulirane bočice u uređaj
- Za pozitivne hemokulture, vrijeme obrade (TAT) po pojedinom procesu
  - Vrijeme od detekcije u aparatu do vađenja bočica
  - Vrijeme od vađenja bočica do rezultata bojanja po Gramu
- Vrijeme od zaprimanja uzorka do verifikacije gotovih nalaza - ukupno vrijeme obrade (TAT)
- Frekvencija pozitivnih nalaza promptno javljenih na odjel
- Stupanj kontaminacije hemokultura
- Stopa lažno pozitivnih signala uređaja
- Stopa pozitivnih hemokultura (uključeni samo klinički značajni uzročnici)
- Udio dostavljenih pojedinačnih setova od 2 bočice (20 mL krvi) / % pojedinačnog seta od 2 bočice od ukupnog broja setova.<sup>127-140</sup>

## 6.4. Pohrana uzorka

Inokuliranu bočicu hemokulture treba čuvati do izdavanja nalaza i pohranjivanja izolata.

Svi klinički značajni izolati (po jedan izolat od svakog seta hemokultura) se pohranjuju na odgovarajući medij (npr. komercijalni mediji microbank ili cryobank) i upisuju u evidenciju. Vrijeme čuvanja izolata može varirati ovisno o akademskim interesima laboratorija, no u interesu pacijenta mora iznositi najmanje dvije godine.

## 7.0. LITERATURA

1. Clemenceau M, Ahmed-Elie S, Vilfaillot A i sur. Appropriateness of empirical antibiotic prescription for bloodstream infections in an emergency department from 2006 to 2018: impact of the spread of ESBL-producing Enterobacterales. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2021. <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04351-x> [Online ahead of print].
2. Bearman GM, Wenzel RP. Bacteremias: a leading cause of death. *Arch Med Res*. 2005;36(6):646-59.
3. Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med* 2017 Aug 3;377(5):414-417.
4. Dreyer AW. Introduction. U: Azevedo L., ur. Sepsis - An Ongoing and Significant Challenge. *IntechOpen Book Series*; 2012. DOI: 10.5772/50139
5. Seifert H. The Clinical Importance of Microbiological Findings in the Diagnosis and Management of Bloodstream Infections. *Clin Infect Dis* 2009;48(s4), S238–S245.
6. Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA on behalf of the ESCMIDStudy Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis (ESGBIES). Bloodstream infections – standard and progress in pathogen diagnostics. *Clin Microbiol Infect* 2020; 26:142-150.
7. Fitzpatrick F, Turley M, Humphreys H, Smyth E. An after-hours clinical liaison blood culture service - Is it worth it? *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(10);917–921.
8. Hagiya H. No blood culture examinations during off-hours? *Braz J Infect Dis* 2015;19(3);330–331.
9. Van den Poel B, Klak A, Desmet S, Verhaegen J. How small modifications in laboratory workflow of blood cultures can have a significant impact on time to results. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 37(9): 1753–1760.
10. Raoult D, Fournier P.,Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol* 2004;2:151–159.
11. Arena F, Argentieri M, Bernaschi P i sur Real life turnaround time of blood cultures in the clinical microbiology laboratory: results of the first Italian survey, May 2015. *Microbiol Med* 2016 ;31(3):85–88.
12. Blondeau JM, Idelevich EA. The 24-h clinical microbiology service is essential for patient management. *Fut Microbiol* 2018; 13(15):1625–1628.

13. Morton B, Nagaraja S, Collins A, Pennington SH, Blakey JD. A retrospective evaluation of critical care blood culture yield - Do support services contribute to the "weekend effect"? *PLoS ONE* 2015; 10(10), 1–10.
14. Saito T, Iinuma Y, Takakura S, Nagao M, Matsushima A, Shirano M, Ichiyama S. Delayed insertion of blood culture bottles into automated continuously monitoring blood culture systems increases the time from blood sample collection to the detection of microorganisms in bacteremic patients. *J Infect Chemother* 2009; 15(1):49–53.
15. Iidelevich, EA, Seifert, H., Sundqvist i sur. Microbiological diagnostics of bloodstream infections in Europe - An ESGBIES survey. *Clin Microbiol Infect* 2019;25(11):1399-1407.
16. Lamy B, Ferroni A, Henning C, Cattoen C, Laudat P. How to: accreditation of blood cultures' proceedings. A clinical microbiology approach for adding value to patient care. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24:956-963
17. Mareković I. Bakteriemiija, sepsa i sustavne infekcije. U: Beader N, Bedenić B, Budimir A, ur. *Klinička mikrobiologija, odabrana poglavlja*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019, str. 57-63.
18. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM i sur. The clinical significance of positive blood cultures in 1990s; a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 584-602.
19. Lin JN, Tsai Y-S, Lai C-H i sur. Risk Factors for Mortality of Bacteremic Patients in the Emergency Department. *Acad Emerg Med* 2009; 16:749–755.
20. Baron EJ, Weinstein MP, Dunne WM Jr., Yagupsky P, Welch DF, Wilson DM. *Cumitech 1C, Blood cultures IV*. Washington DC: ASM Press; 2005.
21. Aliaga L, Mediavilla JD, Llosá J, C. Rosa-Fraile M. Clinical significance of polymicrobial versus monomicrobial bacteremia involving *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:871–874.
22. Pappas P, Lionakis M, Arendrup M, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 18026.
23. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW i sur. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–810.
24. Lamy B, Seifert H. Septicemia. U: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann J-L, Kahlmeter G, Peigue-Lageuille Helene, Vila J, ur. *European Manual of Clinical Microbiology (SFM/ESCMID)*. Pariz; SFM/ESCMID: 2012; 101-110.



25. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP i sur. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis*; 2013;57.
26. UK Standards for Microbiology Investigations; investigation of blood cultures (for organisms other than Mycobacterium species). *Public Health England* 2019; issue no 8.2: 1-55.
27. Choi J, Esafi S, Chartier LB, van Praet. A quality improvement initiative to decrease the rate of solitary blood cultures in the emergency department. *Acad Emerg Med* 2017; 24:1080-1087.
28. Karch A, Castell S, Geffers C i sur. Defining Reference Range for Blood Culture Rates – an Analysis within the German Hospital Infection Surveillance System (KISS). *Int J Epid* 2015; 44 (Suppl 1): i213, <https://doi.org/10.1093/ije/dyv096.357>
29. Kim EC, Shin JH, Kim S i sur. Number of Blood Cultures per 1,000 Patient Days at University-Affiliated Hospitals in Korea. *Korean Jo Clin Microbiol* 2012;15(2):67.
30. Friedman ND, Braun T, Fallach N, Carmeli Y. Blood Culture Sampling Practices among Internal Medicine Inpatients. *Clin Microbiol Infect Dis* 2017;2(1):1–6.
31. Shapiro NI, Wolfe RE, Wright SB, Moore R, Bates DW. Who Needs a Blood Culture? A Prospectively Derived and Validated Prediction Rule. *J Emerg Med* 2008;35(3):255–264.
32. Arpi M, Bentzon MW, Jensen J, Frederiksen W. Importance of blood volume cultured in the detection of bacteremia, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8(9):838–842.
33. Jonsson B, Nyberg A, Henning C. Theoretical aspects of detection of bacteraemia as a function of the volume of blood cultured. *Apmis* 1993;101(7–12):595–601.
34. Kellog JA, Manzella JP, Bankert DA. Al. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:2181-2185.
35. Huber S, Hetzer B, Crazzolaro R, Orth-Höller D. The correct blood volume for paediatric blood cultures: a conundrum? *Clin Microbiol Infect* 2020; 26:168-173.
36. Gaur AH, Giannini MA, Flynn PM i sur. Optimizing blood culture practices in pediatric immunocompromised patients: evaluation of media types and blood culture volume. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:545-52.

37. Revell P, Doern C. Pediatric blood cultures. U: Dunne Jr WM, Burnham C-AD, ur. The dark art of blood cultures. Washington, DC: ASM Press; 2017, str. 151-62.
38. Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti J-J, Tattevin P. How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the-art. *Front Microbiol* 2016; 7:697.
39. Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. Detection of bloodstream infections in adults: How many blood cultures are needed? *J Clin Microbiol* 2007;45(11):3546–3548.
40. Lamy B, Roy P, Carret G, Flandrois J, Delignette-Muller ML What Is the Relevance of Obtaining Multiple Blood Samples for Culture? A Comprehensive Model to Optimize the Strategy for Diagnosing Bacteremia. *Clin Infect Dis* 2002;35(7):842–850.
41. Towns ML, Jarvis WR, Hsueh PR. Guidelines on blood cultures. *J Microbiol Immunol Infect* 2010;43(4):347-9.
42. Riedel S, Bourbeau P, Swartz B i sur. Timing of specimen collection for blood cultures from febrile patients with bacteremia. *J Clin Microbiol* 2008;46(4):1381–1385.
43. Li J, Plorde JJ, Carlson LG. Effects of volume and periodicity on blood cultures. *J Clin Microbiol* 1994;32(11), 2829–2831.
44. Mainardi J-L, Utili R. Endocarditis. U: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann J-L, Kahlmeter G, Peigue-Lageuille Helene, Vila J, ur. *European Manual of Clinical Microbiology (SFM/ESCMID)*. Pariz; SFM/ESCMID: 2012; 101-110.11-114.
45. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, S. Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP i sur. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18 (Suppl. 7): 9–18.
46. Pien BC, Sundaram P, Raoof N, Costa SF, Mirrett S, Woods CW, Reller LB, Weinstein MP. The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults. *Am J Med* 2010 ;123(9):819-28.
47. Chela HK, Vasudevan A, Rojas-Moreno C, Naqvi SH. Approach to Positive Blood Cultures in the Hospitalized Patient: A Review. *Mo Med*. 2019 Jul-Aug;116(4):313-317.
48. Mushtaq A, Bredell BX, Soubani AO. Repeating blood cultures after initial bacteremia: When and how often? *Clev Clin J Med* 2019; 86 (2): 89-92.

49. Canzoneri CN, Akhavan BJ, Tosur Z, Andrade PEA, Aisenberg GM. Follow-up Blood Cultures in Gram-Negative Bacteremia: Are They Needed? *Clin Infect Dis* 2017;65(11):1776–1779.
50. Tabriz MS, Riederer K, Baran J, Khatib R. Repeating blood cultures during hospital stay: Practice pattern at a teaching hospital and a proposal for guidelines. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(7):624–627.
51. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T *et al*. ESCMID guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18 (Suppl. 7): 19–37.
52. Patton RG, Schmitt T. Innovation for reducing blood culture contamination: initial specimen diversion technique. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4501-3.
53. Rupp ME, Cavalieri R J, Marolf C, Lyden E. Reduction in Blood Culture Contamination Through Use of Initial Specimen Diversion Device. *Clin Infect Dis* 2017;65(2):201–205.
54. Rowley S, Clare S. ANTT: an essential tool for effective blood culture collection. *Brit J Nurs* 2011, 20(14):S9-10.
55. WHO. WHO guidelines on drawing blood : best practices in phlebotomy. World Health Organization 2010;1–105.
56. Dostupno na:  
[https://www.biomerieuxusa.com/sites/subsidiary\\_us/files/blood\\_culture\\_booklet\\_-\\_prn\\_16\\_0097a\\_00\\_mk\\_approved13jul161.pdf](https://www.biomerieuxusa.com/sites/subsidiary_us/files/blood_culture_booklet_-_prn_16_0097a_00_mk_approved13jul161.pdf)
57. Wayne, PA. Principles and procedures for blood cultures; Approved Guideline. CLSI document M47-A. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
58. BACTEC Plus Aerobic/F Culture Vials i BD BACTEC Plus Anaerobic/F Culture Vials. Dostupno na: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=18292>
59. Seegmüller I, Eschenbach U, Kamereck K, Miethke T. . Sensitivity of the BacT/ALERT FA-medium for detection of *Pseudomonas aeruginosa* in pre-incubated blood cultures and its temperature-dependence. *J Med Microbiol* 2004;53(9):869–874
60. Sautter RL, Bills AR, Lang DL, Ruschell G, Heiter BJ, Bourbeau PP. Effects of delayed-entry conditions on the recovery and detection of microorganisms from BacT/ALERT and BACTEC blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1245-1249.

61. Salventi JF, Davies TA, Randall EL, Whitaker S, Waters JR. Effect of blood dilution on recovery of organisms from clinical blood cultures in medium containing sodium polyanethol sulfonate. *J Clin Microbiol* 1979;9(2):248–252.
62. Auckenthaler R, Ilstrup D M, Washington, JA. Comparison of recovery of organisms from blood cultures diluted 10% (volume/volume) and 20% (volume/volume). *J Clin Microbiol* 1989; 15(5):860–864.
63. Petti CA, Bhally HS, Weinstein MP, Joho K, Wakefield T, Reller LB, Carroll KC. Utility of extended blood culture incubation for isolation of *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, and *Kingella* organisms: a retrospective multicenter evaluation. *J Clin Microbiol* 2006;44(1):257-9.
64. Sharara SL, Tayyar R, Kanafani ZA, Kanj SS. HACEK endocarditis: a review. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016;14(6):539-45.
65. Bourbeau PP, Foltzer M. Routine Incubation of BacT / ALERT FA and FN Blood Culture Bottles for More than 3 Days May Not Be Necessary. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5):1–5.
66. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. *Clin Infect Dis* 2005;41:1677–1680
67. Wilson ML, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP, & Reimer LG. Recovery of clinically important microorganisms from the BacT/Alert blood culture system does not require testing for seven days. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;16(1):31–34.
68. Ombelet S, Barbe B, Affolabi D i sur. Best practices of blood cultures in low- and middle-income countries. *Front Med* 2019;6:131.
69. Cockerill FR 3rd, Wilson JW, Vetter EA, Goodman KM, Torgerson CA, Harmsen WS, Schleck CD, Ilstrup DM, Washington JA 2nd, Wilson WR. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis* 2004 ;38(12):1724-30.
70. Aronson MD, Bor DH. Blood cultures. *Ann Int Med* 1987;106(14): :246-253.
71. Bengtsson J, Wahl M, Lursson P. Assessment of the BacT/Alert blood culture system : rapid bacteremia diagnosis with loading throughout the 24 h. *Clin Microbiol Infect* 1993;4(1):33-37.
72. Chandrasekar PH, Brown WJ. Clinical issues of blood cultures. *Arch Inter Med* 1994;154(4): 841-849

73. Dreyer AW, Blood culture systems: From patient to result, Chapter 15 in Sepsis- An Ongoing and Significant Challenge, <http://dx.doi.org/10.5772/50139>
74. Frank U, Malkotsis D, Mlangeni D, Daschne, FD. Controlled clinical comparison of three commercial blood culture systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18(4):248–55.
75. Kirn TJ, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. Controlled clinical comparison of BacT/Alert FA Plus and FN Plus blood culture media with BacT/Alert FA and FN blood culture media. *J Clin Microbiol* 2014;52(3):839–843.
76. Weinstein MP. Current Blood Culture Methods and Systems: Clinical Concepts, Technology, and Interpretation of Results. *Clin Infect Dis* 1996;23: 40–46.
77. Gaibani P, Rossini G, Ambretti S i sur. Blood culture systems: rapid detection – how and why? *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:S13–S15.
78. Barenfanger J, Graham DR, Kolluri L, i sur. Decreased mortality associated with prompt gram staining of blood cultures. *Am J Clin Pathol* 2008; 130(6):870–876.
79. Cunney RJ, McNamara EB, Alansari N, Loo B, Smyth EG. The impact of blood culture reporting and clinical liaison on the empiric treatment of bacteraemia. *J Clin Pathol* 1997;50(12):1010–2.
80. Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: How to obtain, process, report, and interpret. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(6):513–520.
81. Özenci V, Tegmark-Wisell K, Lundberg C, Wretling B Rapid culture and identification: A practical method for early preliminary laboratory diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(2): 177–180.
82. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(3):444-465.
83. Uehara Y, Yagoshi M, Tanimichi Y i sur. Impact of reporting gram stain results from blood culture bottles on the selection of antimicrobial agents. *Am J Clin Pathol* 2009; 132(1):18–25.
84. Denno J, Gannon M. Practical steps to lower blood culture contamination rates in the emergency department. *J Emerg Nurs* 2013;39(5):459–464.
85. Patton RG. Blood Culture Contamination Definitions Can Obscure the Extent of Blood Culture Contamination: A New Standard for Satisfactory Institution Performance Is Needed. *Infect Cont Hosp Epidemiol* 2016;37: 736–738.

86. Dawson S. Blood culture contaminants. *J Hosp Infect* 2014; 87(1):1–10.
87. Bates DW. Contaminant blood cultures and resource utilization. *JAMA* 1991, 265(3), 365.
88. Bekeris LG, Tworek JA, Walsh MK, Valenstein PN. Trends in blood culture contamination: A College of American Pathologists Q-Tracks study of 356 institutions. *Arch Path Lab Med* 2005;129(10):1222–1225.
89. Bentley J, Thakore S, Muir L, Baird A, Lee J. A change of culture: reducing blood culture contamination rates in an Emergency Department. *BMJ Quality Improvement Reports* 2016; 5(1):1–7.
90. Gray JW, Pedler S J. Contamination of blood cultures. *Postgrad Med J* 1992;68(798):301.
91. Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(4):788–802.
92. Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(4):788-802.
93. Richter SS, Beekmann SE, Croco JL, Diekema DJ, Koontz FP, Pfaller MA, Doern GV. Minimizing the workup of blood culture contaminants: implementation and evaluation of a laboratory-based algorithm. *J Clin Microbiol.* 2002 ;40(7):2437-44.
94. Maiwald M, Chan ESY. The Forgotten Role of Alcohol: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Clinical Efficacy and Perceived Role of Chlorhexidine in Skin Antisepsis. *PLoS ONE* 2012; 7(9).
95. Nair A, Elliott SP, Al Mohajer M. Knowledge, attitude, and practice of blood culture contamination: A multicenter study. *Am J Infect Cont* 2017;45(5):547–548.
96. Norberg A, Christopher NC, Ramundo ML, Bower JR, Berma SA. Contamination rates of blood cultures obtained by dedicated phlebotomy vs intravenous catheter. *J Am Med Assoc,* 2003289(6), 726–729.
97. Park WB, Myung SJ, Oh MD i sur. Educational intervention as an effective step for reducing blood culture contamination: A prospective cohort study. *J Hosp Infect* 2015;91:111-116.
98. Alahmadi YM, McElnay JC, Kearney MP i sur. Tackling the problem of blood culture contamination in the intensive care unit using an educational intervention. *Epid Infect* 2015;143(9):1964–1971.

99. Martíne J, Macías JH, Arreguín V, Álvarez JA, Macías AE, Mosqueda-Gómez J. Isopropyl alcohol is as efficient as chlorhexidine to prevent contamination of blood cultures. *Am J Infect Cont* 2017;45(4), 350–353.
100. Spitalnic SJ, Woolard RH, & Mermel LA. The significance of changing needles when inoculating blood cultures: A meta-analysis. *Clin Infect Dis* 1995; 21(5):1103–1106.
101. Kim NH, Kim M, Lee S i sur. Effect of routine sterile gloving on contamination rates in blood culture. *Ann Int Med* 2011; 154(3), 145–152.
102. Dargère S, Cormier H, Verdon R. Contaminants in blood cultures: importance, implications, interpretation and prevention. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(9):964–969.
103. Weinstein MP, Current Blood Culture Methods and Systems: Clinical Concepts, Technology, and Interpretation of Results, *Clin Infect Dis* 1996;23, 40–46.
104. Weinstein MP. Blood culture contamination: persisting problems and partial progress. *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2275-2278.
105. Weinstein MP, Doern GV. A Critical Appraisal of the Role of the Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol* 2011;49(9 Suppl):S26-S29.
106. Dubourg, G., Lamy, B., & Ruimy, R. (2018). Rapid phenotypic methods to improve the diagnosis of bacterial bloodstream infections: meeting the challenge to reduce the time to result. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(9), 935–943.
107. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36: 380-407
108. Idelevich EA, Grunewald CM, Wüllenweber J, Karsten Becker. Rapid identification and susceptibility testing of *Candida* spp. from positive blood cultures by combination of direct MALDI-TOF mass spectrometry and direct inoculation of Vitek 2
109. Martiny D, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry
110. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 2015; 6: 791

111. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, Kostrzewa M. Novel, Improved Sample Preparation for Rapid, Direct Identification from Positive Blood Cultures Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry. *J Mol Diagn* 2011; 13: 701-6.
112. Harris DM, Hata DJ. Rapid identification of bacteria and candida using pna-fish from blood and peritoneal fluid cultures: a retrospective clinical study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013, 12:2
113. Cenci E, Paggi R, De Socio GV, Bozza S, Camilloni B, Pietrella D i sur. Accelerate Pheno™ blood culture detection system: a literature review. *Future Microbiol* 2020 (Epub ahead of print)
114. Banerjee R, Özenci V, Patel R. Individualized Approaches Are Needed for Optimized Blood Cultures. *Clin Infect Dis* 2016;63(10);1332–1339.
115. Ledebøer NA, Lopansri BK, Dhiman N, Cavagnolo R, Carroll KC, Granato PI. Identification of Gram-Negative Bacteria and Genetic Resistance Determinants from Positive Blood Culture Broths by Use of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Multiplex Microarray-Based Molecular Assay. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2460-2472
116. Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, Özenci V. Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2013; 51, 12, 4130-4136
117. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: State of the art. *Clin Microbiol Infect* 2015;21(4):313–322.
118. Idelevich EA, Becker K, Reischl U. New Microbiological Techniques in the Diagnosis of Bloodstream Infections. *Dtsch Arztebl Int* 2018; 115(49):822–832.
119. Clancy CJ, Nguyen MH. T2 magnetic resonance for the diagnosis of bloodstream infections: charting a path forward. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: iv2–iv5.
120. Dubourg G, Lamy B, Ruimy R. Rapid phenotypic methods to improve the diagnosis of bacterial bloodstream infections: meeting the challenge to reduce the time to result. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(9);935–943.
121. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Zone diameter breakpoints for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from blood culture bottles. Version 3.0, 2021. <http://www.eucast.org>.



122. Venturelli C, Righi E, Borsari L i sur. Impact of pre-analytical time on the recovery of pathogens from blood cultures: Results from a large retrospective survey. *PLoS ONE* 2017; 12(1):1–11.
123. Rönnerberg C, Mildh M, Ullberg M, Özenci V. Transport time for blood culture bottles: Underlying factors and its consequences. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76:286–290.
124. Schiffman RB, Meier FA, & Souers RJ. Timeliness and accuracy of reporting preliminary blood culture results: A college of American pathologists Q-Probes study of 65 institutions. *Arch Path Lab Med* 2015;139(5):621–626.
125. Hershey TB, Kahn JM. State Sepsis Mandates- A New Era for Regulation of Hospital Quality. *N Engl J Med* 2017; 376:2311-2313
126. Osuka H, Hitomi S, Oishi T i sur. Trends in the Number and Multiplicity of Blood Culture Submissions in Hospitals in the Minami-Ibaraki Area of Japan. *Gen Med* 2014; 15(1):29–33.
127. Chang J, Park JS, Park S i sur. Impact of monitoring blood volume in the BD BACTECTM FX blood culture system: Virtual volume versus actual volume. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;81(2):89-93.
128. Bouza E, Sousa D, Rodríguez-Crèixems M, Lechuz JG, Muñoz P. Is the volume of blood cultured still a significant factor in the diagnosis of bloodstream infections? *J Clin Microbiol* 2007;45(9):2765–2769.
129. Cockerill FR, Wilson JW, Vetter EA i sur. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis* 2004;38(12):1724–30.
130. Connell TG, Rele M, Cowley D, Buttery JP, Curtis N. How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children’s hospital. *Pediatrics* 2007;119(5):891–6.
131. Gonsalves WI, Cornish N, Moore M, Chen A, Varman M. Effects of volume and site of blood draw on blood culture results. *J Clin Microbiol* 2009;47(11):3482–3485.
132. Hershey TB, Kahn JM. State Sepsis Mandates- A New Era for Regulation of Hospital Quality. *N Engl J Med* 2017;376(24):2311-2313.
133. Mermel LA, Maki DG. Detection of bacteremia in adults: Consequences of culturing an inadequate volume of blood. *Ann Int Med* 1993;119(4):270–272.

134. Garcia RA, Spitzer ED, Beaudry J i sur. Multidisciplinary team review of best practices for collection and handling of blood cultures to determine effective interventions for increasing the yield of true-positive bacteremias, reducing contamination, and eliminating false-positive central line-a. *Am J Infect Control* 2015;43(11):1222–1237.
135. Willems E, Smismans A, Cartuyvels R i sur 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):1–8.
136. Lamy B, Ferroni A, Henning C, Cattoen C, Laudat P. How to: accreditation of blood cultures' proceedings. A clinical microbiology approach for adding value to patient care. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(9):956–963.
137. Vitrat-Hincky V, François P, Labarère J, Recule C, Stahl JP, Pavese P. Appropriateness of blood culture testing parameters in routine practice. Results from a cross-sectional study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Apr;30(4):533-9.
138. Weinstein M P, Mirrett S, Wilson ML, Reimer LG, Reller LB. Controlled evaluation of 5-milliliters versus 10-milliliters of blood cultured in aerobic Bact/Alert blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 1994;32(9):2103–2106.
139. Schmitz RP, Keller PM, Baier M, Hagel S, Pletz MW, Brunkhorst FM. Quality of blood culture testing - a survey in intensive care units and microbiological laboratories across four European countries. *Crit Care* 2013;17(5):R248.
140. Chang J, Park JS, Park S, Choi B, Yoon N S, Sung H, & Kim MN Impact of monitoring blood volume in the BD BACTECTM FX blood culture system: Virtual volume versus actual volume. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;81(2):89–93.