



Società Italiana Banche degli Occhi

IV Corso di Formazione

Torino, 10 ottobre 2009

Accademia di Medicina - Via Po, 18

Proposta di linee-guida SIBO per gli esami colturali dei terreni

Dr. Claudio Giannarini

Centro Conservazione Cornee "Piero Perelli"

Riferimenti Normativi (Linee guida)

6.2.2. Conservazione “a caldo” a lungo termine

La conservazione “a caldo” consente la conservazione a lungo termine della cornea isolata mantenuta a $+31^{\circ}/+37^{\circ}\text{C}$. Il periodo di conservazione può essere protratto oltre le due settimane. Durante questo periodo è obbligatorio eseguire indagini microbiologiche sul liquido di conservazione ed almeno una valutazione delle cornee al microscopio ottico per accertarne l'idoneità.

Riferimenti Bibliografici

Cornish KS, Ramamurthi S, Butcher I, Ramaesh K. – *“Is microbiological analysis of donor cornea transport culture media necessary?” - Eur J Ophthalmol. 2009 Jan-Feb;19(1):137-8*

Wilhelmus KR, Hassan SS. – *“The prognostic role of donor corneoscleral rim cultures in corneal transplantation.” - Ophthalmology. 2007 Mar;114(3):440-5*

Keyhani K, Seedor JA, Shah MK, Terraciano AJ, Ritterband DC. – *“The incidence of fungal keratitis and endophthalmitis following penetrating keratoplasty.” - Cornea. 2005 Apr;24(3):288-91*

Albon J, Armstrong M, Tullo AB. – *“Bacterial contamination of human organ-cultured corneas.” Cornea. 2001 Apr;20(3):260-3*

Terreni indicati da Farmacopea Ufficiale

Terreno fluido al tioglicolato

Destinato alla coltura di batteri anaerobi, ma permette anche di evidenziare i batteri aerobi.

Terreno di idrolizzato di soia e caseina

Destinato alla coltura di batteri aerobi, ma è anche appropriato per i funghi.

Metodi indicati da Farmacopea Ufficiale

- Filtrazione su membrana
- Inoculazione diretta del terreno di coltura

Modalità di esecuzione di saggio di sterilità (inoculazione diretta del terreno di coltura)

- Inoculo in terreni semisolidi
- Inoculo in terreni liquidi
- Inoculo in sistemi automatici

Uso dei sistemi di emocoltura invece dei sistemi tradizionali

G. Thuret, A. Carricajo, C. Chiquet, A.C. Vautrin, M. Boureille, S. Acquart, G. Aubert, J. Maugery, P. Gain – *“Optimisation du contrôle microbiologique des milieux d’organoculture des greffons cornéens”* - *J Fr. Ophthalmol.*, 2003; 26, 8, 792-800

G. Thuret, A. Carricajo, A.C. Vautrin, H. Raberin, S. Acquart, O. Garraud, P. Gain and G. Aubert – *“Efficiency of blood culture bottles for the fungal sterility testing of corneal organ culture media”* - *Br. J. Ophthalmol.* 2005;89;586-590

G. Thuret, A. Carricajo, C. Chiquet, A.C. Vautrin, N. Celle, M. Boureille, S. Acquart, G. Aubert, J. Maugery and P. Gain – *“Sensitivity and rapidity of blood culture bottles in the detection of cornea organ culture media contamination by bacteria and fungi”* - *Br. J. Ophthalmol.* 2002;86;1422-1427

P. Gain, G. Thuret, C. Chiquet, A.C. Vautrin, A. Carricajo, S. Acquart, J. Maugery and G. Aubert – *“Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media”* - *Br. J. Ophthalmol.* 2001;85;1158-1162

Bourbeau P, Riley J, Heiter BJ, Master R, Young C, Pierson C. – *“Use of the BacT/Alert blood culture system for culture of sterile body fluids other than blood.”* - *J Clin Microbiol.* 1998 Nov;36(11):3273-7.

Melhus A, Tjernberg I. – *“Blood culture bottles for transportation and recovery of anaerobic bacteria from non-blood samples.”* - *APMIS.* 2000 Jun;108(6):453-8.

Terreni utilizzati in sistemi da emocoltura

Flaconi Bactec

Aerobi - Brodo alla caseina di soia con CO_2 e arricchimenti come estratto di lievito, saccarosio, emina, vitamina B6 e resine per l'assorbimento di antibiotici.

Anaerobi - Stessa composizione con in più sostanze riducenti.

Flaconi BacT/Alert

Aerobi/anaerobi - Trypticose soy broth arricchito con Peptone, + supplemento Brain Heart Infusion in fase solida e carbone attivato per l'assorbimento di antibiotici

Dopo quanti giorni è opportuno eseguire il primo inoculo?

EEBA Technical Guidelines for Ocular Tissues

A minimum storage period is mandatory to allow for proper microbiological testing thus minimizing the risk of contamination. The time period required to perform microbiological tests of the cornea in the storage medium is at the discretion of the Director. The efficacy of this quarantine period should be evaluated and validated.

Dopo quanti giorni è opportuno eseguire il primo inoculo?

Nessun lavoro bibliografico

Permanenza minima in terreno di coltura prima del primo inoculo 5 gg.? 4 gg.? 3 gg.?

Secondo l'esperienza del Microbiologo (locale) sono sufficienti 24 ore. Ma prima?

Quanto è il volume minimo di inoculo
necessario?

Farmacopea Ufficiale

Inoculazione diretta del terreno di coltura. Trasferire la quantità di preparazione da esaminare, prescritta nella Tabella 2.6.1.-2, direttamente nel terreno di coltura in modo che il volume del prodotto **non sia più del 10 per cento** del volume del terreno di coltura, salvo indicazioni diversa.

Tabella 2.6.1-2. - *Quantità di prodotto da esaminare nel Saggio di sterilità*

Tipo di preparazione	Quantità per contenitore	Quantità minima da usare per ciascun terreno di coltura salvo indicazione diversa giustificata ed autorizzata
Preparazioni parenterali	<p><i>Liquidi</i> inferiore ad 1 ml 1 ml o più</p> <p><i>Solidi</i> inferiore a 50 mg 50 mg o più ma non oltre 300 mg</p> <p>300 mg o più</p>	<p>L'intero contenuto di un recipiente La metà del contenuto di un recipiente, ma non più di 20 ml</p> <p>L'intero contenuto di un recipiente La metà del contenuto di un recipiente</p> <p>150 mg</p>
Preparazioni oftalmiche ed altre preparazioni non iniettabili	<p>Soluzioni acquose</p> <p>Altre preparazioni solubili in acqua o in isopropile miristrato</p> <p>Preparazioni insolubili, creme ed unguenti da sospendere o da emulsionare</p>	<p>L'intero contenuto di uno o più recipienti purché non inferiore a 2,5 ml</p> <p>L'intero contenuto di uno o più recipienti purché non inferiore a 0,25 g</p> <p>L'intero contenuto di uno o più recipienti purché non inferiore a 0,25 g</p>
Catgut e altri fili chirurgici per uso veterinario		3 sezioni di un filo (ciascuna di 30 cm di lunghezza)

Quanto è il volume minimo di inoculo
necessario? (Farmacopea Ufficiale)

- Non più del 10% V/V
- Non meno di 2,5 ml non più di 20 ml

Coltura del terreno di trasporto

Bacterial contamination of human organ-cultured corneas.

The observation of microbial contaminations in a time close to the transplant (i.e., at the end of the preservation period and in the deswelling step) showed that a fast microbial tests during the deswelling procedure may prevent the grafting of a contaminated cornea. The appearance of bacteria in the deswelling medium despite a negative culture medium suggests that bacteria penetrate the corneal tissues during the culture to be subsequently extruded when the internal fluids move outward.

Tempo minimo per l'esecuzione dell'inoculo (del terreno di trasporto)

Raccomandazione di effettuare il test di crescita microbica sul terreno di trasporto ma, il tempo minimo per l'esecuzione dell'inoculo è a discrezione del Direttore della Banca.

In questo modo anche se si utilizza un tessuto conservato in organocoltura per una richiesta in urgenza, vi è la possibilità, dopo permanenza del tessuto nel terreno per alcune ore (3, 4, 5?), di eseguire l'inoculo e di spedire il tessuto.

Indagini su terreni specifici per miceti?

Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for candida growth detection.

The media used with the Bactec system were the Plus Aerobic/F (aerobic), Plus Anaerobic/F (anaerobic), and Myco/F Lytic (mycology), while FA (aerobic), SN (anaerobic), and MB (mycology) were used with the BacT system. Three of the six types of media were able to detect growth of all 50 *Candida* isolates. These included the two specialized mycology media (Bactec Myco/F Lytic and BacT MB) and the BacT aerobic medium (FA).

Tempo necessario per considerare una coltura negativa

Time to detection of positive BacT/Alert blood cultures and lack of need for routine subculture of 5- to 7-day negative cultures.

Analysis of time to instrument detection for approximately 2,900 positive blood cultures indicates that 5 or 6 days of incubation is sufficient for the routine detection of clinically significant organisms from BacT/Alert blood cultures. These data indicate that subculture of 5- to 7-day instrument-negative BacT/Alert blood culture bottles is not necessary.

Hardy DJ, Hulbert BB, Migneault PC. – “Time to detection of positive BacT/Alert blood cultures and lack of need for routine subculture of 5- to 7-day negative cultures.” - J Clin Microbiol. 1992 Oct;30(10):2743-5

Tempo necessario per considerare una coltura negativa

Routine incubation of BacT/ALERT FA and FN blood culture bottles for more than 3 days may not be necessary.

We reviewed time to detection for 35,500 blood cultures collected in BacT/ALERT FA and FN bottles. In the first 3 days of incubation, 97.5% of the 2,609 clinically significant isolates were detected, suggesting that routine incubation for more than 3 days may not be necessary for FA and FN bottles.

Bourbeau PP, Foltzer M. – “Routine incubation of BacT/ALERT FA and FN blood culture bottles for more than 3 days may not be necessary.” - J Clin Microbiol. 2005 May;43(5):2506-9.

Tempo necessario per considerare una coltura negativa

Detection of bacteria and fungi in BacT/Alert standard blood-culture bottles.

In conclusion, if the incubation period had been less than 3 days, 11 patients with clinically significant bacteremia or fungemia, (3.2% of all patients with bacteremia or fungemia) would have been undiagnosed. Similarly, with an incubation period of 5 days, 5 such patients (1.5%) would have been undiagnosed.

Saito T, Senda K, Takakura S, Fujihara N, Kudo T, Iinuma Y, Tanimoto M, Ichiyama S. – “*Detection of bacteria and fungi in BacT/Alert standard blood-culture bottles.*” *J Infect Chemother.* 2003 Sep;9(3):227-32.

E' necessario valutare la crescita microbica sul rim sclerale residuo post trapianto?

E' necessario predisporre indagini specifiche (terreno dedicato es. Sabouraud) per miceti?

Analisi rim sclerale post-trapianto

Dal documento SIBO "Controlli Microbiologici in Eye Banking":

.....

Alcuni centri di trapianto effettuano, all'atto dell'intervento chirurgico, un controllo microbiologico sul terreno di trasporto o sull'anello corneo-sclerale residuo. In letteratura emerge una notevole discrepanza tra la positività di questo test e il reale rischio di infezione. Ciò ha portato numerosi autori a concludere che, visto lo scarso valore predittivo, tale procedura non assicura la qualità e non è utile nella scelta della terapia antimicrobica del paziente trapiantato. La Società Italiana Banche degli Occhi ritiene di lasciare ai singoli chirurghi la decisione sull'opportunità di eseguire tali test.

.....

Analisi rim sclerale e/o indagini specifiche per miceti

Candidal endophthalmitis after keratoplasty

Of the 44 collected cases of postkeratoplasty candidal endophthalmitis, 40 (91%) had the same organism cultured from the donor rim or medium. Forty-three donor corneas had been preserved in cold storage medium at 4 degrees C. CONCLUSION: Case reports confirm the occurrence of donor-to-host transmission of postkeratoplasty candidal endophthalmitis. Despite the low reported incidence, the poor prognosis of the affected eye in the majority of these cases suggests the need for antifungal supplementation of cold preservation media and other preventative strategies.

Analisi rim sclerale e/o indagini specifiche per miceti

The incidence of fungal keratitis and endophthalmitis following penetrating keratoplasty

The overall incidence of fungal infection following penetrating keratoplasty is low, but all cases in our study were associated with positive rim cultures. Whether prophylactic antifungal therapy would be of any benefit in the presence of a positive corneoscleral rim culture has not yet been determined.

Keyhani K, Seedor JA, Shah MK, Terraciano AJ, Ritterband DC - *The incidence of fungal keratitis and endophthalmitis following penetrating keratoplasty. Cornea. 2005 Apr;24(3):288-91*

Analisi rim sclerale e/o indagini specifiche per miceti

Late-onset donor-to-host transmission of *Candida glabrata* following corneal transplantation

Treatment with topical and intracameral amphotericin B and systemic fluconazole, along with topical corticosteroids and intracameral t-PA, was successful in eradicating the corneal infiltrate and resolving intraocular inflammation. Four months after treatment was initiated, there was no evidence of recurrent fungal keratitis or endophthalmitis. **CONCLUSION:** This case provides support for the practice of obtaining routine fungal cultures of donor rims at the time of corneal transplantation and for the implementation of prophylactic antifungal therapy in culture-positive cases.

Analisi rim sclerale e/o indagini specifiche per miceti

The prognostic role of donor corneoscleral rim cultures in corneal transplantation

Endophthalmitis after penetrating keratoplasty is more likely with a culture-positive donor rim, notably candidal endophthalmitis from fungal contaminants, but better evidence is needed to determine the prognostic value and manner of routine microbiological screening.

Analisi rim sclerale e/o indagini specifiche per miceti

*Donor-to-host transmission of *Candida glabrata* to both recipients of corneal transplants from the same donor.*

A short death-to-harvesting time, routine donor rim cultures, and respecting of a time interval before transplantation may provide an additional safety feature in dealing with corneal tissue from high-risk donors.

Tappeiner C, Goldblum D, Zimmerli S, Fux C, Frueh BE. "Donor-to-host transmission of *Candida glabrata* to both recipients of corneal transplants from the same donor. " - *Cornea*. 2009 Feb;28(2):228-30.

Analisi rim sclerale post-trapianto

Si potrebbe modificare il documento SIBO "Controlli Microbiologici in Eye Banking":

.....

Alcuni centri di trapianto effettuano, all'atto dell'intervento chirurgico, un controllo microbiologico sul terreno di trasporto o sull'anello corneo-sclerale residuo. In letteratura emerge una notevole discrepanza tra la positività di questo test e il reale rischio di infezione. Ciò ha portato numerosi autori a concludere che, visto lo scarso valore predittivo, tale procedura non assicura la qualità e non è utile nella scelta della terapia antimicrobica del paziente trapiantato. La Società Italiana Banche degli Occhi ritiene di lasciare ai singoli chirurghi la decisione sull'opportunità di eseguire tali test **per batteri, ma consiglia comunque di effettuare ricerca specifica per miceti.**

.....

Bozza di linea guida

In caso di conservazione in organocoltura è obbligatorio eseguire test di crescita microbica sul terreno di coltura.

L'inoculo deve essere eseguito entro un periodo di tempo a discrezione del Direttore della Banca.

Si raccomanda di utilizzare un terreno di brodo-coltura e di eseguire un inoculo di almeno 2,5 ml. fino al 10% v/v di campione/terreno di coltura batteriologico.

Devono essere utilizzati terreni liquidi per aerobi e per anaerobi, ed è consigliabile anche l'utilizzo di un terreno specifico per miceti.

Si può utilizzare un terreno di brodo-coltura tradizionale in flaconi di almeno 25 ml. In questo caso è raccomandato di utilizzare terreno fluido al tioglicolato per gli anaerobi e terreno di idrolizzato di soia e caseina per gli aerobi e i miceti.

Si può utilizzare un sistema automatico per emocoltura.

Si raccomanda di eseguire un test di crescita microbica anche sul terreno di trasporto con inoculo eseguito entro un periodo di tempo a discrezione del Direttore della Banca.

I flaconi inoculati con il terreno (di coltura o di trasporto) devono essere incubati per non meno di 6-7 gg. prima di considerarli negativi.

The end