20/21/22 MARZO 2013

PADENGHE SUL GARDA - BS

Workshop Alifax

TECNOLOGIA LIGHT SCATTERING: NUOVO APPROCCIO DIAGNOSTICO AL PAZIENTE CRITICO

Diagnostica batteriologica rapida dei liquidi biologici e CVC

Carla Fontana

FONDAZIONE PTV
POLICLINICO TOR VERGATA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
TorVergata

L'ossessione della rapidità

- La vera sfida per il microbiologo del futuro, non è più solo l'accuratezza e l'appropriatezza, ma arrivare in tempo
- Perchè produrre un referto impeccabile, ma in ritardo serve solo per la storia, non aiuta il clinico e non serve al paziente
- Tutta la spinta e l'innovazione degli ultimissimi anni è stata verso la contrazione dei tempi
- Il TAT è divenuto la nostra guida

Agire sul TAT

Il TAT è una variabile dipendente ed esistono due accezioni del concetto di TAT:

- Il TAT "**clinico**" calcolato dal prelievo al referto, dal prelievo all'outcome (Misura del processo nel suo insieme)
- Il TAT "**metodologico**", o di metodo ossia il tempo della procedura scelta per arrivare a finalizzare un referto (misura delle scelte operate dal microbiologo)
- Su entrambi pesa in maniera significativa la fase preanalitica

Preanalitica

- Il grande balzo in termini di rapidità, ma anche di efficienza è stato poter agire sulla fase preanalitica sotto due aspetti
  - il primo: lavorare i liquidi biologici in mezzo liquido, riducendo all'essenziale la coltura su piastra (notoriamente lenta e poco efficiente) e colmando i danni del trasporto/conservazione del campione
  - il secondo portare tutti o pressocchè tutti i campioni microbiologici in fase liquida

La storia di questo cambiamento

© Med Sci Monit, 2009; 15(2): BR55-60
PMID: 19179962

www.MEDSCIMONIT.COM
Basic Research

La nostra eperienza

Received: 2007.08.14
Accepted: 2008.06.03
Published: 2009.02.01

A novel culturing system for fluid samples

Carla Fontana[1,2 A B C D E F G], **Marco Favaro**[1 B C D F], **Silvia Minelli**[2 B D], **Maria C. Bossa**[2 B D], **Anna Altieri**[2 B D], **Cartesio Favalli**[1,2 G]

[1] Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, "Tor Vergata", University of Rome, Rome, Italy
[2] Clinical Microbiology Laboratories, Polyclinic of Tor Vergata, Rome, Italy

Source of support: Departmental sources

Authors' Contribution:
A Study Design
B Data Collection
C Statistical Analysis
D Data Interpretation
E Manuscript Preparation
F Literature Search
G Funds Collection

Perché non utilizzare il sistema Uro-Quick nel pre-arrichimento routinario di tutti i campioni biologici liquidi?

Il prearricchimento su flaconcino ,condotto in parallelo con tecniche colturali tradizionali.

- **utilizzato con tempi di lettura pari a 235 min/6h, (tali da consentire la stima minima della carica batterica pari a <15 CFU/ml) e sempre in combinazione con lo studio del PAR.**
- **Per valutare e compensare nella coltura gli effetti di terapie antibiotiche impostate prima del prelievo del campione.**

Risultati su 546 campioni

Table 1. Comparative yields of clinically significant isolates of bacteria and yeast.

Specimens	No. of specimens (%)	No. of positive samples by routine culture	No. of negative samples by routine culture	No. of positive samples by URO-QUICK™	No. of negative samples by URO-QUICK™	*p* for URO-QUICK™ vs. routine method
ASB	106 (19.4%)	96	10	96	10	0.99
BAL	63 (11%)	58	5	58	5	0.99
Sputum	139 (25%)	134	5	136	3	0.28
Blood	47 (8%)	0	47	29	18	<0.0000005
PLEF	105 (19%)	18	87	24	81	0.30
CSF	26 (4.7%)	0	26	2	24	0.49
PERF	41 (7.5%)	14	27	16	25	0.49
Other Fluid	19 (3.4%)	3	16	6	13	0.26
Total	**546**	**323**	**223**	**367**	**179**	**0.007**

ASB – endothracheal aspirates; BAL – bronchoalveoar lavage; PLEF – pleural fluid; PERF – peritoneal fluid; CSF – cerebrospinal fluid.

+ 44 positivi

Isolati ottenuti solo con HB&L non da coltura (nei 44 campioni)

Table 2. Bacterial isolates uniquely obtained using URO-QUICK™.

Specimens	Total number of specimens (%)	Specimens uniquely positive by URO-QUICK™ (%)	Isolates (n)
ASB	106 (19.4%)	–	
BAL	63 (11%)	–	
Sputum	139 (25%)	2 (1.4%)	*Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa*
Blood	47 (8%)	29 (61%)	*Sphingomonas paucimobilis, Serratia marcesens, Staphylococcus hominis, Staphylococcus epidermidis SCV* (n=5)*, *Staphylococcus aureus* (n=2), *P. aeruginosa* (n=2), *Oligella ureolyticum, Micrococcus luteus, Moraxella lacunata, Enterococcus faecalis* (n=2), *Escherichia coli* (n=3), *Corynebacterium propinquum, Corynebacterium jeikeium* (n=2), *Clostridium tyrobutiricum, Candida albicans* (n=2), *Campylobacter jejunii, Acinetobacter haemolyticus*
PLEF	105 (19%)	6 (5.7%)	*S. aureus, Rhodotorula glutinis, Bacillus pumilis, Burkholderia cepacia* (n=2), *Burkholderia gladioli*
CSF	26 (4.7%)	2 (7.6%)	*E. coli, S. aureus*
PERF	41 (7.5%)	2 (7.8%)	*Gemella morbillorum, Enterococcus avium*
Other Fluids**	19 (3.4%)	3 (15.8%)	*Acinetobacter baumanni-Klebsiella pneumoniae, Pasteurella multocida, S. aureus*
Total	546	44 (8.0%)	

ASB – endothracheal aspirates; BAL – bronchoalveolar lavage; PLEF – pleural fluid; PERF – peritoneal fluid; CSF – cerebrospinal fluid.
* Small colony variant (SCV); ** Other fluids (19 in total) included synovial fluid (n=5), ascitic fluid (n=9), drainage of infected central venous catheters (n=3), abdominal drainage (n=1), and cholecystic fluid (n=1).

Interessanti le indicazioni fornite dal PAR sui liquidi

- PPV 100% , svelando anche terapie non dichiarate es in casodi meningite

16% dei campioni testati mostravano PAR non allineato alla terapia dichiarata:

- 67% Sensibilità
- 76% NPV

(16%) c'erano alcuni comuni denominatori:

1. **Presenza di anti fungini, metronidazolo, o carbapenemi**
2. **La terapia era stata iniziata/terminata solo nelle 12 h precedenti il prelievo**
3. **Regime terapeutico inappropriato (dosaggi troppo bassi)**
4. **2 casi veri incongruenti in LCR in pazienti in terapia con Vancomicina**

Sorpasso sui tempi

Se campione monomicrobico (post Gram) si può allestire direttamente ID e AST

- Prearricchimento 235 min/6h + centrifugazione e recupero del pellet batterico su cui eseguire direttamente ID AST i tempi si contraggono di -18 ore!!!

Se campione polimicrobico ci arrendiamo??

- La tecnologia degli ultimi anni ci è venuta in aiuto
- Arricchimento H&BL e sequenziamento misto

The resulting product had a size of approximately 460 bp, covering the variable areas V1, V2, V3 and V4 of the 16S rRNA gene

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2008, p. 3766–3771 Vol. 46, No. 11
0095-1137/08/$08.00+0 doi:10.1128/JCM.00213-08

Analysis of Mixed Sequencing Chromatograms and Its Application in Direct 16S rRNA Gene Sequencing of Polymicrobial Samples▽

Øyvind Kommedal,[1,2]* Bjarte Karlsen,[3] and Øystein Sæbø[3]

Department of Microbiology and Immunology, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway[1]; Section for Microbiology and Immunology, the Gade Institute, University of Bergen, Bergen, Norway[2]; and iSentio Ltd., Thormøhlensgate 51, Bergen, Norway[3]

Received 2 February 2008/Returned for modification 4 April 2008/Accepted 23 August 2008

Investigation of clinical samples by direct 16S rRNA gene sequencing provides the possibility to detect nonviable bacteria and bacteria with special growth requirements. This approach has been particularly valuable for the diagnosis of patients who have received antibiotics prior to sample collection. In specimens containing more than one bacterium, direct sequencing gives mixed chromatograms that complicate further interpretation. We designed an algorithm able to analyze these ambiguous chromatograms and implemented it as a Web-based service. The algorithm contains both a new base-calling procedure and a new database search procedure. 16S rRNA gene sequencing was performed on polybacterial suspensions prepared in the laboratory. The computer program identified all bacteria correctly to the species level in 23 out of 23 samples containing two different bacteria. For samples containing three different bacteria, correct identification to the species level was achieved for three out of five and to the genus level for five out of five.

In our opinion, the most important feature of direct 16S rRNA gene sequencing is the possibility to analyze samples collected after the administration of antibiotics. Foci in inter-

unequally, permitting some to grow and not others.

The PCR reaction was optimized to reach a sensitivity of 1-10 genome copies per reaction tube. By spiking of human EDTA blood with different concentrations of bacteria, using the definition of a positive sample described above, the sensitivity of the assay was found to be 2000-4000 genome copies per ml of sample material.

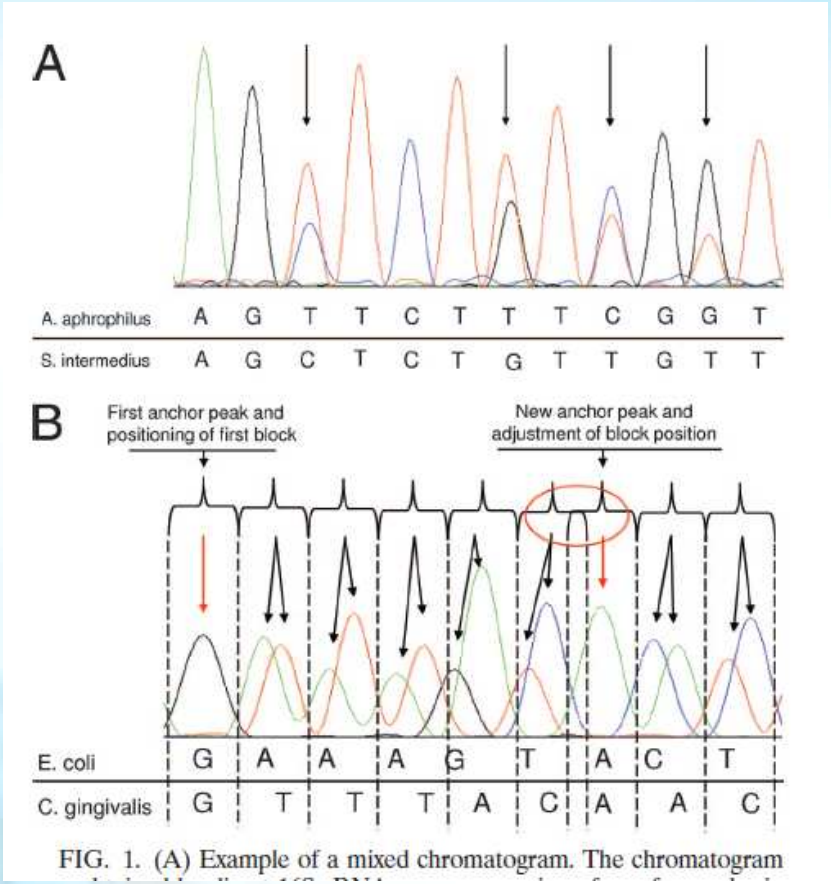


FIG. 1. (A) Example of a mixed chromatogram. The chromatogram

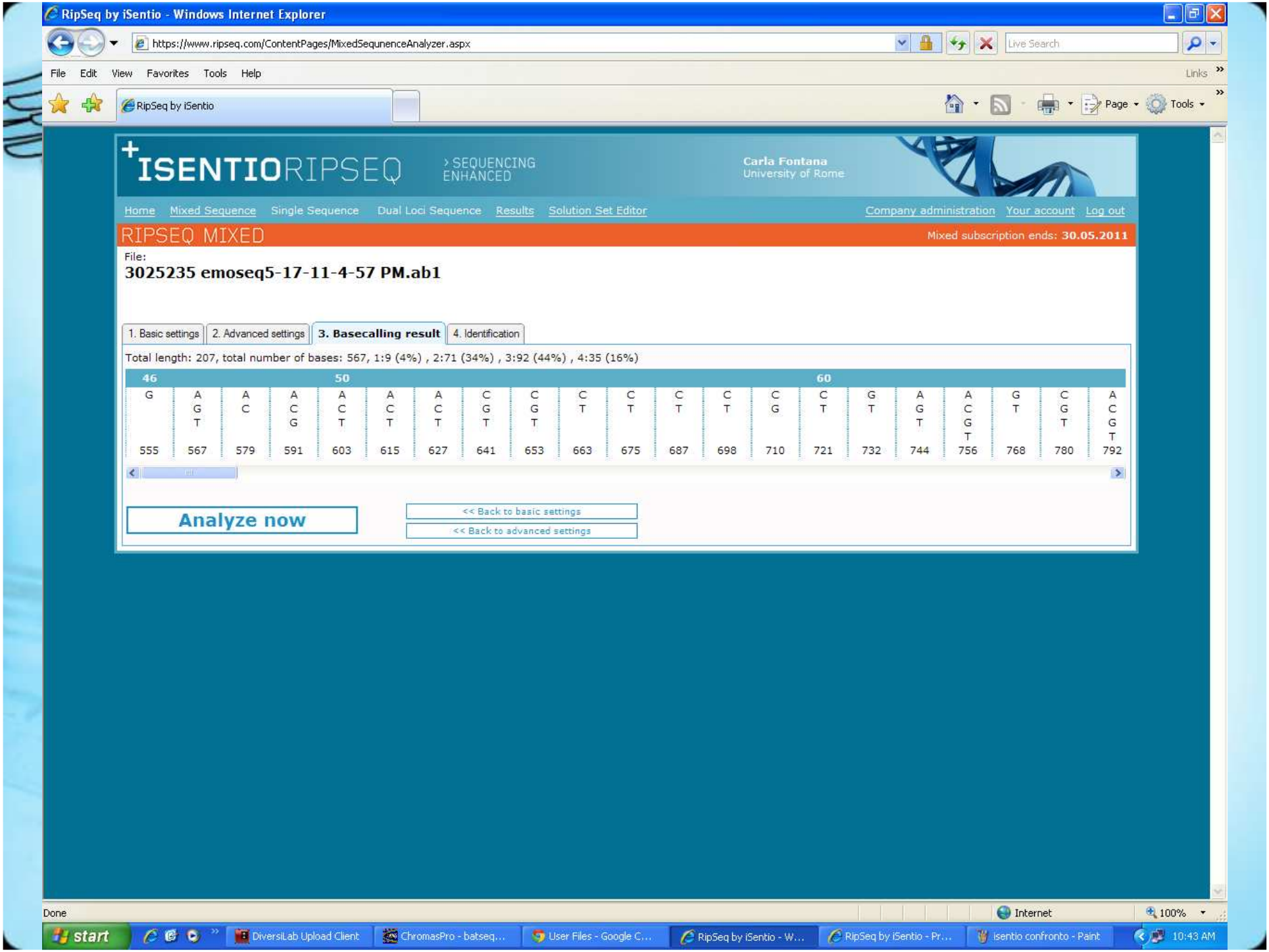
Sequenza diretta da campione polimicrobico, gli elettroferogrammi misti conterranno due o più picchi sovrapposti nelle zone del 16S rDNA variabile e singoli nelle zone conservate.

Risultato il programma trascrive una

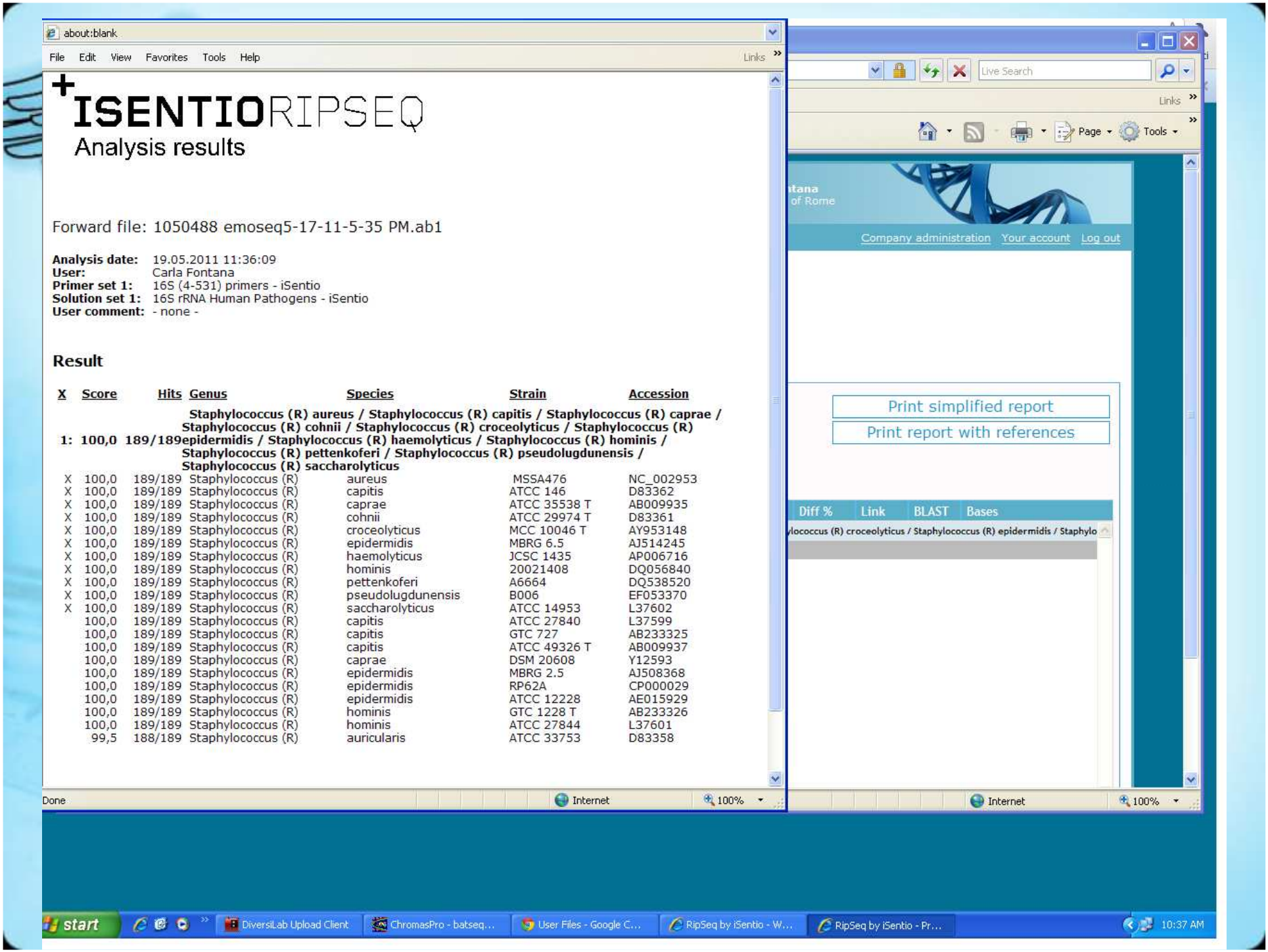
-sequenza normale + 1° base nella zona variabile;

-sequenza normale + 2° base nella zona variabile; ecc

Ovviamente combinando tutte le possibili variabili


RipSeq by iSentio - Windows Internet Explorer
https://www.ripseq.com/ContentPages/MixedSequnenceAnalyzer.aspx
File Edit View Favorites Tools Help
RipSeq by iSentio
ISENTIORIPSEQ
› SEQUENCING ENHANCED
Carla Fontana
University of Rome
Home Mixed Sequence Single Sequence Dual Loci Sequence Results Solution Set Editor
Company administration Your account Log out
RIPSEQ MIXED
Mixed subscription ends: 30.05.2011
File:
3025235 emoseq5-17-11-4-57 PM.ab1
1. Basic settings
2. Advanced settings
3. Basecalling result
4. Identification
Total length: 207, total number of bases: 567, 1:9 (4%) , 2:71 (34%) , 3:92 (44%) , 4:35 (16%)
46
50
60
G
A G T
A C
A C G
A C T
A C T
A C T
C G T
C G T
C T
C T
C T
C T
C G
C T
G T
A G T
A C G T
G T
C G T
A C G T
555 567 579 591 603 615 627 641 653 663 675 687 698 710 721 732 744 756 768 780 792
Analyze now
<< Back to basic settings
<< Back to advanced settings
Done
Internet
100%
start
DiversiLab Upload Client
ChromasPro - batseq...
User Files - Google C...
RipSeq by iSentio - W...
RipSeq by iSentio - Pr...
isentio confronto - Paint
10:43 AM


RIPSEQ MIXED
Mixed analysis left: 8884
File:
emoc 326843-29-11-3-53 PM.ab1
1. Basic settings
2. Advanced settings
3. Basecalling result
4. Identification
X
Score
Hits
Genus
Species
Strain
Accession
Diff %
Link
BLAST
Bases
100,0 344/344 Staphylococcus (F) epidermidis
99,4 342/344 Proteus (F) mirabilis
Petti, C. A., Bosshard, P. P., Brandt, M. E., Clarridge III, J. E., Feldblyum, T. V., Foxall, P., Furtado, M. R., Pace, N. & Procop, G. (2008a). Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; Approved guideline. CLSI document MM18-A, 28. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.
Comment for Save or Submit, if needed:
Save Result
Submit file to support
Re-analyze with new y-cutoff
Signal cutoff (y-coordinate):
150
Result saved OK


about:blank
File Edit View Favorites Tools Help
Links
ISENTIORIPSEQ
Analysis results
Forward file: 1050488 emoseq5-17-11-5-35 PM.ab1
Analysis date: 19.05.2011 11:36:09
User: Carla Fontana
Primer set 1: 16S (4-531) primers - iSentio
Solution set 1: 16S rRNA Human Pathogens - iSentio
User comment: - none -
Result
X Score Hits Genus Species Strain Accession
1: 100,0 189/189 Staphylococcus (R) aureus / Staphylococcus (R) capitis / Staphylococcus (R) caprae / Staphylococcus (R) cohnii / Staphylococcus (R) croceolyticus / Staphylococcus (R) epidermidis / Staphylococcus (R) haemolyticus / Staphylococcus (R) hominis / Staphylococcus (R) pettenkoferi / Staphylococcus (R) pseudolugdunensis / Staphylococcus (R) saccharolyticus
X 100,0 189/189 Staphylococcus (R) aureus MSSA476 NC_002953
X 100,0 189/189 Staphylococcus (R) capitis ATCC 146 D83362
X 100,0 189/189 Staphylococcus (R) caprae ATCC 35538 T AB009935
X 100,0 189/189 Staphylococcus (R) cohnii ATCC 29974 T D83361
X 100,0 189/189 Staphylococcus (R) croceolyticus MCC 10046 T AY953148
X 100,0 189/189 Staphylococcus (R) epidermidis MBRG 6.5 AJ514245
X 100,0 189/189 Staphylococcus (R) haemolyticus JCSC 1435 AP006716
X 100,0 189/189 Staphylococcus (R) hominis 20021408 DQ056840
X 100,0 189/189 Staphylococcus (R) pettenkoferi A6664 DQ538520
X 100,0 189/189 Staphylococcus (R) pseudolugdunensis B006 EF053370
X 100,0 189/189 Staphylococcus (R) saccharolyticus ATCC 14953 L37602
100,0 189/189 Staphylococcus (R) capitis ATCC 27840 L37599
100,0 189/189 Staphylococcus (R) capitis GTC 727 AB233325
100,0 189/189 Staphylococcus (R) capitis ATCC 49326 T AB009937
100,0 189/189 Staphylococcus (R) caprae DSM 20608 Y12593
100,0 189/189 Staphylococcus (R) epidermidis MBRG 2.5 AJ508368
100,0 189/189 Staphylococcus (R) epidermidis RP62A CP000029
100,0 189/189 Staphylococcus (R) epidermidis ATCC 12228 AE015929
100,0 189/189 Staphylococcus (R) hominis GTC 1228 T AB233326
100,0 189/189 Staphylococcus (R) hominis ATCC 27844 L37601
99,5 188/189 Staphylococcus (R) auricularis ATCC 33753 D83358
Done
Internet
100%
Live Search
Links
Page
Tools
of Rome
Company administration
Your account
Log out
Print simplified report
Print report with references
Diff %
Link
BLAST
Bases
Internet
100%
start
DiversiLab Upload Client
ChromasPro - batseq...
User Files - Google C...
RipSeq by iSentio - W...
RipSeq by iSentio - Pr...
10:37 AM

Un esempio

Nella notte: Paziente di 38 aa, arriva endocardite su protesi, febbrile e scompensato operato in urgenza rimossa e inviata la valvola , la vegetazione, tampone della vegetazione (in mezzo liquido)

Al mattino (7:30): Valvola e vegetazione seguono un percorso tradizionale

Il tampone viene inoculato in HBL
Dopo 3 h già positivo si preleva una aliquota risulta coltura mista: Gram+/Gram-

a 6 h si procede poi con subcoltura

H 7:30

11:00 Rip Seq (15 min, 1,5h, 58min, 20 min)

H 17:00 *S.aureus, Burkholderia pyrrocinia*

H 7:30

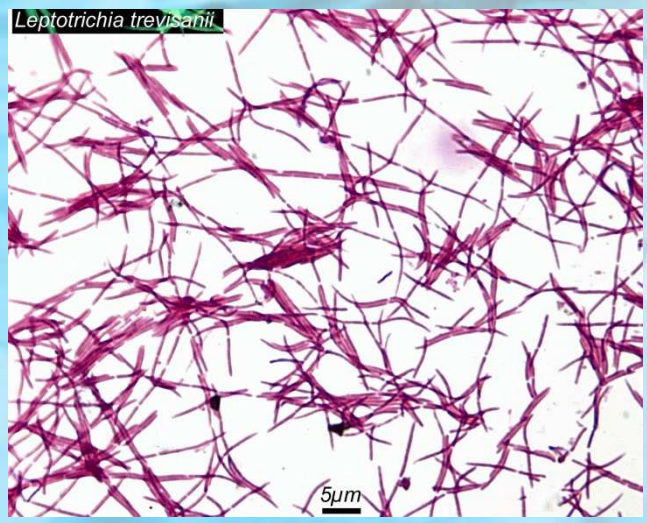
Subcoltura tradizionale con ID + AST a

H 14:30 sub coltura
H 8:00 **del mattino successivo ID AST**
H 19:00 referto

Un altro esempio

- Paziente ematologica 41 aa con ripetute emocolture positive TD medio32.2 (bacilli Gram +)
- Subcolture ripetutamente negative
- H&BL in 6 h sequenziamento diretto e E-test

Leptotrichia trevisanii



La coltura tradizionale su piastra dopo oltre 48h di incubazione dalla subcoltura!
Germe che non avremmo potutoo identificare per via tradizionale

Germi più frequentemente recuperati con HB&L da soli ed in associazione con altri patogeni e persi in coltura tradizionale

CONS scv, Candida,GNNF	CVC
S.aureus, S.pneumoniae	Aspirati/Pus/Emocolture da endocarditi
Candida e C.glabrata	F.peritoneale/Pus/emocolture
Enterobatteri	Respiratori-Aspirati
Gram-neg NF	Pus-Aspirati Respiratori
C.Jk ed altri Corinebatteri	emocolture
B.cepacia	Aspirati
C.coli, C.jejunii	emocolture
Capnocytophaga/Actinomyces	emocolture
H.influenzae	emocoltura/respiratorio
L.monocytogenes, S.pneumoniae, N.meningitidis	LCR
S.bovis	emocolture
E.faecium	Pus

Un altro esempio, in itinere

- Lesioni del piede diabetico
- IDSA 2012 ci indicano la stadiazione, la terapia e i campioni ideali
- Biopsie, frammenti di tessuto profondo
- T. da ferita, da effettuare solo in casi estremi (ma comunque utili se abbinato al Q-score)

2012 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections Benjamin A. Lipsky, et al

Nostri primi risultati?!

- Arricchimento e-swab in H&BL
- Rip seq
- Coltura tradizionale

Coltura tradizionale	H&BL + Rip Seq	
S.aureus	*S.areus*	*Prevotella disiens*
A.baumannii	*A.baumannii*	*Alcaligenes faecalis*
S.epidermidis	*S.epidermidis*	*E.faecalis*
E.faecium	*E.faecium*	*S.aureus*
S.epidermidis	*S.epidermidis*	*Brucella canis*
E.raffinosus	*E.raffinosus*	*C.parapsilosis*
E.coli	*E.coli*	*S.aureus*


HB&L


microflex

Quale il messaggio? :

il tempo è denaro

- Perché si riducono i tempi delle terapie empiriche
- Perché si corregge la terapia e si evitano ulteriori complicanze
- Perché si migliora outcome
- Perché si riducono i giorni di degenza
- Perché si evitano terapie inappropriate che pesano sulla epidemiologia d'ospedale

Altro punto critico CRBSI

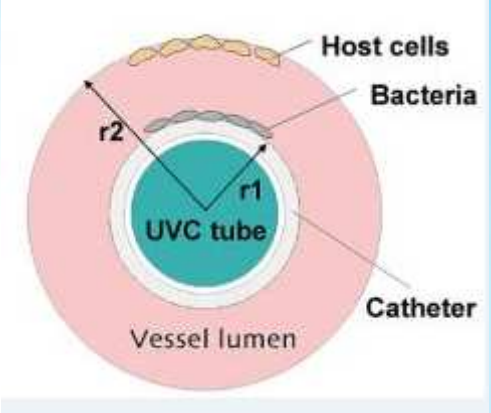
- L'uso dei cateteri venosi centrali (CVC) utilizzo sempre più diffuso.
- pro e cons: facilitano la gestione del paziente vs esposizione al rischio d'infezione

Alcuni numeri

- Si stima che nel >78% ICU patients venga inserito come procedura di routine un CVC
- Circa 15 milioni CVCs sono mediamente inseriti per anno United States e le CRBSI sono ai primi posti fra le HAI circa 250.000 casi per anno di cui 80.000 in ICU, con costi 30,000 – 50,000 $. $2.3 billion annual cost to the U.S. healthcare system.
- incrementa il tasso di mortalità dal 12 al 25%
- Le CRBSI rappresentano da sole circa 87% delle BSI con un infection rate di 4.0-6.9 per 1000 giorni nelle ICU con il goal del CDC di scendere a <2 per 1000 gg catetere

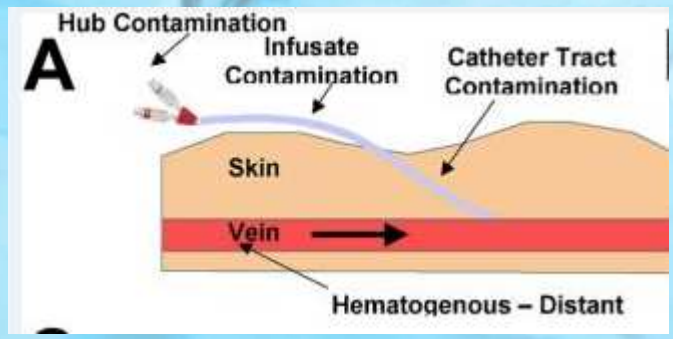
PLoS ONE March 2012
Fletcher SJ: Central venous catheter related infection. Anaesth Intensive Care, 1999; 27: 425
Mermel LA: Prevention of intravascular catheter-related infections. Ann Intern Med 2000; 132: 391–402
Wolf et al Ann Hematol 2005 DOI 10.1007/s00277-008-0509-5
CDC 2011

Vie di infezione



Ci sono 4 vie riconosciute di contaminazione:

- Migrazione dalla cute di organismi fino al sito d'inserzione e fin dentro la superficie interna con la colonizzazione della tip (più comune)
- contaminazione diretta del catetere o dell' hub via mani o con fluidi contaminati o altri devices
- il catetere può essere contaminato via ematogena da altro focus di infezione (meno comune)
- Contaminazione di infusi (rara)



CDC 2011

IDSA GUIDELINES

Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America

Leonard A. Mermel,[1] Michael Allon,[2] Emilio Bouza,[9] Donald E. Craven,[3] Patricia Flynn,[4] Naomi P. O'Grady,[5] Issam I. Raad,[6] Bart J. A. Rijnders,[10] Robert J. Sherertz,[7] and David K. Warren[8]

Table 4. Commonly used clinical definitions of intravascular catheter-related infections.

Infection	Definition
Catheter colonization	Significant growth of ⩾1 microorganism in a quantitative or semiquantitative culture of the catheter tip, subcutaneous catheter segment, or catheter hub
Phlebitis	Induration or erythema, warmth, and pain or tenderness along the tract of a catheterized or re-

Batteriemia/fungemia in un paziente con CVC e con almeno 1 emocoltura positiva con prelievo da VP accompagnata da manifestazioni cliniche quali febbre, brividi e /o ipotensione senza segni apparenti di infezione in altri distretti

Inoltre almeno uno dei seguenti parametri devono essere soddisfatti:

•Coltura CVC positiva con **>15CFU** per tip (se semiquantitativa) e **100CFU** se quantitativa l'isolato deve essere lo stesso da sangue e da coltura del CVC

•Oppure se è stato eseguito prelievo simultaneo VP e CV delta >3:1 nella stima CFU (cCVC vs VP) opure delta nei TD d almeno 2h

	or hypotension), and no apparent source for bloodstream infection (with the exception of the catheter). One of the following should be present: a positive result of semiquantitative (>15 cfu per catheter segment) or quantitative (>10^2 cfu per catheter segment) catheter culture, whereby the same organism (species) is isolated from a catheter segment and a peripheral blood culture; simultaneous quantitative cultures of blood with a ratio of >3:1 cfu/mL of blood (catheter vs. peripheral blood); differential time to positivity (growth in a culture of blood obtained through a catheter hub is detected by an automated blood culture system at least 2 h earlier than a culture of simultaneously drawn peripheral blood of equal volume). Note that this definition differs from the definition of central line–associated bloodstream infection used for infection-control surveillance activities.

NOTE. Adapted in part from Pearson [18]. cfu, colony forming units.

[a] For surveillance purposes, patients with positive results of blood culture would be classified as having central line–associated bloodstream infection.


La diagnosi
• Conservativa
• Non conservativa

A rimozione avvenuta

Table 5.1 Microbiological techniques for diagnosis of CRBSI[78]

Technique	Description	Criteria for positivity	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Methods requiring device removal				
Quantitative catheter tip culture	A distal tip segment of the removed device is flushed with broth or sonicated or vortexed in broth that is further incubated.	≥100 CFU	78-88	87-91
Semi-quantitative catheter tip culture	A 3–4cm distal tip segment of the removed device is rolled across an agar plate and incubated overnight. Unable to culture intraluminal organisms.	>15 CFU	81-89	85-87
Qualitative Catheter segment culture	Incubation of a segment of the removed device in broth media.	Any growth	79-96	72-78

Technique	Description	Criteria for positivity	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Methods not requiring device removal				
Paired quantitative blood cultures	Paired blood cultures obtained through the device and from a separate venipuncture. Labour intensive.	Positive cultures from both sites and concentration of micro-organisms from the device 5 to10-fold higher than from the peripheral venipuncture	74-84	98-100
Unpaired quantitative blood culture	Blood cultures obtained through the device.	≥100 CFU	80-93	83-89
Differential time to positivity	Concomitant conventional qualitative blood cultures obtained from the device and from a separate venipuncture continuously monitored until growth of microorganisms. Currently available with most automated blood culture systems. Hard to interpret when patient is taking antibiotics through the CVC.	Blood culture drawn through the device turns positive ≥120 min before those obtained from venipuncture	86–92	79–87
Acridine-orange leukocyte Cytospin on blood drawn through the device	Staining with acridine orange of a slide from 50µl blood and examined under ultraviolet light. Accuracy may be improved if performed on specimen obtained by endoluminal brushing.	Any microorganism within the cellular [illegible] minimum of 100 high-power field	80–96	89–97
Unpaired qualitative blood culture	Blood cultures obtained through the device.	Any growth	84-98	83-89
Paired qualitative blood cultures	Paired blood cultures obtained through the device and from a separate venipuncture.	Any growth	51-65	78-95
Endoluminal brushing	Culture of sonicated and vortexed brush passed down the internal lumen to the device distal tip. May induce bacteraemia, arrhythmias, embolisation.	≥100 CFU	92-100	84-98
Culture of swabs of skin insertion site and of the hub	Semi quantitative cultures on agar plate.	Any growth	96-100	67-71

conservando

La conservativa quali le procedure più usate ma quali i rischi

CVC e da

e da CVC

OPEN ACCESS Freely available online PLOS one

Catheter Related Bloodstream Infection (CR-BSI) in ICU Patients: Making the Decision to Remove or Not to Remove the Central Venous Catheter

Rodrigo Octávio Deliberato[1]*, Alexandre R. Marra[1], Thiago Domingos Corrêa[1], Marinês Dalla Vale Martino[2], Luci Correa[3], Oscar Fernando Pavão dos Santos[1], Michael B. Edmond[4]

1 Critical Care Unit, Hospital Israelita Albert Einstein, Sao Paulo, Brazil, **2** Microbiology Laboratory Department, Hospital Israelita Albert Einstein, Sao Paulo, Brazil, **3** Infection Control Unit, Hospital Israelita Albert Einstein, Sao Paulo, Brazil, **4** Department of Internal Medicine, Virginia Commonwealth University School of Medicine, Richmond, Virginia, United States of America

Conclusions

In case of CR-BSI it can be expected that prompt catheter removal will result in shorter duration of BSI and improved outcomes [24,25]. In our study there was a no statistically significant difference between the standard and conservative methods in-hospital mortality but there was a trend toward higher mortality rates among patients with CR-BSI diagnosed by the conservative method when the CVC was kept in place for more than 24 h. Further studies should be conducted to confirm this hypothesis.

March 2012 | Volume 7 | Issue 3

Un motivo del ritardo diagnostico

La diagnosi è comunemente basata sul risultato della emocoltura che richiede in genere almeno 48h + i tempi per esecuzione ID AST.

Così il clinico finisce per rimuovere il dispositivo al sospetto clinico e basandosi solo sui sintomi clinici non potendo attendere tempi lunghi della diagnosi conservativa

© Med Sci Monit, 2009; 15(2): SC5-8
PMID: 19179982

Prudenza del clinico = eccessive rimozioni

Venous catheter microbiological monitoring. Necessity or a habit?

Piotr Smuszkiewicz[1ADEFG], Iwona Trojanowska[1AEFG], Hanna Tomczak[2ABCDG]

© Med Sci Monit, 2009; 15(2): SC5-8
PMID: 19179982

Criticita: eccessive rimozioni vs limiti della coltura

1) eccessive rimozioni, eccessivi invii di CVC al laboratorio

2) Molte evidenze scientifiche indicano come in numerosi casi di CRBSI pur a fronte di forti evidenze cliniche non sono poi sostenute dai dati microbiologici
Così il numero di CRBSI accertate riportate in letteratura è compreso fra 1% - 40%

© Med Sci Monit, 2009; 15(2): SC5-8
PMID: 19179982

IDSA 2009 : la coltura

Recommendation	Comments	recommendation	Reference(s)
Diagnosis: when and how should catheter cultures and blood cultures be done?			
Intravenous catheter cultures			
General			
1.	Catheter cultures should be performed when a catheter is removed for suspected CRBSI; catheter cultures should not be obtained routinely	A-II	[22, 26]
2.	Qualitative broth culture of catheter tips is not recommended	A-II	[22, 23]
3.	For central venous catheters (CVCs), the catheter tip should be cultured, rather than the subcutaneous segment	B-III	[20]
4.	For cultures of an anti-infective catheter tip, use specific inhibitors in the culture media	A-II	[31, 32]
5.	Growth of >15 cfu from a 5-cm segment of the catheter tip by semiquantitative (roll-plate) culture or growth of $>10^2$ cfu from a catheter by quantitative (sonication) broth culture reflects catheter colonization	A-I	[22, 23, 27]
6.	When catheter infection is suspected and there is a catheter exit site exudate, swab the drainage to collect specimens for culture and Gram staining	B-III	[1, 33]

Problematiche nella diagnosi: limiti della coltura

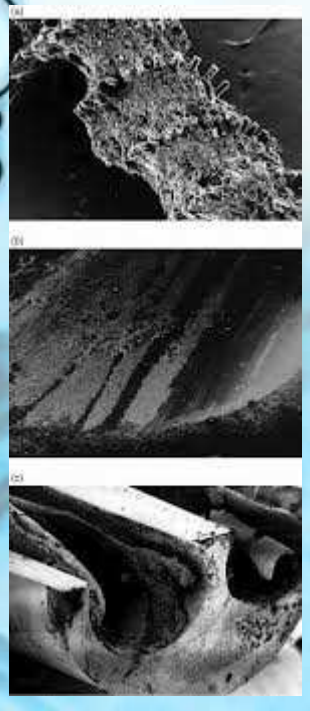
- Il problema principale risiede proprio nei limiti in termini di sensibilità della coltura:

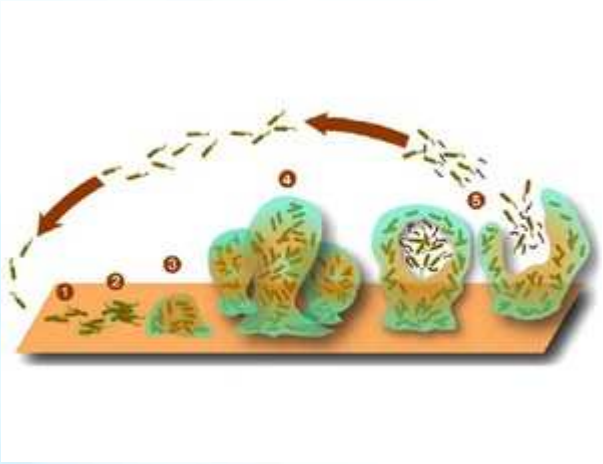
- Maki's in particolare evidenzia per lo più i germi presenti sulla superficie esterna della tip, mentre per lo più il problema della colonizzazione e della formazione del biofilm è all'interno del lume
- I germi, per via delle terapie antibiotiche a cui sono esposti e sopratutto i biofilm produttori sono lenti nella crecita e i terreni di coltura solidi comunemente utilizzati non li supportano (differenti crescita di forme panktoniche e sessili)

BMC Clinical Pathology
2008, **8**:10

La biologia molecolare

- Forse ha un ruolo emergente





BMC Clinical Pathology

BioMed Central

Research article

Open Access

Use of cultivation-dependent and -independent techniques to assess contamination of central venous catheters: a pilot study

Mette KS Larsen[1], Trine R Thomsen*[1,2], Claus Moser[3], Niels Høiby[3] and Per H Nielsen[1]

Maki a confronto tecniche di biologia molecolare

1.Passando attraverso la rimozione del biofilm interno ed esterno al CVC, estrazione da questo di DNA ***16S rRNA gene amplification***

2.ovvero ***Fluorescence in situ hybridization (FISH)*** performed on fixed biofilm

Biofilm esterno al CVC o del lume interno

Mix di batteri

Table 3: Clone library data

	Bacterial species	External	Internal	Mix
Alphaproteobacteria	*Afipia broomeae*			3 (98%)
	Bradyrhizobium japonicum			5 (96–98%)
	Bradyrhizobium sp.			1 (96%)
Betaproteobacteria	*Acidovorax sp.*			3 (94–99%)
	Alcaligenes sp.			2 (96–98%)
Gammapro				
	Pseudomonas sp.		1 (97%)	
	Serratia sp.			2 (99%)
Deltaprotec				
Firmicutes				
Actinobacte				
	Propionibacterium acnes	2 (96%)		
Unknown	Uncultured bacterium clone 654931	2 (98–99%)		1 (99%)
	Uncultured organism clone MC060411			1 (95%)
	Total	62	62	35

Blast results of the retrieved sequences from the three clone libraries from external, internal and mixed biofilm samples. Numbers refers to abundance of the different clones and the numbers in parentheses denote the percent ID, the clones have been identified with in the Blast search.

However, many other bacteria belonging to the phyla *Proteobacteria, Firmicutes,Actinobacteria* and *Bacteroidetes* were also found, stressing that only a minor portion of the species present were found by cultivation

Conclusion

The use of molecular techniques has the potential to substantially improve microbiological diagnosis in CVC-related infections when combined with existing methods based on cultivation and staining.

Ma torniamo alla coltura

la nostra idea: i trials iniziali

Maki modificata

a)Semina diretta= rolling su plate

b)Semina Indiretta = vortex + in BHI, semina su piastra

semina diretta

semina indiretta

Maki

PARTENZA 35% positivi

Nostra procedura

Vortex

centrifugazione

2

1

Rimozione del frammento, risospensione e 500 µl usati per inculare H&BL

Incubazione

6 h

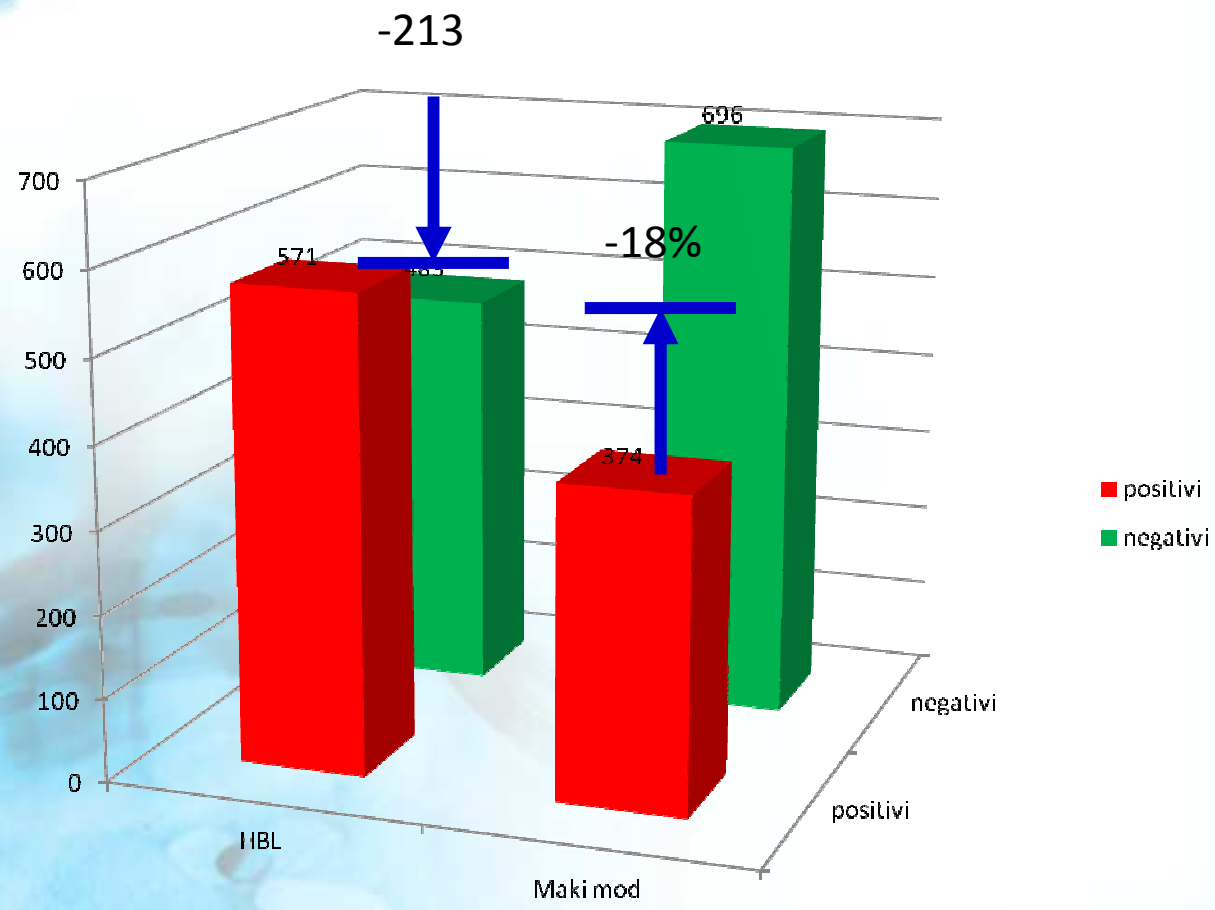
Semina al termine delle 6 ore sul set di terreni solidi

Coltura tradizionale

La scelta

- I cateteri selezionati quelli a lunghi permanenza (tutti impregnati con chlorhexidine and silver sulfadiazine).
- esclusi i cateteri arteriosi
- Solo quelli dei pazienti per i quali disponevamo di emocolture nelle in un range di 48 h prima o dopo la rimozione

1070 cvc blood culture paired



Eur J Clin Microbiol Infect Dis
DOI 10.1007/s10096-012-1676-9

ARTICLE

Improved diagnosis of central venous catheter-related bloodstream infections using the HB&L UROQUATTRO™ system

C. Fontana · M. Favaro · M. C. Bossa · S. Minelli · A. Altieri · M. Pelliccioni · F. Falcione · L. Di Traglia · O. Cicchetti · C. Favalli

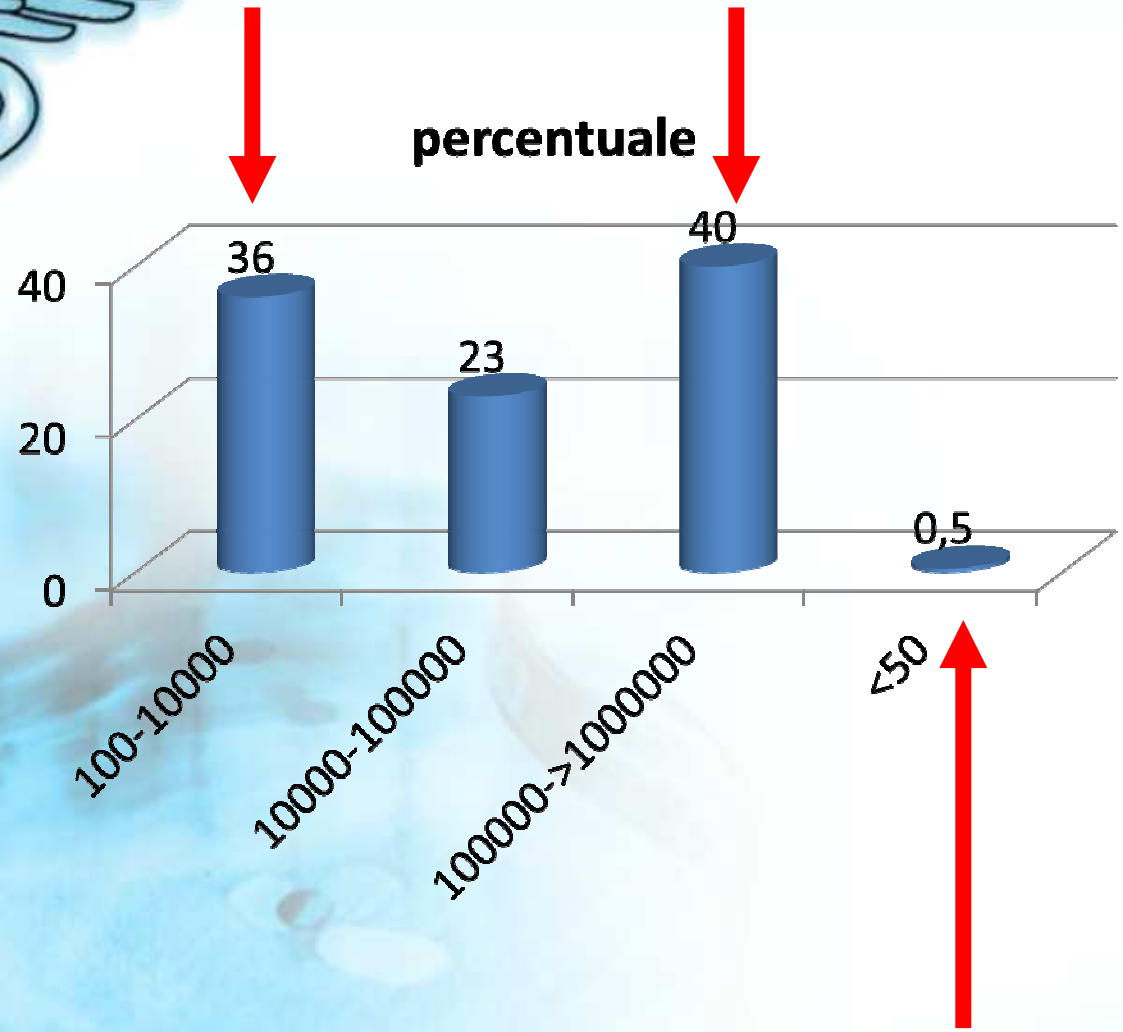
HBL53.36 % vs Maki 34.95

Table 1 Comparison of Maki's method with the CVC-HB&L™ quantitative culture method

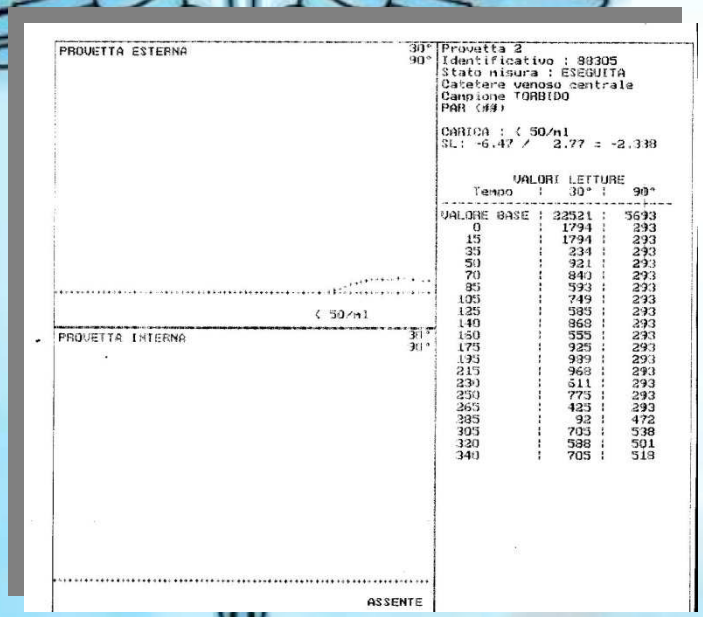
Specimen	CVC-HB&L™ method		Maki's method	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	571	0	374	213
Negative	12	487	0	483
Sensitivity	100		63.71	
Specificity	97.59		100	
NPV	100		69.39	
PPV	97.94		100	
p-value	0.004			

Of these patients, 571 patients were diagnosed with a CRBSI according to the current guidelines

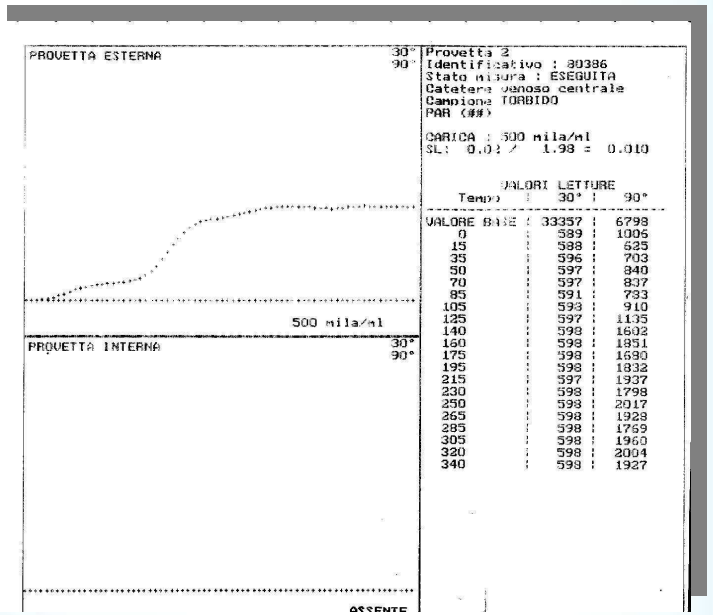
Cut off più ragionevole ≥100 CFU



Le CFU stimate erano comprese in un range di 1×10^2 to 40×10^6 CFU/mL, con un mean value 602,266.667 SD di 151,294.9456.



Interferenza da emazie (stime sovradimensionate)



12 campioni furono identificati come FP ma per le quali le emocolture erano NEGATIVE

E la subcoltura del brodino HB&L si mantenne negativa

Analizzando il campione si trattava di campioni con residui ematici e di altro materiale drenato dalla superficie interna del CVC tip che notoriamente interferiscono con la lettura HB&L UROQUATTRO ™ instrument.

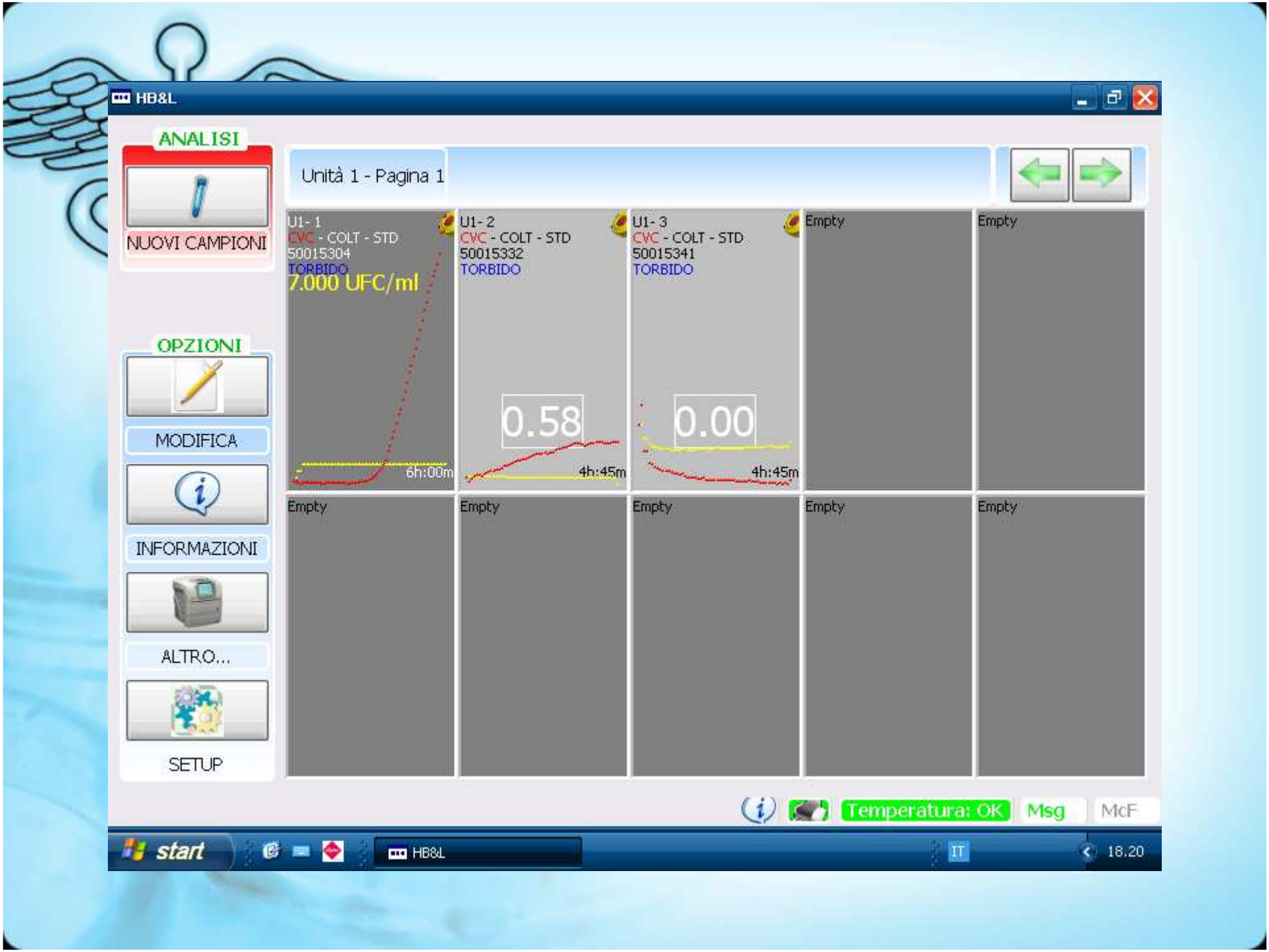

HB&L
ANALISI
NUOVI CAMPIONI
OPZIONI
MODIFICA
INFORMAZIONI
ALTRO...
SETUP
Unità 1 - Pagina 1
U1- 1
CVC - COLT - STD
50015304
TORBIDO
7.000 UFC/ml
6h:00m
U1- 2
CVC - COLT - STD
50015332
TORBIDO
0.58
4h:45m
U1- 3
CVC - COLT - STD
50015341
TORBIDO
0.00
4h:45m
Empty
Empty
Empty
Empty
Empty
Empty
Empty
Empty
Temperatura: OK
Msg
McF
start
HB&L
IT
18.20

Table 2 Isolates from culture-positive CVCs

Species	No. of isolates on a total of 571 culture-positive CVCs using the CVC-HB&L™ method	No. of isolates on a total of 374 culture-positive CVCs using Maki's method
Staphylococcus epidermidis and other CONS	212+(10)	155 + (10)
Staphylococcus aureus	39	21
Enterococcus faecalis	78	35
Enterococcus faecium	36	22
Klebsiella pneumoniae	30+(3)	22 + (3)
Klebsiella oxytoca	3	2
Proteus mirabilis	13	7
Escherichia coli	20+(2)	18 + (2)
Pseudomonas aeruginosa	14	5
Acinetobacter baumannii	46+(4)	34+(4)
Candida parapsilosis	11+(1)	8+(1)
Candida tropicalis	8	4
Candida glabrata	3	2
Candida albicans	58+(1)	39+(1)
Total	592	395

The numbers in parentheses indicate cultures with two isolates per CVC

21 campioni erano polimicrobici co associazioni tipo Gram-positivi (CONS), Gram negativi (*Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, or Acinetobacter baumannii*) o con lieviti (*Candida albicans Candida parapsilosis*).


La conclusione……
Soluzioni semplici, anche semplici cambiamenti delle abitudini possono rappresentare «la soluzione» del microbiologo per la gestione dei campioni critici del paziente critico
..l'immaginazione è più importante della conoscenza
Albert Einstein