



# **Gli esami colturali dei terreni: metodologie e metodiche a confronto**

Dott. Davide Camposampiero

IV Corso di Formazione Società Italiana Banche degli Occhi

Torino, 10 Ottobre 2009

# Background

- La cornea è un tessuto non sterile, la cui flora batterica è prevalentemente residenziale.
- Il 4-37% delle cornee prelevate da donatore risulta contaminata.
- Le condizioni di conservazione a 31-37°C favoriscono la crescita dei microrganismi resistenti alla decontaminazione e agli antibiotici presenti nel liquido di conservazione (0,5-11,4%).

## Linee Guida CNT (giugno 2007)

E.6.2.2 Conservazione “a caldo” a lungo termine.

[...] Durante questo periodo è obbligatorio eseguire indagini microbiologiche sul liquido di conservazione [...].

## **EEBA technical guidelines for ocular tissue (maggio 2009)**

### 2.3 Processing and storage of corneal tissue.

[...] Microbiological testing of media samples is mandatory, sole visual inspection of the medium for a change in colour or transparency is not acceptable.

# Controlli microbiologici

- Visual check
- Tradizionali
- Sistemi automatici di rilevazione

# Visual check del liquido di conservazione

- Viraggio dell'indicatore di pH (rosso fenolo) presente nel liquido: colore giallo = pH acido = crescita microbica
- Cambiamento della trasparenza del liquido: torbidità = crescita microbica

# Tipi di terreni in microbiologia

- Elettivi o arricchiti: nutrienti, per microrganismi esigenti
- Selettivi: inibiscono la crescita dei m. contaminanti
- Di arricchimento: favoriscono la crescita dei m. da isolare
- Differenziali: identificazione presuntiva della specie isolata

# Controlli tradizionali

- Tryptic soy agar/broth (TSA/TSB)
- Fluid Thyoglicollate medium (FTM)
- Sabouraud agar/broth





# Controlli tradizionali: validazione e vantaggi

grating. Seven days in transport medium is thought to be the maximum.<sup>14,15</sup>

## Microbiologic Control

After 3 days of organ culture, a sample (1 ml) of the medium (50 ml) is taken to test for bacterial and fungal contamination. It is incubated on blood agar plates and thioglycollate broth (TSB) medium at 37° C. All infected corneas (about 2% of the stored corneas) are removed from the eye bank and referred to the department of microbiology for identification of the bacteria or fungi. The most common contaminants are *Staphylococcus*

E. Pels et al. In Corneal surgery. F.S. Brightbill

Vantaggi: costi contenuti, adatti per volumi di lavoro contenuti

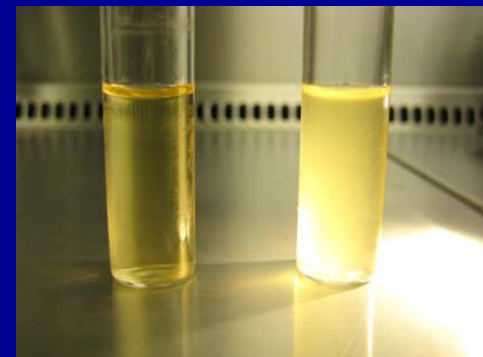
# Tryptic soy agar/broth (TSA/TSB)

- Utilizzato per la crescita di batteri e miceti
- Base per la produzione di terreni selettivi/arricchimento
- Fonti di aminoacidi e peptidi: idrolizzato di caseina, peptone di soia
- Equilibratore osmotico: NaCl
- Tampone pH: potassio fosfato bibasico
- Fonte di energia: glucosio
- Agente addensante: agar
- Reazioni emolitiche: sangue



# Fluid Thioglycollate Medium (FTM)

- Raccomandato per test di sterilità
- Utilizzato per la crescita di batteri e miceti aerobi, microaerofili e anaerobi
- Fonti di aminoacidi e peptidi: idrolizzato di caseina, estratto di lievito
- Equilibratore osmotico: NaCl
- Fonte di energia: glucosio
- Anti-diffusione di  $O_2$  e  $CO_2$ : agar (minima concentrazione)
- Riduzione potenziale redox dell' $O_2$ : gruppi  $-SH$  di L-cisteina e sodio tioglicollato



# Sabouraud agar/broth

- Terreno selettivo per funghi, lieviti e batteri acidofili
- pH acido
- Elevata concentrazione di glucosio



# Sistemi automatici: validazione

## Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media

Philippe Gain, Gilles Thuret, Christophe Chiquet, Anne-Catherine Vautrin, Anne Carricajo, Sophie Acquart, Jean Maugery, Gérald Aubert

### LABORATORY SCIENCE

## Sensitivity and rapidity of blood culture bottles in the detection of cornea organ culture media contamination by bacteria and fungi

G Thuret, A Carricajo, C Chiquet, A C Vautrin, N Celle, M Boureille, S Acquart, G Aubert, J Maugery, P Gain

.....  
*Br J Ophthalmol* 2002;**86**:1422-1427

### EXTENDED REPORT

## Efficiency of blood culture bottles for the fungal sterility testing of corneal organ culture media

G Thuret, A Carricajo, A C Vautrin, H Raberin, S Acquart, O Garraud, P Gain, G Aubert

.....  
*Br J Ophthalmol* 2005;**89**:586-590. doi: 10.1136/bjo.2004.053439

# Sistemi automatici di rilevazione: vantaggi

- Minima manipolazione durante l'inoculo
- Neutralizzazione degli antibiotici
- Agitazione continua
- Monitoraggio non invasivo
- Adatti per elevati volumi di lavoro

# Bactec BD

- **Composizione:**
  - idrolizzato di caseina, estratto di lievito
  - vitamine
  - glucosio
  - antiossidanti
  - menadione (vitamina K3)
  - emina (fattore X)
  - resine polimeriche assorbenti e resine a scambio cationico (attive per anfotericina; penicillina, streptomina)
- **Lettura della fluorescenza indotta dalla CO<sub>2</sub> prodotta dai microrganismi**



# BacT/ALERT

- Composizione:
  - peptone di soia
  - estratto di cuore - cervello
  - menadione (vitamina K3)
  - emina (fattore X)
  - aminoacidi
  - carbone attivo per l'assorbimento degli antibiotici presenti nel campione
- Rilevazione della variazione colorimetrica indotta dalla CO<sub>2</sub> prodotta dai microrganismi





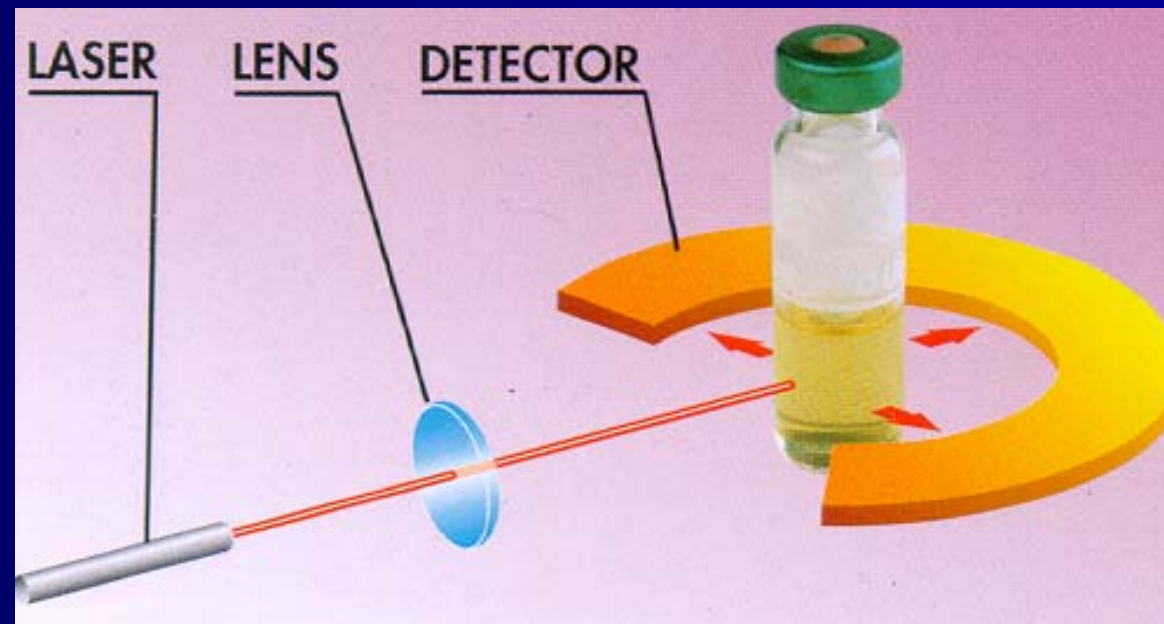
# VersaTREK

- Lettura delle variazioni di pressione all'interno dei flaconi (consumo di  $O_2$ , produzione di  $CO_2$ ,  $N_2$ ,  $H_2$ )
- Sensore collocato nello strumento



# Uro-Quick

- Light scattering con luce laser
- Tempo di risposta: 6-8 ore



# Controlli microbiologici in eye banking

## Documento SIBO

Il rischio microbiologico connesso al trapianto di cornee conservate a caldo si riduce con:

- Disinfezione prima del prelievo
- Presenza di antibiotici, anti-fungini e indicatori di pH nei liquidi di conservazione
- Controlli microbiologici durante la quarantena
- Controllo del liquido di trasporto e tempestiva comunicazione al chirurgo in caso di crescita microbica

# Grazie



T. De Lempicka, 1929. Portrait of dr. Boucard