

Artigo de revisão

Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados

Maria Rita Elmor de Araujo

Médica Patologista Clínica, Coordenadora médica dos setores de Microbiologia dos Laboratórios do Hospital Beneficência Portuguesa, São Paulo (SP) e Hospital do Coração, São Paulo (SP), Brasil.

maitaelmor@uol.com.br

Introdução

Bacteriemia é o termo que designa a indicação da presença de microrganismos viáveis na corrente sanguínea. É um fenômeno de grande relevância diagnóstica, pois frequentemente está associado a um aumento considerável nas taxas de morbidade e mortalidade, além de representar uma das mais significativas complicações no processo infeccioso, o que torna a hemocultura um exame de importante valor preditivo de infecção.

A maioria dos episódios sépticos tem origem hospitalar e com certa frequência envolvem microrganismos que apresentam grande resistência aos antimicrobianos, estando associados a taxas de mortalidade com tendência a serem superiores às dos episódios que ocorrem na comunidade (38).

Neste contexto, o laboratório clínico tem um papel extremamente importante no manejo de pacientes com bacteriemia, uma vez que a hemocultura positiva para microrganismos patogênicos é um indicador altamente específico de Infecção da Corrente Sanguínea (ICS), permitindo que a identificação do agente e o antibiograma

auxiliem na orientação da terapia antimicrobiana, cuja aplicação precoce tem demonstrado redução significativa na mortalidade (10,11).

A bacteriemia primária é assim denominada por ter origem no próprio sistema circulatório ou pela entrada direta de microrganismos na corrente sanguínea, através de agulhas, infusões contaminadas, cateteres ou outros dispositivos vasculares.

A bacteriemia secundária ocorre através de drenagem de pequenos vasos sanguíneos ou linfáticos, seguindo para a corrente circulatória como consequência de um foco de infecção definido em outro sítio do organismo.

As fontes mais comuns de ICS em geral (incluindo de origem comunitária e hospitalar) são: dispositivos intravasculares (19%), trato geniturinário (17%), trato respiratório (12%), intestino e peritônio (5%), pele (5%), trato biliar (4%), abscesso intra-abdominal (3%), outros sítios (8%) e de sítios desconhecidos (27%) (1).

Conceitualmente, as bacteriemias se classificam em transitória, intermitente, contínua ou de escape.

A do tipo transitória, que em geral é rápida (com duração que pode variar de alguns minutos a poucas horas) é a mais comum, e ocorre após a manipulação de algum tecido infectado como em casos de abscessos, furúnculos e celulites; durante algum procedimento cirúrgico envolvendo tecidos contaminados ou colonizados como em procedimentos dentários; manipulações geniturinárias como cistoscopia, cateterização ou dilatação uretral; abortamento ou endoscopias digestivas; e cirurgias que envolvem áreas contaminadas, como ressecção transuretral de próstata, histerectomia vaginal e debridamento de queimaduras. Este tipo de bacteriemia também ocorre em algumas infecções agudas, localizadas ou sistêmicas, como pneumonias, meningites, artrites sépticas e osteomielites (2).

Já quando a bacteriemia se manifesta em intervalos variáveis de tempo (com o mesmo microrganismo) é denominada de intermitente. Geralmente este tipo ocorre em processos infecciosos relacionados a abscessos intra-abdominais, pélvicos, perinefráticos, hepáticos, prostáticos e outros, configurando assim causas frequentes de febre de origem indeterminada.

A bacteriemia contínua é característica da endocardite infecciosa aguda e subaguda e de outras infecções endovasculares. Este padrão também é encontrado nas primeiras semanas da febre tifóide e na brucelose (8).

A bacteriemia de escape (*"breakthrough"*) ocorre mesmo enquanto o paciente esteja recebendo antibioticoterapia sistêmica apropriada (germe sensível). Quando se dá no início da terapêutica, geralmente deve-se a concentrações insuficientes do antimicrobiano atingidas na corrente sanguínea (é interessante lembrar que nas estafilocóccias é comum haver escape nos primeiros dias de tratamento, mesmo sob condições adequadas de antibioticoterapia). Já os episódios de escape que ocorrem tardiamente geralmente se dão por drenagem inadequada do foco infeccioso ou por debilidade das defesas do hospedeiro (9).

Na maioria das vezes, as bacteriemias são causadas por um único microrganismo. Contudo, em algumas situações, caracterizam-se por etiologia polimicrobiana.

O termo sepse refere-se à condição pela qual a resposta do organismo ao agente infeccioso se manifesta, por meio de sinais e sintomas da doença, como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, independente da presença ou não de hemocultura positiva.

A detecção de bacteriemia ou fungemia pode remeter a uma falha nas defesas do hospedeiro em localizar e neutralizar determinada infecção em seu foco inicial, ou eventual insucesso na remoção ou drenagem de determinado foco infeccioso. No paciente imunocompetente, geralmente as defesas naturais respondem prontamente à presença de microrganismos estranhos. Essa eliminação pode ser menos eficiente quando se trata de microrganismos encapsulados ou é mais eficaz quando o paciente já apresenta anticorpos contra o organismo infectante. Há situações determinadas em que essa eliminação é menos efetiva, como nos casos de infecções a partir de focos intravasculares, na presença de dispositivos invasivos (pela formação de biofilme) ou em endocardites.

As condições que predis põem um paciente ao quadro de bacteriemia ou fungemia incluem a idade, doenças de base, medicamentos (corticóides, quimioterápicos, drogas citotóxicas) e alguns procedimentos médicos invasivos (cateteres e procedimentos endoscópicos). O risco é maior nas faixas etárias extremas e nos pacientes portadores de doenças hematológicas, neoplasias, diabetes mellitus, insuficiência renal em diálise, cirrose hepática, imunodepressão e grandes queimaduras. Alguns procedimentos cirúrgicos são também predisponentes, particularmente os do trato geniturinário e gastrointestinal (1).

Coleta de hemoculturas

Indicação clínica

Idealmente, a coleta deve ser feita antes do início da antibioticoterapia de pacientes que configurem quadro clínico sugestivo de infecção e suficiente para serem submetidos à internação e que apresentem febre ($> 38^{\circ}\text{C}$) ou hipotermia ($< 36^{\circ}\text{C}$), leucocitose ($> 10.000/\text{mm}^3$, especialmente com desvio à esquerda) ou granulocitopenia absoluta (< 1000 leucócitos/ mm^3).

Em crianças pequenas com quadro de queda do estado geral sem explicação, e em idosos, principalmente acompanhado de mal estar, mialgia ou sinais de acidente vascular cerebral devem ser investigados.

Nos casos em que houver suspeita de foco de infecção provável, é desejável também a coleta de materiais representativos dos outros sítios (por exemplo: liquor, urina, fezes, secreções, abscessos etc.).

Número de amostras

Para maior clareza, definimos neste documento que a coleta de uma amostra de hemocultura corresponde a uma punção. Cada punção corresponde a dois frascos para adultos ou um frasco para pacientes pediátricos até 13kg (Tabela 2).

Baseado em dados que se referem à positividade cumulativa de hemoculturas e coletadas durante episódios sépticos comprovados, recomenda-se coletar no mínimo duas até quatro amostras por episódio infeccioso, o que permite o isolamento do agente bacteriano ou fúngico em mais de 95% dos eventos. Estudos de décadas anteriores indicaram que ao se obter somente uma hemocultura, havia cerca de 80 a 90% de chance de recuperação, em duas amostras aumentaria significativamente para > 88% e em três amostras em até > 99% de recuperação (39,40). Já estudos mais recentes, têm mostrado que as chances de recuperação com somente uma amostra fica em torno de 70%, duas amostras em torno de 80 a 90%, três amostras entre 96 a 98% e quatro amostras >99%, desafiando-se os conceitos tradicionais de que 2 a 3 amostras eram suficientes, sugerindo que podem ser necessárias de 3 a 4 amostras para ótima recuperação dos agentes (17,35).

Acredita-se que possíveis explicações para este fato sejam que com as metodologias atuais mais sensíveis, tornou-se possível a detecção de baixos níveis de bacteriemia com mais pacientes em uso prévio de antimicrobianos e talvez pela diferença metodológica de análise dos estudos (2).

Concluindo, o número de amostras deve ser de no mínimo 2 e no máximo 4 mostras por episódio infeccioso. Um maior número de amostras traz pouco benefício, aumentando os custos, trabalho e risco de provocar anemia, sem aumento significativo da positividade (2).

Tal amostragem também representa o volume de sangue adequado para o isolamento, e permite auxiliar na interpretação do resultado, de acordo com o número de amostras positivas dentre as coletadas para indicar provável contaminante ou bacteriemia verdadeira.

O número de hemoculturas positivas em função do número total de amostras coletadas (punções em diferentes sítios) é uma ferramenta muito útil para interpretação do significado clínico, pois ao contrário dos casos de pacientes com bacteriemias verdadeiras, os contaminantes geralmente crescem somente em uma amostra (quando duas ou mais são obtidas). Portanto, a coleta de uma amostra única deve ser inibida, já que um número substancial de bacteriemias pode não ser detectado e impossibilita a discriminação de possíveis contaminantes (2,17,35).

A política do laboratório associada aos protocolos médicos da instituição deve estar apta a criar mecanismos para desencorajar a coleta de amostra única e instituir ou garantir a coleta de ao menos duas amostras de hemoculturas por episódio infeccioso (com exceção de pacientes pediátricos de baixo peso ou com outras limitações), de acordo a viabilidade local.

Hora, intervalos e local de coleta

De forma prática, a coleta deve ser indicada precocemente ao início dos sintomas de infecção e antes do início da antibioticoterapia. Se o paciente estiver em vigência de antimicrobianos, as hemoculturas devem ser obtidas imediatamente antes da administração da próxima dose (vale). Preferencialmente são coletadas por punção venosa, tão logo se inicie o aumento de temperatura do paciente. A coleta de sangue arterial não está associada com aumento da sensibilidade e não é recomendada, em princípio.

Tabela 1. Recomendações para coleta de hemoculturas em diferentes condições ou síndromes infecciosas

CONDIÇÃO OU SÍNDROME INFECCIOSA	RECOMENDAÇÕES
Suspeita de bacteriemia ou fungemia primária ou secundária (endocardite, meningite, osteomielite, artrite, pneumonia etc.)	Obter 2-3 amostras, uma após a outra, de diferentes sítios anatômicos, logo após o início dos sintomas
Febre de origem indeterminada (ex. abscessos ocultos, febre tifóide, brucelose ou outra síndrome infecciosa não diagnosticada)	Obter 2-3 amostras, uma após a outra, de diferentes sítios anatômicos, inicialmente. Se negativas nas primeiras 24-48h de incubação, obter mais duas amostras, uma após a outra, de diferentes sítios anatômicos
Suspeita de bacteriemia ou fungemia com hemoculturas persistentemente negativas	Considerar métodos alternativos de hemoculturas, específicos para aumentar a recuperação de micobactérias, fungos ou microrganismos fastidiosos

Adaptado de: Baron, E.J, M.P. Weinstein, W.M.Dunne Jr, P. Yagupsky, D.F. Welsh e D.M. Wilson. Cumitech 1C, Blood Cultures IV. Coordinating Ed. E.J. Baron. ASM Press, 2005. Washington D.C.

O uso de antitérmicos não interfere nos resultados de hemoculturas.

Cada amostra deve ser coletada de punções separadas e de sítios anatômicos diferentes. Vários frascos com sangue de uma mesma punção são considerados uma mesma amostra ou cultura de sangue (2).

Poucos estudos avaliam sistematicamente a hora e o intervalo ótimo entre amostras sucessivas. Estudos experimentais mostraram que, após um influxo de bactérias na corrente sanguínea, ocorre um tempo de latência de aproximadamente uma hora até que ocorram sintomaticamente calafrios seguidos de febre (13).

Alguns autores classicamente recomendam a coleta de amostras em intervalos arbitrários de 30 a 60 minutos. No entanto, Thomson e col. observaram que não há diferenças significativas entre os índices de positividade de hemoculturas obtidas em diferentes tempos em relação ao pico febril (14) e Li e col. demonstraram que não há diferenças na recuperação de hemoculturas num período de 24 horas quando obtidas simultaneamente ou em intervalos separados (15).

O estado clínico do paciente é que vai determinar o momento e o intervalo entre as coletas (Tabela 1). Em geral, nas infecções agudas, recomenda-se a coleta de duas a três amostras (dois frascos por punção/amostra) em curto espaço de tempo, ou seja, sequenciais ou dentro de 1 hora. A coleta de hemoculturas em intervalos maiores de 1 a 2 horas entre as amostras pode ser recomendada para monitorar ou documentar bacteriemia contínua em pacientes com suspeita de endocardite ou infecção endovascular associada a dispositivos invasivos (ex.: cateter vascular) (16).

As hemoculturas, preferencialmente, não devem ser coletadas a partir de cateter, exceto para diagnóstico de infecção relacionada ao dispositivo. Neste caso, a amostra obtida através do cateter deve ser sempre acompanhada por uma ou duas amostras de veia periférica, de forma sequencial ou concomitante, identificando corretamente as amostras quanto ao local de punção. As respectivas coletas devem ser representadas por um mesmo volume de sangue, para que sejam comparáveis quanto ao tempo de positividade (7),

quando este dado for disponível por metodologia automatizada.

Volume de sangue

Esta é uma das variáveis mais críticas para a positividade do exame, pois quanto maior o volume, maior será a chance de positividade. Todavia, devemos respeitar a idade do paciente (adulto ou criança) e o volume recomendado pelo fabricante para os tipos de frascos utilizados, mantendo a proporção de sangue / caldo de cultura de 1:5 a 1:10 (2).

Para adultos, coleta-se 5 a 10ml de sangue por frasco em cada punção, totalizando 20ml, distribuídos pelo número de frascos indicados, ou seja, um par de frascos por punção / amostra (17), conforme resumido na tabela 3.

Na suspeita de fungos dimórficos ou filamentosos (ex.: Histoplasma) ou micobactérias, o indicado é coletar 5 a 10ml por frasco (conforme instruções do fabricante), de duas a três amostras, coletadas com o intervalo de ao menos um dia entre elas (2).

Para crianças, o volume ótimo de sangue ainda não está bem definido, mas os dados da literatura demonstram que há uma relação direta entre o volume de sangue obtido e a detecção de ICS. Estudos anteriores já demonstraram que amostras de sangue com volume maior ou igual a 1ml detectaram mais bacteriemias que amostras com volumes inferiores a 1ml. Kellogg e col. documentaram que a bacteriemia de baixo grau, com contagem inferior a 10 UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônias / ml) ocorria em 68% dos lactentes até dois meses e 60% das crianças do nascimento até 15 anos e em 23% dos episódios, tinha contagem inferior ou igual a 1 UFC/ml (18,19).

De acordo com as recomendações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (16) o volume de sangue extraído em crianças deveria ser de até 1% da volemia. Entretanto, os estudos de Kellogg e col., baseando-se na premissa de que até 4 a 4,5% da volemia caracteriza um índice seguro e da relação entre volemia e peso do paciente, as recomendações para coleta em crianças está resumida na tabela 2 (18). Porém, de forma prática, ainda é impossível estabelecer volumes ótimos para crianças muito pequenas ou prematuras.

Tabela 2. Volume de sangue sugerido para hemoculturas de lactentes e crianças

PESO (kg)	VOLEMIA (ml)	VOLUME DE SANGUE POR AMOSTRA (ml)		VOLUME TOTAL DE SANGUE P/CULTURA (ml)	% DA VOLEMIA
		Cultura n°1	Cultura n°2		
<=1	50 - 99	2	-	2	4
1,1 - 2	100 - 200	2	2	4	4
2 - 12,9	>200	4	2	6	3
13 - 36	>800	10	10	20	2,5
>36	>2.200	20-30	20-30	40-60	1,8-2,7

Adaptado de: Baron, E.J., M.P. Weinstein, W.M. Dunne Jr, P. Yagupsky, D.F. Welsh e D.M. Wilson. *Cumitech 1C, Blood Cultures IV*. Coordinating Ed. E.J. Baron. ASM Press, 2005. Washington D.C. (2). Kellog, J.A. Manzella, J.P. e D.A. Bankert. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J. Clin. Microbiol.* 2000. 38:2181-2185 (18).

Tabela 2. Tipos de frascos e volume de sangue sugeridos por amostra de hemocultura

	Crianças até 13kg	Crianças de 13 a 36kg	Crianças > 36 kg e Adultos
Frasco AERÓBIO^a	1 a 4ml	5ml	5 a 10ml
Frasco ANAERÓBIO^a	-	5ml	5 a 10ml
Volume total/amostra	1 a 4ml ^b	10ml	20ml

^a Ver recomendações do fabricante
^b Em lactentes com extrema dificuldade de coleta pode-se coletar um volume não inferior a 0,5ml.

Técnica de coleta

A antisepsia adequada da pele é parte fundamental do processo e é o fator que determina a probabilidade de uma hemocultura positiva ser considerada contaminação ou infecção. Os dados disponíveis até o momento mostram que a tintura de iodo 1-2% (álcool iodado) ou preparações com clorexidine alcoólico 0,5% parecem ser equivalentes entre si e ambos apresentam menores taxas de contaminação do que preparações de iodo-povidine (PVPI) (23). Clorexidine tem a vantagem de ser incolor e menos irritante para a pele. Recomenda-se que, devido à possibilidade de toxicidade, seja feita a remoção destes antissépticos com álcool da pele de neonatos após a coleta ou utilizar apenas álcool 70% (16).

De acordo com a padronização de antissépticos de cada instituição, o seguinte roteiro para coleta pode ser proposto:

1) Preparar o material, dispor a etiqueta de identificação no frasco, anotando o nome do paciente, leito, data, hora e local de coleta (sítio anatômico), imediatamente ao procedimento. **ATENÇÃO:** Não colar a etiqueta de identificação sobre o código de barras do frasco.

2) Limpar a tampa de borracha com algodão embebi-

do em álcool 70%. Manter o algodão sobre o frasco até o momento da punção ou proceder conforme as instruções do fabricante.

3) Escolher o melhor local de punção para a coleta de sangue. Colocando o garrote e apalpando livremente as veias do paciente para escolher a mais calibrosa e menos móvel. Soltar o garrote.

4) Fazer a antisepsia com clorexidine alcoólico 0,5%, friccionando a pele em círculos semi-abertos a partir do ponto a ser puncionado. Secar por 30 segundos. Em seguida, aplicar novamente clorexidine alcoólico 0,5% utilizando novo algodão ou gaze. Esperar cerca de 30 segundos para secar, repetir o procedimento por mais uma vez e aguardar secar.

Nota: clorexidine alcoólico para limpeza da pele pode ser substituído por álcool-iodado ou álcool 70%, dependendo da padronização da instituição. Não voltar a tocar o local onde foi feita antisepsia, a não ser com luvas estéreis (se necessária nova palpação do local). Se houver suspeita de contaminação da área, repetir o procedimento de antisepsia.

5) Colocar novamente o garrote e puncionar a veia com agulha e seringa ou dispositivo para coleta a vácuo, sem tocar diretamente no local de punção.

6) Coletar de 5 a 10ml de sangue (adultos) ou de 1 a 4ml de sangue (crianças) para cada frasco.

7) Ao retirar a agulha, fazer compressão local com algodão seco, sem flexionar o braço.

8) Transferir a amostra para os frascos de hemocultura, colocando primeiramente o sangue no frasco ANAERÓBIO (sem troca de agulhas). Se a coleta for realizada com escalpe e adaptador próprio (sistema de coleta fechado a vácuo), inocular primeiro o frasco AERÓBIO. Importante lembrar que, nesse caso, os frascos de hemocultura devem permanecer em pé durante toda a etapa de coleta, para evitar refluxo para a veia do paciente. Observar o volume correto observando a guia de marcação na etiqueta do próprio frasco, já que a maioria deles não tem volumes de aspiração à vácuo calibrados. Utilizar um conjunto de seringa - agulha ou dispositivo próprio de coleta a vácuo para cada punção/amostra.

9) Dispensar o material de punção em local apropriado (caixa de perfurocortante).

Se a amostra for obtida a partir de cateter vascular, deve ser realizada a antisepsia do local a ser puncionado com álcool 70% (dispositivo) ou clorexidine alcoólico (pele) conforme instruções acima e não é necessário descartar o volume inicial de sangue ou lavar o acesso com salina para eliminar heparina ou outros anticoagulantes, pois a alta concentração protéica dos meios de cultura normalmente neutraliza o efeito antimicrobiano eventual do anticoagulante (16,30,31).

Além disso, o descarte do volume inicial de sangue do cateter com o intuito de evitar contaminação é assunto controverso e esta prática ainda é realizada em muitas instituições, mesmo nas pediátricas, onde o volume de sangue é ponto crítico. Porém, estudo realizado por Dwivedi e col. em 2009 (36), demonstrou que o descarte da alíquota inicial não diminui a chance de contaminação da amostra, tornando esta prática desnecessária.

Tipos de frascos

Tradicionalmente um par de hemoculturas (equivalente a uma amostra ou uma punção) compreende um frasco aeróbio e um anaeróbio.

Estudos anteriores, das décadas de 80 e início dos anos 90, indicavam que a recuperação de anaeróbios estava em declínio, já que alguns dados deram fundamentação ao conceito de que os frascos anaeróbios deveriam ser dirigidos a casos selecionados. Sendo assim, alguns autores preconizaram o uso de rotina de somente frascos aeróbios (20, 21).

Apesar da proporção de ICS causadas por anaeróbios ter diminuído progressivamente, há estudos que mostram que a coleta do par incluindo o frasco anaeróbio leva ao aumento do isolamento de *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, alguns *Streptococcus spp.* e *Enterococcus spp.*, anaeróbios estritos e facultativos, além de garantir volume de sangue mais adequado de amostra por punção para melhor recuperação dos patógenos (22).

Além disso, grande parte dos meios comerciais disponíveis é capaz de detectar o crescimento de leveduras no frasco aeróbio. Portanto, recomenda-se que, preferencialmente, as hemoculturas de rotina incluam frascos pareados de hemocultura aeróbia e anaeróbia (16).

O uso de um frasco aeróbio, somente, muitas vezes é preconizado em instituições onde há dificuldades relativas a acordos de ressarcimento por parte da fonte pagadora ou quando não há consenso para a solicitação do exame. Alguns autores sugerem que pode haver benefício na coleta de dois frascos aeróbios nas instituições em que a prevalência de leveduras seja elevada (2).

Quando a amostra obtida possuir volume total inferior ao preconizado por frasco, o maior volume de sangue deve ser inoculado no frasco aeróbio para que não haja perda na detecção de bacteriemias causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ou leveduras, que são aeróbios estritos. O menor volume restante deve ser inoculado no frasco anaeróbio.

Ao ser coletada mais de uma amostra, anotar nos respectivos frascos (aero e anaero) quais frascos são do mesmo local de punção ou sítio anatômico (ex.: 1ª amostra, veia periférica, cateter etc.).

Metodologias

Método manual

Atualmente os laboratórios que ainda se valem de metodologias manuais, em sua grande maioria, utilizam meios de cultura comerciais, aeróbios e/ou anaeróbios, para a realização de hemoculturas. Trata-se geralmente de caldo infusão cerebro-coração (BHI) ou caldo caseína digerida de soja (TSB) para aeróbios, facultativos e leveduras; e caldo Columbia para anaeróbios que devem favorecer o crescimento da maioria dos microrganismos, inclusive dos considerados fastidiosos (2).

Além do frasco contendo caldo BHI ou TSB, o método manual mais interessante inclui meio bifásico, sendo uma fase líquida e outra sólida, permitindo a observação de crescimento na superfície do ágar.

A maioria destes meios tem na sua composição o anticoagulante SPS (0,025 a 0,05%), o qual apresenta ação inibidora para lisozimas, além de certa ação inibitória frente a determinadas concentrações de aminoglicosídeos e polimixinas, pode ter ação inibitória para algumas frações do complemento e inibe parcialmente a fagocitose. Por outro lado este anticoagulante pode aduzir certa ação inibidora para o isolamento de determinados microrganismos, como por exemplo, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Peptostreptococcus* spp., *Moraxella catarrhalis* e outros. Daí a recomendação de acrescentar gelatina na concentração de 1,2% na composição destes meios para inibir parcialmente o efeito nocivo do SPS, quando há suspeita de um dos agentes acima citados (2).

Embora ainda utilizado por razões de custos, o método manual não é o mais indicado por apresentar baixa sensibilidade (quando comparado com métodos automatizados), ser mais trabalhoso, além de favorecer a possibilidade de contaminação das amostras examinadas e de acidentes com perfurocortantes durante o processamento e repiques sucessivos.

Um período de sete dias de incubação e agitação periódica dos frascos é um fator importante para maior positividade; subcultivos deve ser realizado durante este prazo. Tanto os frascos de hemocultura como as placas de subcultivos, devem ser mantidos à temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$. O primeiro subcultivo (cultura cega) pode ser feito após 12 - 18 horas, em placa de ágar-chocolate com incubação em atmosfera de CO_2 , por no mínimo 48 horas e observada diariamente para verificar a pre-

sença de colônias. Além dos subcultivos para cultura cega, deve ser realizada a inspeção visual dos frascos diariamente a partir de 6 - 12 horas à procura de sinais de hemólise, turbidez, produção de gás, bolhas, película de crescimento, grumos, etc. que podem ser sinais de positividade até o 7º dia. Nestes casos, a amostra deve ser subcultivada imediatamente e preparada lâmina para microscopia (Gram). A inspeção visual e o subcultivo são fundamentais, e o crescimento é incrementado na medida em que é feita a agitação do frasco (26). Culturas cegas sequenciais e subcultivo terminal não acrescentam ao resultado, desde que as amostras fiquem sedimentadas e seja feita inspeção visual diária (27, 28). A grande maioria dos microrganismos é isolada nas primeiras 72 horas.

Mediante a presença de microscopia com morfologia suspeita e sem crescimento no subcultivo em aerobiose ou caso haja crescimento somente no frasco anaeróbio, suspeita-se de anaeróbios. Neste caso, uma alíquota da amostra deve ser subcultivada em placa de ágar-sangue (preferencialmente enriquecido com hemina e vitamina K), e incubada em atmosfera de anaerobiose por 48 - 72 horas.

Em suspeitas diagnósticas de microrganismos de crescimento mais lento, períodos mais prolongados de incubação devem ser indicados.

O frasco Signal (Oxoid®) apresenta um dispositivo de detecção de produção de CO_2 em que se pode visualizar facilmente a positividade da amostra, não sendo necessário o subcultivo periódico (cultura cega). Este frasco apresenta custo relativamente elevado, semelhante aos equipamentos automatizados e tem lugar em instituições que processam número pequeno de amostras, sem justificativa de instalação de automação.

Método de Lise-centrifugação

Durante muitos anos foi considerado o padrão-ouro para hemoculturas. O sistema Isolator® (laboratórios Wampole) constitui de tubo a vácuo adulto e pediátrico contendo uma substância lisante de leucócitos e hemácias, liberando microrganismos intracelulares. Os tubos são centrifugados e, após desprezar-se o sobrenadante (contendo debris celulares, agentes antimicrobianos, plasma e complemento), o sedimento contendo o suposto agente etiológico é semeado em qualquer tipo de meio inclusive para patógenos especiais como *Legionella*, Micobactérias e fungos. Tem ainda a possibilidade de se fazer a contagem de colônias por mL de sangue (cultura

quantitativa). Este método tem como limitação o custo elevado e o fato de ser trabalhoso, o que inviabiliza o processamento de grande número de amostras.

Métodos Semi-automatizados

O sistema Hemobac Trifásico (Probac®) é composto por um laminocultivo com duas fases acoplado à parte superior de um recipiente plástico contendo caldo suplementado com extrato de levedura e SPS que pode ser acrescido de substâncias para neutralização de antimicrobianos. As faces do laminocultivo contêm ágar-chocolate, ágar Sabouraud e ágar MacConkey. Os frascos acoplados são incubados em estufa própria que faz a inversão periódica do caldo sobre o laminocultivo. A positividade é visualizada por meio de um indicador colorimétrico de CO₂. A bacterioscopia, a identificação e o antibiograma são processados diretamente a partir de colônias desenvolvidas no laminocultivo, não havendo necessidade de subcultivo, estabelecendo maior agilidade na obtenção do resultado.

O sistema Septi-Check® (BBL, BD Diagnostic Systems) apresenta princípio semelhante e a inversão do frasco é feita manualmente.

Métodos Automatizados (monitoração contínua)

Atualmente existem diversos equipamentos automatizados no mercado para a realização de hemoculturas que apresentam grande vantagem em relação às metodologias manuais, principalmente no que se refere à rapidez dos resultados e à diminuição do trabalho técnico. Geralmente os protocolos são de cinco dias de incubação, mas a grande maioria dos resultados positivos ocorre nas primeiras 48 horas.

As metodologias utilizadas pelos equipamentos automatizados disponíveis no Brasil, como por exemplo, BACTEC® modelos FX, série 9000 (9050, 9120, 9240) ou MGIT (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD, USA) e BacT/ALERT® 3D 60/120/240 (bioMérieux, Durham, NC, EUA), têm como base a detecção por fluorescência ou colorimetria.

Inúmeros trabalhos mostram as vantagens dessas metodologias e a opção da escolha do equipamento, em geral, está mais relacionada ao custo do equipamento e/ou de seus frascos de consumo. Seguem alguns dos benefícios:

- Contínuo monitoramento pelo sistema (leitura em minutos).

- Maior sensibilidade e rapidez para detecção de positividade da amostra (agitação).
- Possibilidade de criação de banco de dados dos microrganismos isolados e dados demográficos, além do interfaceamento com o sistema do laboratório, o que facilita a liberação dos resultados negativos.
- Determinação do tempo para positividade de cada frasco, auxiliando no diagnóstico de infecções relacionadas a cateter.
- Menor risco de contaminação laboratorial, pois o repique só é realizado em amostras positivas.
- Não é necessário repicar amostra negativa.
- Economia de tempo e material (agulha, seringa e placas com meios de cultura para repiques) com menor risco de manipulação.
- Os frascos de plástico possuem a vantagem de serem mais leves e provocarem menos risco de acidentes.

A principal desvantagem do método é o custo ainda elevado, algumas vezes não compensados pelas fontes pagadoras.

Para os laboratórios que dispõe de metodologias automatizadas, existe a possibilidade do uso de meios de cultura com resinas ou carvão que apresentam ação inibitória para antimicrobianos, útil para pacientes que receberam antibioticoterapia prévia.

Os frascos aeróbios devem manter área suficiente de volume de ar para permitir crescimento de bactérias aeróbias estritas como *Pseudomonas aeruginosa* e leveduras, enquanto os frascos para anaeróbios devem ter uma mistura de gases livres de oxigênio, evitando-se a introdução de ar durante a coleta. Agitação do meio é um fator importante para facilitar a multiplicação bacteriana, principalmente dos aeróbios estritos e facultativos.

Pacientes com infecção avançada pelo HIV, bem como outros imunossuprimidos, tem risco elevado de infecções por *Mycobacterium tuberculosis* e pelo complexo *Mycobacterium avium*, assim como por *Histoplasma capsulatum*. Nestes casos, a inoculação do sangue concentrado (sistema de lise-centrifugação Isolator®) pode ser feita em ágar Lowenstein-Jensen ou caldo Middlebrook 7H11 ou usar os frascos específicos de sistemas automatizados como MYCOF® (BACTEC – BD®) ou MB/BACT® (BacT/ALERT - bioMérieux®) (41).

Em geral, a maioria dos meios comercializados para automação tem desempenho semelhante para os patógenos usuais. Apesar da recomendação de coletar

amostras antes do início da antibioticoterapia, muitos pacientes já estão recebendo antimicrobianos no momento da coleta, diminuindo potencialmente a chance de positividade. Os meios contendo resinas ou carvão ativado tendem a levar ao aumento da recuperação de microrganismos incluindo *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae* e leveduras, propiciando o aumento da positividade em pacientes recebendo antimicrobianos e, em contrapartida, a recuperação de mais contaminantes, tipo *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) (2).

Em situações rotineiras, utilizando-se o método automatizado de monitoração contínua, recomenda-se que os frascos de hemocultura sejam incubados por cinco dias para bactérias aeróbias, anaeróbias e a grande maioria das leveduras (16), e 42 dias para frascos especiais para outros fungos e micobactérias (32), ou conforme instruções do fabricante.

*Nota: apesar de a maioria dos fungos dimórficos crescerem em meios de hemocultura convencionais o crescimento pode levar até quatro semanas. Por isso, o uso de automação não é totalmente confiável e outro método deve ser usado quando há suspeita de infecção por fungo filamentosos ou dimórfico, se possível, hemocultura por lise-centrifugação e semeadura em Ágar (33), além da coleta de outros materiais do provável sítio de infecção. Para o crescimento de *Malassezia furfur*, é necessário suplementar o meio com lípidos (ex. óleo de oliva) (16).*

Coleta de hemoculturas para diagnóstico de infecção relacionada a cateter vascular

Cateteres intravenosos são notáveis fontes de bacteriemia e fungemia, assim como complicações infecciosas no local da inserção. Os mesmos cuidados para inserção devem ser adotados na retirada do cateter. A pele ao redor do cateter deve ser cuidadosamente desinfetada com solução iodada ou de clorexidina. Após a secagem da solução sobre a pele (cerca de 30 segundos a 1 minuto), o cateter é removido cuidadosamente. O excesso de antisséptico sobre a pele pode ser removido, ao final, com álcool 70%.

O segmento distal (que estava inserido na veia do paciente), de aproximadamente 5cm, é asepticamente cortado com auxílio de tesoura estéril, colocado em um frasco estéril seco, e remetido em um prazo mínimo (1 hora) ao laboratório.

O método descrito por Maki é o mais amplamente utilizado para determinar a relação entre colonização do cateter e infecção. O segmento distal do cateter é rolado (deve-se evitar a esfregação) 4 a 5 vezes sobre a superfície de uma placa de ágar-sangue, com auxílio de uma pinça estéril. Após incubação, durante 18 - 24 horas à 35°C, preferencialmente em atmosfera de CO₂, é realizada a contagem de colônias. É recomendável fazer uma nova observação da placa após 48 - 72h. Esta técnica avalia somente a superfície externa do cateter. Considera-se o crescimento de ≥ 15 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por placa como sugestivo de colonização do cateter (34).

Na ausência de cultura semiquantitativa, a infecção relacionada ao dispositivo vascular também pode ser diagnosticada clinicamente quando há drenagem de secreção purulenta na junção da pele com o cateter e realizando-se a cultura deste material.

A técnica mais sensível é a cultura quantitativa, em que o segmento do cateter é imerso em caldo e sonicado (ultrassom) para a liberação dos microrganismos aderidos nas superfícies intra e extraluminal. Em seguida são executadas diluições e culturas quantitativas a partir do caldo, após sonicação. O crescimento de $>=100$ UFC/ml na ausência de sinais inflamatórios sugere colonização e, na presença destes, infecção relacionada ao cateter. O crescimento de ≤ 15 UFC/placa (Maki) ou < 100 UFC/ml (sonicação) é considerado indeterminado e vai depender de outros critérios para diagnóstico (34).

Ambas as metodologias requerem a retirada do dispositivo vascular, que na maioria dos casos resultam em culturas negativas.

Em paralelo, testes diagnósticos mais conservadores tem sido usados com relativo sucesso para preservar o cateter, principalmente nos pacientes com difícil acesso venoso ou com cateteres de longa permanência. Estes compreendem a coleta de hemoculturas pareadas e simultaneamente obtidas, uma através do cateter central e outra de veia periférica. Em estudos já realizados, demonstrou-se que se a contagem de colônias/ml da amostra de sangue obtida pelo cateter for no mínimo 4 vezes maior que a da amostra obtida da veia periférica, significa alto valor preditivo positivo de infecção relacionada ao dispositivo vascular (que pode ser realizado pelo método de lise-centrifugação - Isolator®)(42).

Partindo desse princípio, amostras de igual volume, coletadas pareadas do cateter e da veia periférica

podem ser inoculadas simultaneamente em frascos de hemocultura de sistemas automatizados de monitoração contínua. O tempo para detecção de positividade é diretamente proporcional ao inóculo inicial; portanto, se a diferença no tempo de positividade for maior que 2 horas, mais precoce do frasco coletado do cateter em relação ao da veia periférica, está frequentemente relacionada a infecções devido ao cateter. Esta metodologia apresenta sensibilidade variável a depender do tipo de cateter, tempo de permanência e presença de outros focos infecciosos à distância, mas apresenta um alto valor preditivo negativo, principalmente para cateteres de longa permanência, o que pode evitar em muitos casos a retirada desnecessária dos mesmos (3,4,6,7).

Hemoculturas obtidas a partir de dispositivos intravasculares como cateteres ou ports, são associadas com maior taxa de contaminação (cerca de 10%) do que amostras coletadas por venopunção (2 - 3%) (36,37). Em casos específicos, onde há a necessidade de coleta através de dispositivos, esta deve ser sempre acompanhada de 1 ou 2 amostras de veia periférica para auxiliar na interpretação do resultado. Em caso de impossibilidade de coleta por veia periférica, colher duas amostras de duas vias diferentes do cateter (34).

Interpretação dos resultados

Por muitos anos tem sido consenso entre clínicos e microbiologistas que a hemocultura é um dos testes laboratoriais mais importantes para o diagnóstico de infecções graves.

O índice de positividade pode variar bastante de acordo com o tipo e o grau de complexidade da instituição (atendimento primário ou terciário, comunitário ou acadêmico), sendo em média de 10 a 15% (37). Quando este índice diminui para valores muito baixos (< 5%) ou aumenta muito (>15%), é conveniente que seja revista a adequação dos pedidos de hemoculturas pelo corpo clínico. Outro indicador que pode ser usado para monitorar se o pedido de exames está sendo apropriado é auditar o número de hemoculturas por 1000 pacientes-dia, que deve ficar entre 103 e 188 (2).

Alguns microrganismos têm alto valor preditivo positivo para bacteriemia verdadeira (> 90%), mesmo quando isolado em somente uma amostra como, por exemplo: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e outras *Enterobacteriaceae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brucella* spp.,

Streptococcus pyogenes, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, membros do grupo *Bacteroides fragilis*, *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., os quais quase sempre representam infecção verdadeira (1, 25).

Streptococcus viridans, *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) representam em média respectivamente 38%, 78% e 15% de bacteriemias verdadeiras (1).

Alguns tipos de microrganismos são mais frequentemente associados com contaminação (< 5% de chance de bacteriemia verdadeira) como *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Propionibacterium acnes* (1).

Outros patógenos mais raros costumam estar relacionados à imunossupressão causada por câncer ou leucemia, como *Aeromonas*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus* do grupo G e também membros do grupo *Streptococcus gallolyticus* (grupo *Streptococcus bovis*) (1, 29).

Quando uma hemocultura é inesperadamente positiva (na ausência de sinais ou sintomas) ou quando somente uma dentre várias amostras é positiva para um determinado microrganismo, este pode eventualmente ser considerado um contaminante.

Os índices de contaminação aceitáveis ficam em torno de 1 a 3%, sendo tolerável até 5%, podendo ser maiores em unidades de emergência e pediatria. Portanto, preferencialmente, as unidades devem ser monitoradas separadamente (24).

Nos últimos anos, tornou-se evidente que microrganismos antes considerados quase sempre contaminantes, como por exemplo, *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN), passaram a ser cada vez mais comumente isolados e algumas vezes associados a infecções verdadeiras (principalmente relacionadas a dispositivos invasivos), frequentemente confundindo a avaliação clínica (1). Além disso, hemoculturas falsamente positivas levam a trabalho extra ao laboratório, realização de exames adicionais, uso desnecessário de antibióticos e tempo prolongado de internação, com aumento dos custos.

Portanto, toda hemocultura positiva, com germes potencialmente contaminantes, deve ser criteriosamente avaliada, incluindo pacientes neonatos e lactentes, pela dificuldade de coleta em diferentes sítios anatômicos (25).

Muitos destes casos não são suficientemente avaliados somente pela identificação do gênero / espécie. O

número de amostras positivas sobre o número de amostras coletadas tem mostrado ser útil na interpretação do significado de hemoculturas positivas. Ao contrário de pacientes com endocardite ou outra infecção da corrente sanguínea, nos quais a maioria dos frascos é positiva, nos casos de contaminação, geralmente somente uma amostra (dentre duas ou mais coletadas) apresenta positividade. Enfatize-se aqui que a coleta de uma amostra única perde todo o significado, tornando impossível esta avaliação. Este é um dos motivos pelos quais se recomenda a coleta de no mínimo duas amostras de hemocultura de sítios diferentes (além de garantir um volume de sangue adequado) (1).

Ainda e apesar disso, alguns estudos mostram que mesmo uma única amostra com SCN pode ser indicativa de infecção em determinadas situações (principalmente associadas a cateter intravascular) e em pacientes de alto risco, encontrar mais de uma hemocultura positiva para bactérias normalmente consideradas contaminantes como *Corynebacterium* spp. e *Bacillus* spp., pode ter significado clínico (1, 12).

Limitações

Ainda não existe um padrão-ouro para o diagnóstico de ICS. Os métodos em uso requerem de horas a dias de incubação para detectar o crescimento de microrganismos. Não há um sistema comercial disponível

ou meio de cultivo capaz de possibilitar a detecção de todos potenciais patógenos. Num futuro próximo, é provável que os sistemas baseados em cultivo passem a ser substituídos ou complementados por métodos moleculares ou de espectrometria de massa com a possibilidade de se tornarem mais sensíveis e rápidos.

Comunicação dos resultados

O exame mais importante a ser realizado em qualquer hemocultura sinalizada como positiva é a coloração de Gram. É altamente provável que esta informação descritiva das características morfotintoriais, juntamente com os dados do paciente, irá ditar a escolha da antibioticoterapia primária com impacto positivo na escolha terapêutica e na evolução clínica (5).

Portanto, o resultado parcial de hemoculturas deve ser considerado de alta prioridade para notificação ao médico assistente, inclusive por escrito. É sempre útil rever outras culturas do mesmo paciente, para identificar possíveis pistas da identificação do agente. O número de hemoculturas positivas sobre o total de amostras enviadas e o tempo de positividade também devem ser analisados ao reportar os resultados. Estudos mostram que um período curto para a notificação do resultado ao médico consiste de importante fator para diminuir o tempo de internação e propiciar melhor evolução do paciente. Este deve ser considerado um "resultado crítico".

Agradecimentos especiais: Alberto Chebabo, Cássia Zoccoli, Rossiane Pereira e Tereza Bandeira pela revisão do documento.

Bibliografia

- Weinstein, M.P., M.L. Towns, S.M. Quartey, S. Mirrett, L.G. Reimer, G. Parmigiani, and L.B. Reller. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990's; a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology and fungemia in adults. *Clin. Infect. Dis.* 1997. 24:584-602.
- Baron, E.J., M.P. Weinstein, W.M. Dunne Jr, P. Yagupsky, D.F. Welch, and D.M. Wilson. *Cumitech 1 C, Blood Cultures IV*. Coordinating ed. E.J. Baron. 2005. ASM Press, Washington D.C.
- Araujo, M.R.E. Como pode ser feito o diagnóstico microbiológico das infecções relacionadas a cateter? em *Microbiologia Clínica: 156 perguntas e respostas / Caio Marcio Figueiredo Mendes*...[et al] - São Paulo: Sarvier, 2005, p. 98.
- O'Grady, N.P., M. Alexander, E.P. Dellinger, J.L. Gerberding, S.O. Heard, D.G. Maki, ...[et al] *Guidelines for the Prevention of Intravascular Device-Related Infections*. *MMWR* August 9, 2002/51 (RR10):1-26
- Beekmann, S.E., D.J. Diekema, K.C. Chapin, and G.V. Doern. Effects of Rapid Detection of Bloodstream Infections on Length of Hospitalization and Hospital Charges. *J. Clin. Microbiol.* 2003. 41(7):3119-3125.
- Siegman-Ingra, Y., A.M., Anglim, D.E. Shapiro, K.A. Adal, B.A. Strain and B.M. Farr. Diagnosis of Vascular-Related Bloodstream Infection: a Meta-Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1997. 35(4):928-936.
- Blot, F., E. Schmidt, G. Nitenberg, C. Tancrede, B. Leclercq, A. Laplanche, and A. Andrement. Earlier Positivity of Central Venous versus Peripheral-Blood Cultures Is Highly Predictive of Catheter-Related Sepsis. *J. Clin. Microbiol.* 1998. 36(1):105-109.
- Reller, L.B. Laboratory procedures in the management of infective endocarditis. Em A.L. Bisno (ed.) *Treatment of Infective Endocarditis*. Grune & Stratton, New York, N.Y. 1981, p. 235-267.

9. Anderson, E.T., L.S. Young and W.L. Hewitt. Simultaneous antibiotic levels in "breakthrough" gram negative bacteremia. *Am. J. Med.* 1976. 4: 493-497
10. Kreger, B. E., D. E. Craven, and W. R. McCabe. Gram-negative bacteremia. IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *Am. J. Med.* 1980. 68:344-355
11. Schimpff, S., W. Satterlee, V. M. Young, and A. Serpick. Empiric therapy with carbenicillin and gentamicin for febrile patients with cancer and granulocytopenia. *N. Engl. J. Med.* 1971. 284:1061-1065.
12. Weinstein, M.P. Blood Culture Contamination: Persisting Problems and Partial Progress. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41(6): 2275-2278.
13. Bennett Jr, I.L. and P.B. Beeson. Bacteremia: a consideration of some experimental and clinical aspects. 1954. *Yale J Biol Med* 26:241-262.
14. Thomson Jr, R.B, B.L. Evans, and J.L. Southerland, Collecting of Blood Culture. *Generalist Microbiology Tech Sample N° G-1. American Society of Clinical Pathologists, Northfield, Ill.* 1991.
15. Li, J., J.J. Plorde, and L.C. Carlson. Effects of volume and periodicity on blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1994. 32:2829-2831.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline. CLSI document M47-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2007.
17. Cockerill, F.R., J.W. Wilson, E.A. Vetter, A.M. Goodman, C.A. Torgerson, W.S. Harmsen, C.D. Schleck, D.M. Ilstrup, J.A. Washington II and W.R. Wilson. Optimal test parameters for blood cultures. *Clin. Infect. Dis.* 2004. 38:1724-1730.
18. Kellog, J.A., J.P. Manzella and D.A. Bankert. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J. Clin. Microbiol.* 2000. 38:2181-2185.
19. Szymczak, E.G, J.T. Barr, W.A. Durbin and D.A. Goldman. Evaluation of blood culture procedures in a pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 1979. 9:88-92.
20. Gomes, J., V. Barros, J. Ruiz, and col. Clinical significance of anaerobic bacteremias in a general hospital. A prospective study from 1988 a 1992. *Clin. Invest.* 1993; 71:595-599.
21. Dorsher, C.W., J.E. Rosenblatt, W.R. Wilson and D.M Ilstrup. Anaerobic bacteremia: decreasing rate over a 15 year period. *Rev. Infect. Dis.* 1991; 13:633-636.
22. Riley, J.A., B.J. Heiter and P.P. Bourbeau. Comparison of recovery of blood culture isolates from two BacT/ALERT FAN aerobic blood culture bottle with recovery from one FAN aerobic bottle and one FAN anaerobic bottle. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:213-217.
23. Mimoz, O., A. Karim, A. Mercat, B. Casseron, B. Falissard, F. Parker, C. Richard, K. Samil and P. Nordmann. Chlorhexidine compared with povidone-iodine as skin preparation before blood culture: a randomized controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 1999. 131: 834-837.
24. Souvenir, D., D.E. Anderson, S. Palpant, H. Mroch, S. Askin, J. Anderson, J. Claridge, J. Eiland, C. Malone, M.W. Garrison, P. Watson and D.M. Campbell. Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia and therapy of patients. *J. Clin. Microbiol.* 1998. 36:1923-1926.
25. Richter, S.S., J.L. Beekmann, J.L. Croco, J. Diekema, F.P. Koonts, M.A. Pfaller, and G.V. Doern. Minimizing the workup of blood culture contaminants: implementation and evaluation of laboratory-based algorithm. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40:2437-2444.
26. Dunne, W.M., and LaRocco. Blood culture systems. In: Cimolai, N. (ed.), *Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections.* Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 2001.
27. Campbell, J. and J.A. Washington II. Evaluation of the necessity for routine terminal subcultures of previous negative blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1980. 12:576-587.
28. Gill, V.J. Lack of clinical relevance in routine terminal subculturing of blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1981. 14:116-118.
29. Beebe, J. and E.W. Koneman. Recovery of uncommon bacteria from blood: association with neoplastic disease. *J. Clin. Microbiol.* 1995. 8 (3): 336-356.
30. Warren, J.R. and F Graham. The effect of heparin on the growth of bacteria and yeast. *J. Bacteriol.* 1950; 60:171-174.
31. Christman, J.F. and D.G. Doherty. The antimicrobial action of heparin. *J. Bacteriol.* 1956; 72:433-435.
32. Crump, J.A., Tanner, D.C., Mirrett, S., McKnight, C.M. and L.B. Reller. Controlled Comparison of BACTEC 13A, MYCO/F LYTIC, BacT/ALERT MB, and ISOLATOR 10 Systems for Detection of Mycobacteremia. 2003. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(5): 1987-1990.
33. Bille, J., L. Stockman, G.D. Roberts, C.D. Horstmeier, D.M. Ilstrup. Evaluation of lysis-centrifugations system for recovery of yeast and filamentous fungi from blood. *J. Clin. Microbiol.* 1983; 18: 469-471.
34. Mermel, L.A, M. Allon, E. Bouza, D. E., P. Craven Flynn, N.P. O'Grady, I. Raad, B.J.A. Rijnders, R. J. Sherertz, and D. K. Warren, *Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA).*
35. Lee, A., L. Mirret, B. Reller and M.P. Weinstein. Detection of Bloodstream Infection in Adults: How Many Blood Cultures are Needed. *J. Clin. Microbiol.* 2007. 45(11): 3546-3548.
36. Dwivedi, S, R.Bhalla, D. R. Hoover and M. P. Weinstein. Intravenous-Catheter-Drawn Blood Cultures Does Not Reduce Contamination Rates in Discarding the Initial Aliquot of Blood. *J. Clin. Microbiol.* 2009. 47(9):2950-2951.
37. Weinstein, M.P. and G. V. Doern. A Critical Appraisal of the Role of the Diagnosis of Bloodstream Infections. *J. Clin. Microbiol.* 2011. 49(9 Supplement):S26-S29
38. Rose, R., Hunting, K.H., Townsend T.R., e Wenzel, R.P. Mobility / mortality and economics of hospital-acquired infections: a controlled study. *South Med J.* 1977. 70:1268-1272.
39. Weinstein, M.P., Reller, L.B., Murphy, J.R., e Lichtenstein, K.A. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. 1983. *Rev. Infect. Dis.* 5:35-53.
40. Washington, J.A, II. Blood cultures: principles and techniques. *Mayo Clin. Proc.* 1975; 50:91-98.
41. Munier, G., Black, D. e Snyder J. Evaluation of BacT/ALERT blood culture media for the detection and recovery of *Histoplasma capsulatum* from blood, abstr. C-101, p.140. Abstr. 104th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 2004. American Society for Microbiology, Washington, DC.
42. Capdevil, J.A., Planes, A.M., Palomar, M. Gasser, I., Almirante, B., Pahissa, A., Crespo, E e Martinez-Vazquez, J.M. Value of differential quantitative blood cultures in the diagnosis of catheter-related sepsis. 1992. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11: 403-407.