



# **Review sui controlli microbiologici nel banking dei tessuti corneali**

X Corso SIBO  
Napoli, 23 Aprile 2016

Alessandra Russo  
Banca delle Cornee di Imola

# Cornea: tessuto non sterile

ARTICLE | August 1967

## Bacteriologic Study of "Donor" Eyes Evaluation of Antibacterial Treatments Prior to Corneal Grafting

Frank M. Polack, MD; Deborah Locatcher-Khorazo, MD; Elizabeth Gutierrez, BA

*Arch Ophthalmol.* 1967;78(2):219-225. doi:10.1001/archopht.1967.00980030221018.

Text Size: [A](#) [A](#) [A](#)

Article

References

Comments

### ABSTRACT

[ABSTRACT](#) | [REFERENCES](#)

A bacteriologic study of 240 eyes obtained postmortem revealed 100% positive cultures. The bacterial flora of these eyes was qualitatively similar to the bacterial flora of normal eyes but there was an increase in the number of gramnegative potential pathogens. Evaluation of two commonly used methods of soaking the "donor" eyes in antiseptic solutions indicated that they did not sterilize the eye but could spread the contamination. It was found that a neomycinpolymyxin B solution used to irrigate the cornea produced negative cultures or notably diminished the contamination of this tissue. Removal of the corneal epithelium with a gauze also decreased the contamination or produced negative cultures in some instances.

# Riduzione e annullamento della contaminazione microbica

- Selezione del donatore: nessuna relazione fra sesso<sup>1</sup>, età<sup>1</sup>, causa di morte<sup>2</sup> (sepsi<sup>3-4</sup>) e rischio di trasmissione microbica.

1. Linke SJ, Fricke OH, Eddy MT, Bednarz J, Druchkiv V, Kaulfers PM, Wulff B, Püschel K, Richard G, Hellwinkel OJ. Risk factors for donor cornea contamination: retrospective analysis of 4546 procured corneas in a single eye bank. *Cornea*. 2013 Feb;32(2):141-8. doi: 10.1097/ICO.0b013e31825d586b.

2. Gavrilov JC, Borderie VM, Laroche L, Delbosc B. Influencing factors on the suitability of organ-cultured corneas. *Eye (Lond)*. 2010 Jul;24(7):1227-33. doi: 10.1038/eye.2009.312. Epub 2010 Jan 8.

3 In accordo con Direttiva EU 2006/17/EC, Annex 1 , 1.1.5

4. Spelsberg H, Reinhard T, Sengler U, Daeubener W, Sundmacher R. Organ-cultured corneal grafts from septic donors: a retrospective study. *Eye (Lond)*. 2002 Sep;16(5):622-7.

- Metodiche di lavaggio e disinfezione del tessuto, in sede di prelievo e di lavorazione
  - Irrigazione dell'occhio con soluzione fisiologica
  - Disinfezione con Iodopovidone (PVP-I)
  - Medium di coltura con mix antibiotici (penicillina G, streptomina) e antimicotici (anfotericina B)
- Test di sterilità validati effettuato durante la coltura



**Incidenza standard di contaminazioni microbiologiche del tessuto tra 5 - 7%<sup>5-6</sup>.**

5. Armitage, Easty. Factors influencing the suitability of organcultured corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 16–24

6. Zanetti, Bruni , Mucignat , Camposampiero, Frigo, Ponzin. Bacterial Contamination of Human Organ-Cultured Corneas *Cornea* 2005; 24: 603–607

# Rischio microbiologico nel trapianto di cornea

Incidenza di endoftalmiti post-trapianto è 0.05%<sup>1</sup>.

1. European Eye Banks Association (EEBA) Directory 22th edition 2014.

Incidenza di endoftalmiti

tra 0 - 0.1% per cornee a caldo<sup>2</sup>

tra 0.2 - 1.3% a freddo<sup>2</sup>

2. Pels E, Beele H, Claerhout I. Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage. Int Ophthalmol. 2008 Jun;28(3):155-63. Review.

# Riferimenti normativi e documenti tecnici per il controllo microbiologico

## LINEE GUIDA PER IL PRELIEVO, LA PROCESSAZIONE E LA DISTRIBUZIONE DI TESSUTI A SCOPO DI TRAPIANTO

Approvate dal Centro Nazionale Trapianti, luglio 2013

 **SIBO**  
Società Italiana Banche degli Occhi  
CONTROLLI MICROBIOLOGICI IN EYE BANKING



### Medical Standards

These Standards have the approval of the Eye Banking Committee  
of the American Academy of Ophthalmology

July 2014



Document	Technical Guidelines for Ocular Tissue (TGOT)
Revision	6
Page	1 of 9
Operative from	1 February 2013

TECHNICAL GUIDELINES FOR OCULAR TISSUE™

# Riferimenti normativi e documenti tecnici per il controllo microbiologico

## **LINEE GUIDA PER IL PRELIEVO, LA PROCESSAZIONE E LA DISTRIBUZIONE DI TESSUTI A SCOPO DI TRAPIANTO**

Approvate dal Centro Nazionale Trapianti, luglio 2013

### **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°/+37°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 normativi e documenti tecnici per il controllo microbiologico



## Strategie di controllo volte alla massima riduzione del rischio

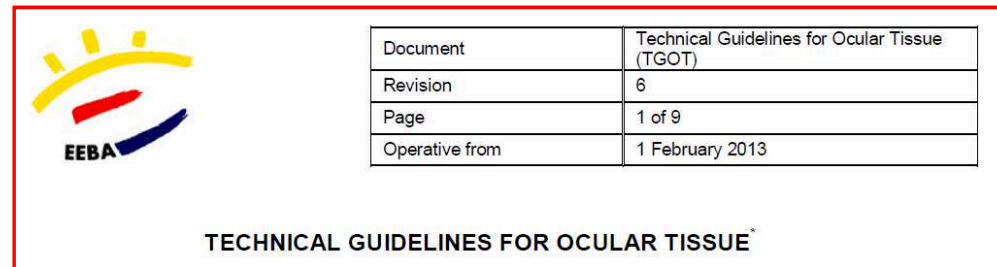
Nell'ambito dei controlli microbiologici pre-operatori:

- accurata disinfezione dell'area oculare prima del prelievo del lembo sclero-corneale;
- conservazione delle cornee in liquidi di coltura contenenti antibiotici e anti funginei ad ampio spettro
- presenza di indicatori di pH nei liquidi (in modo che il viraggio o la comparsa di torbidità vengano evidenziati all'ispezione, essi hanno un valore predittivo positivo del 100% e negativo del 99%);
- controlli microbiologici di laboratorio sui liquidi di conservazione durante la quarantena;
- un ulteriore controllo effettuato prima della consegna al chirurgo sul terreno di trasporto nel quale è stato trasferito il tessuto. Se tale indagine risulta positiva a trapianto avvenuto, viene data tempestiva comunicazione al chirurgo per l'istituzione di adeguata sorveglianza ed eventuale profilassi.

Nell'ambito dei controlli microbiologici peri-operatori:

- alcuni centri di trapianto effettuano, all'atto dell'intervento chirurgico, un controllo microbiologico sul terreno di trasporto o sull'anello corneo-sclerale residuo. Visto lo scarso valore predittivo, tale procedura non assicura la qualità e non è utile nella scelta della terapia antimicrobica del paziente trapiantato.

# Riferimenti normativi e documenti tecnici per il controllo microbiologico



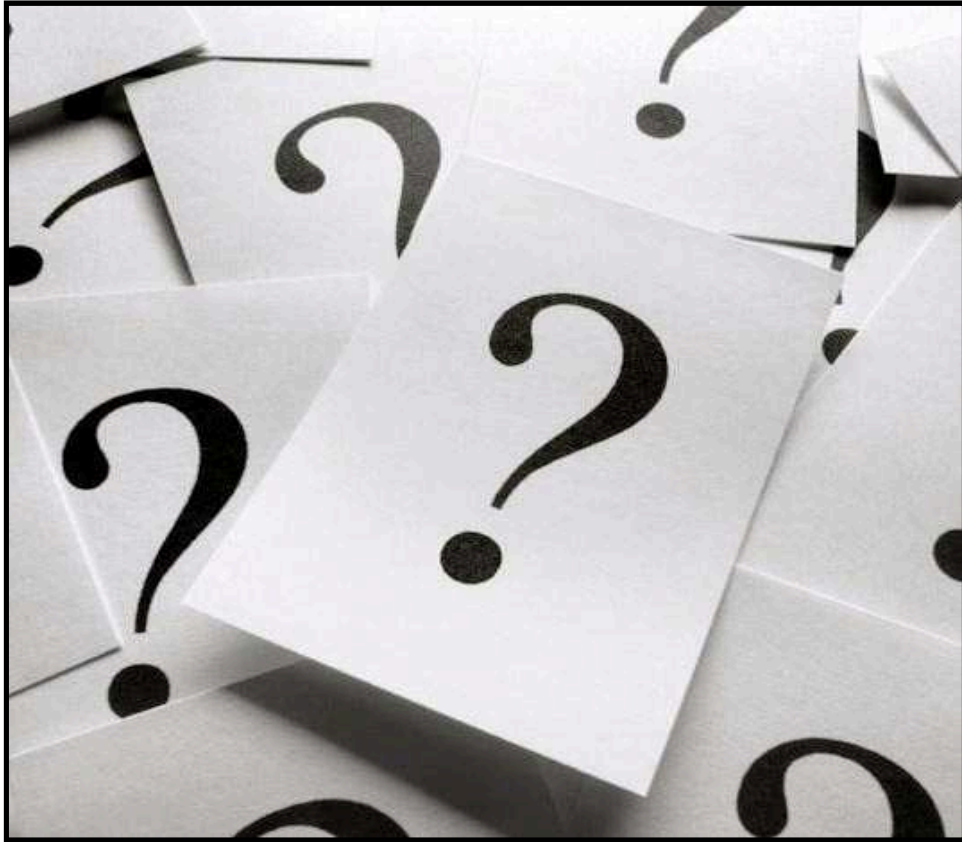
Stoccaggio a freddo:

“Dovrebbero essere espresse specifiche istruzioni per l’uso chirurgico con raccomandazione di effettuare il test microbiologico sul terreno di coltura corneale e/o sull’anello sclero corneale residui al momento della chirurgia.”

Stoccaggio a caldo in organo coltura:

“Il controllo microbiologico dei campioni di terreno è necessario, la sola ispezione visiva del terreno per la ricerca del cambiamento di colore e della trasparenza non è accettabile”.





## **TEST DI STERILITA'**

- Come effettuarlo?
- Con quali volumi?
- Su quali liquidi?
- A che tempo di incubazione?
- Come validarlo?

# Test di sterilità: come effettuarlo

Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, XII Edizione, 2008

✓ Filtrazione su membrana

✓ Inoculazione diretta nel terreno di coltura

## **Metodi colturali classici**

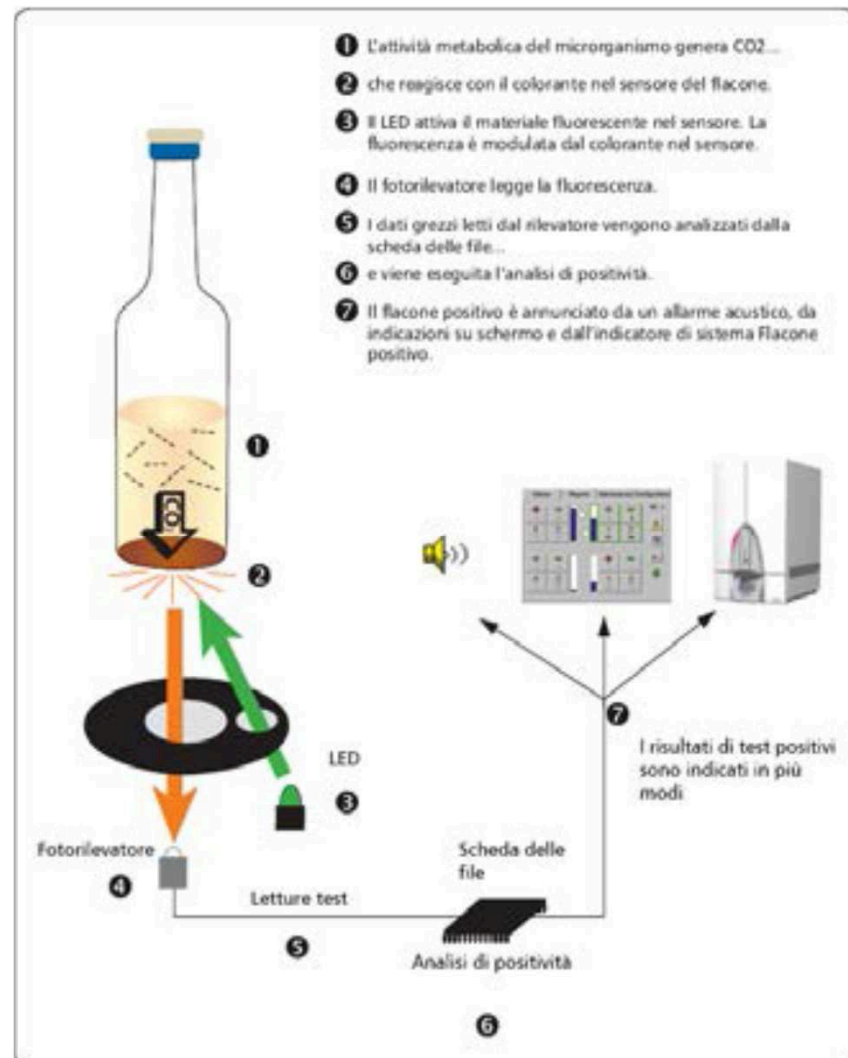
Inoculo in terreni semisolidi o liquidi  
(Terreno di idrolizzato di soia e caseina  
Terreno fluido al tioglicolato)

## **Inoculo in sistemi automatizzati**

(capitolo 2.6 test di sterilità):

- Sistema BD Bactec (Becton Dickinson)
- Sistema BacT/ALERT (Biomerieux)
- Sistema HB&L (Alifax)

# Sistema BD Bactec (Becton Dickinson)



Metodo fluorimetrico (sensore fluorescente reagisce in presenza di CO<sub>2</sub>)

Flaconi BD BACTEC™:

brodo alla caseina di soia con CO<sub>2</sub> e arricchimenti come estratto di lievito, saccaroso, emina, vitamina B6, ecc.

Nel tipo per anaerobi sono presenti anche sostanze riducenti atte ad assicurare il giusto ambiente per la crescita degli anaerobi.

# Sistema BacT/ALERT (Biomerieux)

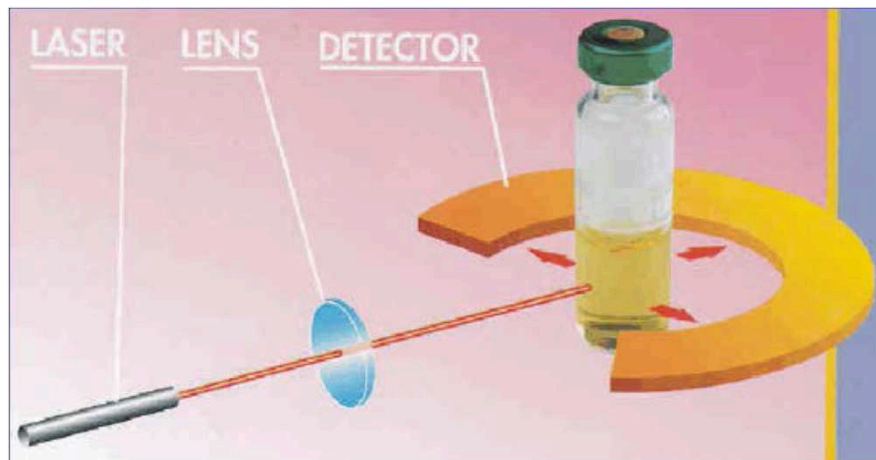


Metodo colorimetrico (sensore gas permeabile verde azzurro reagisce in presenza di CO<sub>2</sub> dando una colorazione gialla).

I flaconi BacT/ALERT® FA Plus contengono 30 ml di terreno complessato e 1,6g di particelle polimeriche assorbenti. La formulazione del terreno consiste in peptone di caseina (1,0% p/v), estratto di lievito (0,45% p/v), peptone di farina di soia (0,3% p/v), peptone di carne (0,1% p/v), polianetolsulfonato di sodio (SPS) (0,083% p/v), menadione (0,00005% p/v), emina (0,0005% p/v), L-cisteina (0,03% p/v), acido piruvico (0,1% p/v), piridossine HCl (0,001% p/v), acido nicotinico (0,0002% p/v), acido pantotenico (0,0002% p/v), tiamina HCl (0,0001% p/v) e altri substrati a base di carboidrati e aminoacidi complessi in acqua purificata.

I flaconi BacT/ALERT® FN Plus contengono 40 ml di terreno complessato e 1,6g di particelle polimeriche assorbenti. Il terreno consiste in una combinazione di peptoni (1,48% p/v), estratto di lievito (0,5% p/v), polianetolsulfonato di sodio (SPS) (0,083% p/v), menadione (0,00005% p/v), emina (0,001% p/v), piridossine HCl (0,0008% p/v), acido piruvico (0,1% p/v), agenti riducenti (0,38% p/v) e altri substrati a base di carboidrati e aminoacidi complessi in acqua purificata.

# Sistema HB&L (Alifax)



Metodo nefelometrico (misura della quantità di sostanza in sospensione attraverso il light scattering o diffusione ottica)

Flaconi aerobi:

terreno di coltura liquido BHI

Flaconi anerobi:

terreno di coltura liquido Schaedler

Flaconi miceti:

terreno di coltura liquido Sabouraud additivato con un antibiotico

# Test di sterilità: quali volumi

Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, XII Edizione, 2008

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

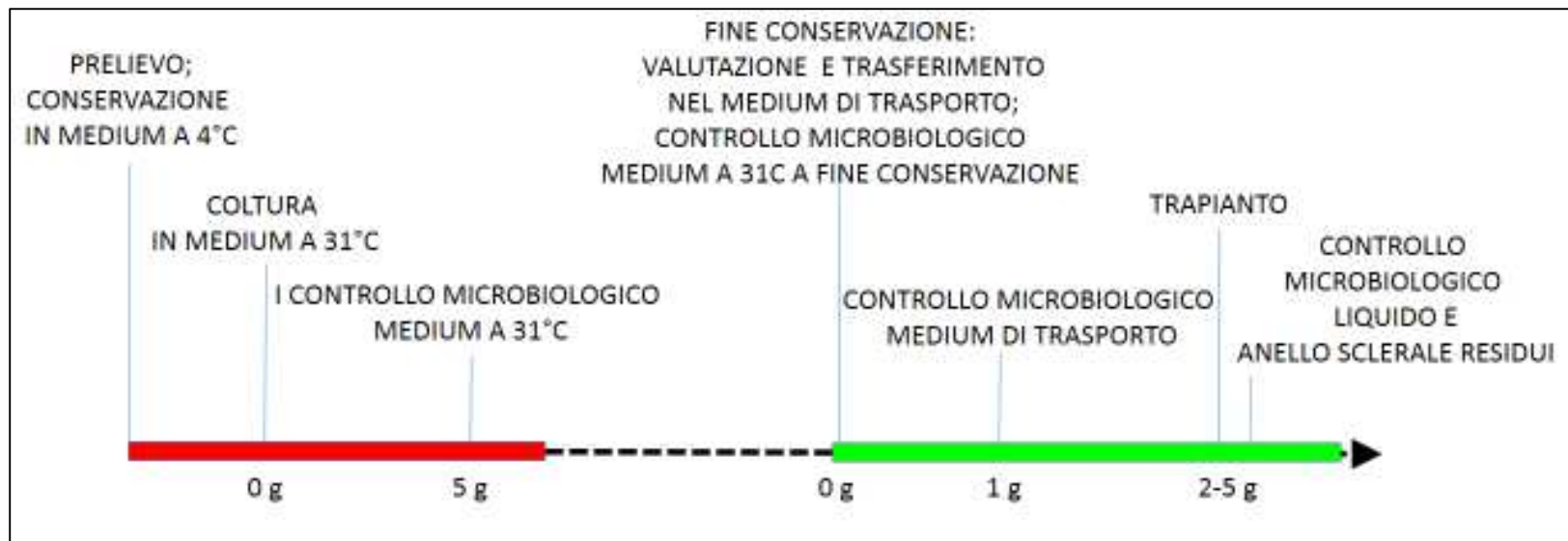
Tabella 2.6.1.-2:

non meno di 2.5 mL e non più di 20 mL, e comunque non più del 10% V/V.

# Test di sterilità: quali liquidi da testare quali tempi di incubazione

Technical guidelines for ocular tissue (EEBA):

Un minimo periodo di incubazione è necessario per permettere un corretto test microbiologico. Il periodo di tempo richiesto per effettuare il controllo microbiologico della cornea nel medium di coltura è a discrezione del direttore della banca. L'efficacia di questo periodo di quarantena dovrebbe essere valutata e validata.



Schema riassuntivo dei possibili controlli microbiologici effettuati nelle banche delle cornee con indicazione del tempo medio in cui vengono effettuati.

# **Questionario**

## **Banche degli Occhi italiane**

in accordo con il Comitato Scientifico SIBO  
anno di attività 2015  
13/13 banche operative



## Quale liquido di conservazione è testato?

	N.° banche	%	Tempo dall'inizio dell'incubazione (media)	Note
<b>Medium a 4°C (entrata)</b>	4/13	31%	2 gg (min: 1; max: 5)	2: solo per le cornee in ipotermia, 1: positività non causa di smaltimento 1: positività causa di smaltimento
<b>Medium a 31°C (quarantena)</b>	13/13	100%	6 gg (min: 4; max: 7)	
<b>Medium a 31°C (fine quarantena)</b>	6/13	46%	Termine coltura, al trasferimento	
<b>Medium di trasporto e deturgescenza (uscita)</b>	12/13	92%	24 ore (min: 6; max: 48)	
<b>Altro</b>	1/13	8%	n.d.	Anello sclerale residuo

# Dettaglio liquidi testati

N. banche	Medium a 4°C	Medium a 31°C in quarantena	Medium a 31°C a termine coltura	Trasporto	Anello sclerale residuo
5					
1	Solo per ipotermia				
1	Solo per ipotermia				Solo per alcune sedi trapianto
4					
1	(+ non causa di smaltimento)				
1	(+ causa di smaltimento)				

## Qual è il metodo di controllo microbiologico usato?

	N.° banche	Unico metodo usato
<b>Sistema automatizzato Bactec (BD)</b>	8	4/8
<b>Sistema automatizzato BacT/ALERT (Biomerieux)</b>	3	1/3
<b>Sistema automatizzato HB&amp;L (Alifax)</b>	5	0/5
<b>Inoculo diretto nei terreni di crescita*</b>	5	1/5
<b>Filtrazione sulle membrane</b>	0	0

\*: TSB, BHI, brodo Tioglicolato; TSA, agar sangue, agar Sabouraud.

# Dettaglio metodi utilizzati

	<b>Bactec</b>	<b>BacT/ALERT</b>	<b>HB&amp;L</b>	<b>Terreni</b>
<b>Bactec</b>	4	0	2	3
<b>BacT/ALERT</b>	0	1	2	0
<b>HB&amp;L</b>	2	2	0	2
<b>Terreni</b>	3	0	2	1

6/13 banche utilizzano un metodo di controllo; 6/13 ne utilizzano due, 1/13 ne utilizza tre.

**Qual è la percentuale dei tessuti eliminati per contaminazione microbiologica nel 2015?**

	N.° banche	%
<b>&lt; 5%</b>	8	61.5
<b>&lt; 5-10%</b>	3	23.1
<b>10 - 20%</b>	2	15.4
<b>&gt;20 %</b>	0	0

**Se si effettua l'identificazione dei microrganismi contaminanti, quali sono i più frequenti?**

	N°. banche
<i>Staphylococcus spp.</i>	7
<i>Candida spp.</i>	7
<i>Enterococcus spp.</i>	5
<i>Pseudomonas spp.</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2
<i>Streptococcus spp</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1

**Nel 2015 sono stati riportati eventi avversi per infezioni oculari correlate al tessuto nel trapianto di cornea?**

	N.° banche	%
<b>SI</b>	3	23%
<b>NO</b>	10	77%

## DETTAGLIO EVENTI AVVERSI

### per infezioni oculari correlati al tessuto nel trapianto di cornea

Microrganismo	Sistema utilizzato	Tipo di controllo
<i>Candida lusitaniae</i>	Bactec	Medium a 31°C (quarantena) + medium deturgenza/trasporto
<i>Bacillus species</i>	Bactec	Medium a 31°C (quarantena) + medium a 31°C (fine coltura) + medium deturgenza/trasporto
<i>Fusarium</i>	Bactec + HB&L	Medium a 31°C (quarantena) + medium a 31°C (fine coltura) + medium deturgenza/trasporto
<i>Bacilli Gram -</i>	Bactec	Medium a 31°C (quarantena) + medium deturgenza/trasporto
<i>Sphyngomonas paucimobilis</i>	Bactec	Medium a 31°C (quarantena) + medium deturgenza/trasporto



**Nel 2015 sono state riportate reazioni avverse per infezioni oculari correlate al tessuto nel trapianto di cornea?**

	N.° banche	%
<b>SI</b>	2	13%
<b>NO</b>	10	77%

## DETTAGLIO REAZIONI AVVERSE

### per infezioni oculari correlate al tessuto nel trapianto di cornea

Microrganismo	Sistema utilizzato	Tipo di controllo
<i>Candida lusitanae</i>	Bactec	Medium a 31°C (quarantena) + deturgescenza/trasporto
<i>Fusarium</i>	Bactec + HB&L	Medium a 31°C (quarantena) + Medium a 31°C (fine coltura) + deturgescenza/trasporto

#### Osservazioni

- ✓ Controllo sul medium a 31°C a fine coltura
- ✓ Aumento efficacia antimicotico: stabilità e interazioni
- ✓ Efficacia della terapia antibiotica topica pre e post operatoria

# Test di sterilità: come validarlo

Utilizzo dei sistemi automatizzati (capitolo 2.6 test di sterilità, Farmacopea):

- migliore sensibilità (volumi minimi e carica microbica contaminante bassa)
- riduzione dei tempi di rilevamento

Tuttavia, per l'uso di questi sistemi è richiesta una validazione specifica per ogni materiale testato.

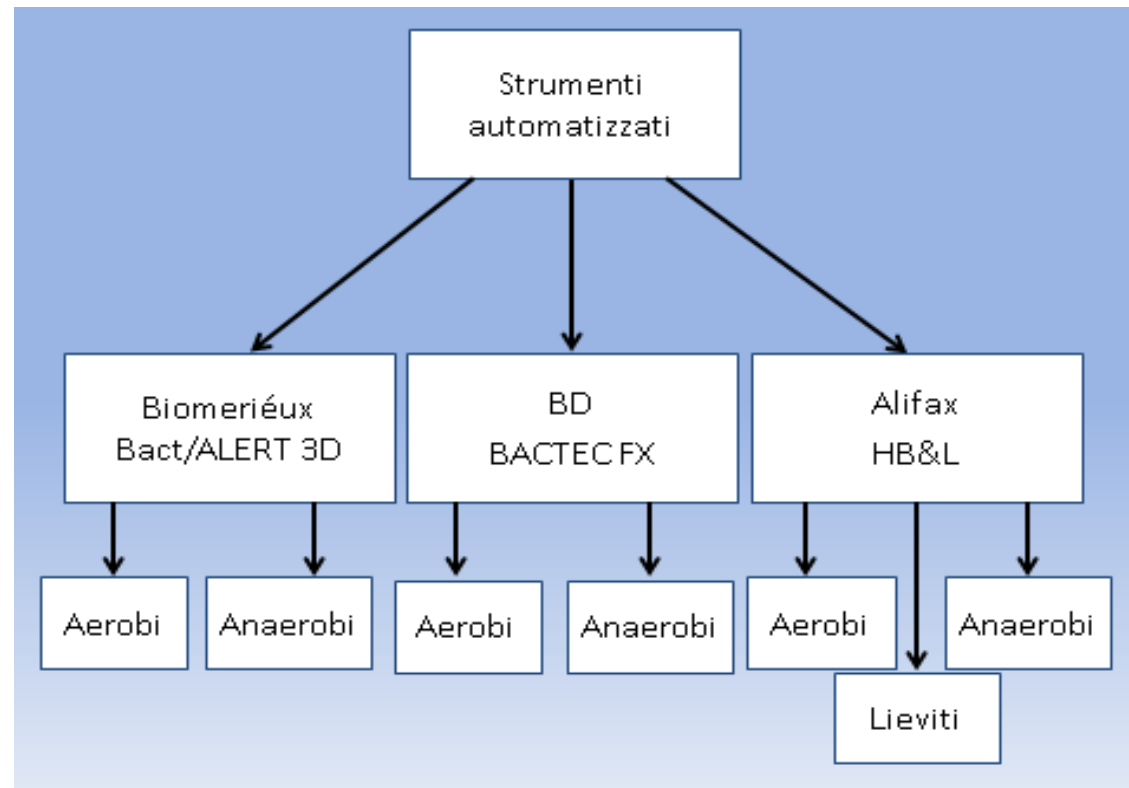
Validazione:

- Interna
- Esterna:
  - apposita certificazione di destinazione d'uso
  - riferimenti bibliografici

**E' stata eseguita una convalida interna alla banca del metodo  
utilizzato per il controllo microbiologico?**

	N.° banche	%
<b>SI</b>	6	46%
<b>NO</b>	7	54%

# Validazione interna dei sistemi automatizzati svolta presso la Banca degli Occhi di Monza: razionale sperimentale



# Validazione interna dei sistemi automatizzati svolta presso la Banca degli Occhi di Monza: risultati

- In duplicato (campioni pretrattati (R) e non pretrattati con resine di assorbimento degli antibiotici) 100 campioni di medium a 31°C, per 120 ore di incubazione in aerobiosi ed anaerobiosi, al trentesimo giorno dall'inizio dell'incubazione del tessuto in medium a 31°C.
- A validazione dei sistemi automatizzati, inoculo diretto su terreni liquidi (Tryptic soy Broth, TSB e Fluid Tioglycollate Medium, FTM) per 14 giorni.

Campione	BD		BIOMERIEUX		ALIFAX			PhEUROPEA		
	AER	ANA	AER	ANA	AER	ANA	LIE	TSB	FTM	Giorno
Seduta N°3										
AND/014	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	14 di 14
AND/014R	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	POS 10/14	N.D.
Seduta N°5										
AND/021	31H 34M	Neg	28H 48M	Neg	26H 05M	Neg	29H 50M	POS 2/14	POS 3/14	N.D.
AND/021R	31H 37M	Neg	28H 33M	Neg	24H 50M	Neg	27H 50M	POS 2/14	POS 3/14	N.D.
Seduta N°11										
AND/051	96H 06M	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	14 di 14
AND/051R	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	14 di 14
Seduta N°12										
AND/055	61H 38M	26H 29M	21H 28M	Neg	11H 00M	7H 30M	9H 10M	1/14	2/14	N.D.
AND/055R	80H 11M	25H 16M	29H 28M	Neg	15H 00M	29H 45M	12H 20M	1/14	2/14	N.D.
Seduta N°15										
AND/068	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	14 di 14
AND/068R	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	8/14	14 di 14

- 2 /100 positività (campioni non trattati con resine di assorbimento per antibiotici)
- 2 identificate in duplicato con i tre metodi
- Tempi più rapidi rispettivamente per Alifax, Biomerieux e BD
- 1 falso positivo strumentale

# Validazione interna dei sistemi automatizzati svolta presso la Banca degli Occhi di Monza: performance (Se, Sp, VPP, VPN)

## Risultati Alifax eBiomerieux

Sensibilità: 100%

Specificità: 100%

Valore predittivo positivo (VPP): 100%

Valore predittivo negativo (VPN): 100%

	M+	M-
T+	2	0
T-	0	98

	M+	M-
T+	2	1
T-	0	97

## Risultati BD

Sensibilità: 100%

Specificità: 99% (IC 95%  $\pm$  0,02)

Valore predittivo positivo (VPP): 66,7%

Valore predittivo negativo (VPN): 100%

## CONFRONTO METODI AUTOMATIZZATI vs METODO FARMACOPEA campioni non pretrattati con resine di assorbimento degli antibiotici

T+: campione test positivo

M+: campione contaminato (malato)

T-: campione test negativo

M-: campione non contaminato (sano)

# Certificazione di destinazioni d'uso

- BacT/ALERT (Biomerieux), BD Bactec (Becton Dickinson) e HB&L (Alifax):

prodotti marcati CE-IVD con relative dichiarazioni di conformità ai requisiti essenziali della Direttiva 98/79/EC sui dispositivi Diagnostici *In Vitro*, per i prodotti che hanno come destinazione d'uso le emocolture.

- BacT/ALERT (Biomerieux):

Prodotti certificati anche per altri fluidi corporali, diversi dal sangue, normalmente sterili;

- HB&L (Alifax):

Prodotti certificati per campioni di urina, liquidi biologici umani sterili (diversi dal sangue) e non sterili, quali: espettorati, aspirati orotracheali, aspirati bronchiali, lavaggi broncoalveolari, liquidi pleurici, liquidi peritoneali, liquidi ascitici, liquidi sinoviali, liquidi cefalorachidiani.

- HB&L (Alifax):

Prodotti certificati CE-IVD per la rilevazione microbica per il recupero e la rilevazione di microrganismi aerobi, anaerobi stretti o facoltativi e miceti eventualmente presenti in prodotti lavorati o preparati con procedure asettiche (ad es. liquido di conservazione delle cornee umane).



# Certificazione di destinazioni d'uso

Controlli di qualità microbiologica secondo Farmacopea:

- Test di sensibilità: limit of detection 6CFU/mL
- Test di fertilità
- Test di sterilità
- Test di specificità
- Test di ripetibilità (riproducibilità)

# Certificazione di destinazioni d'uso

## Risultati HB&L ANAEROBE KIT

- 100 liquidi di conservazione di cornee umane
- 48 h
- Cfr con metodo di riferimento utilizzato presso la BdO sede dello studio (flaconi Bactec FX) per 120 ore in aerobiosi e anaerobiosi
- Cfr con test secondo Farmacopea europea (14 gg)

**Lo studio clinico non ha evidenziato alcun positivo (microrganismi anaerobi) a causa della scarsa incidenza di tali patogeni in questo tipo di campioni .**

Un campione positivo in entrambi i metodi è risultato a *Candida glabrata*, quindi un falso positivo.

Un secondo campione è risultato negativo in entrambi i metodi e positivo secondo le modalità della farmacopea europea, come *Candida parapsilosis*, quindi falso positivo.

I rimanenti 98 campioni sono risultati negativi in tutti e tre i metodi utilizzati.

# Certificazione di destinazioni d'uso

## Risultati HB&L CULTURE KIT e SABOURAUD KIT

- 100 liquidi di conservazione di cornee umane
- 48 h
- Cfr con metodo di riferimento utilizzato presso la BdO sede dello studio (flaconi Bactec FX) per 120 ore in aerobiosi e anaerobiosi
- Cfr con test secondo Farmacopea europea (14 gg)

**I campioni positivi al metodo Bactec e HB&L sono stati rispettivamente 3 e 2. Il campione positivo discordante è stato poi ritenuto un falso positivo poiché nella modalità di Farmacopea europea è risultato negativo.**

**Sui risultanti 99 campioni si sono ottenuti i seguenti risultati**

**(cut off pos/neg= 0 CFU/mL):**

**Sensibilità: 100%**

**Specificità: 100%**

**Valore predittivo positivo (VPP): 100%**

**Valore predittivo negativo (VPN): 100%**

**Efficienza: 100%**

**CONTROLLO DI QUALITÀ**

Le procedure di controllo qualità vengono eseguite con cesi riferimento est. ATCC, NCTC.  
Se vengono utilizzati micro-organismi vitali stabilizzati, si consiglia secondo il seguente protocollo di controllo.  
I microorganismi vitali stabilizzati (compresse di ceppo base) dovranno essere sottoposti a controllo di qualità.

Recuperare il ceppo batterico secondo il protocollo di riferimento. Controllare il ceppo microbico, sempre in condizioni di sterilità, brodo Trophocult o TSB) a cui deve seguire l'incubazione per almeno 48 ore. Si raccomanda l'uso di un indicatore di incubazione.

Una volta che brodi sopraccitati sono diventati torbidi, possibili anaerobici, prelevare, mediante siringa sterile, 50µL di sospensione e inocularli nel fascio dell'HB&L ANAEROBE KIT.  
Quindi attivando la funzione McFarland Monitor, caricare il fascio. Aspettare il raggiungimento del valore di torbidità 0,1 (analisi e rimuovere il fascio dallo strumento).

Dalla sospensione microbica ottenuta (a 0,1-0,2 McFarland) prelevare 50µL e inocularli in un fascio dell'HB&L ANAEROBE KIT.  
Il tempo di analisi sarà di almeno 34 ore. La conta prevista del HB&L ANAEROBE CULTURE KIT dovrà essere maggiore di 50 CFU/ml.

Per futuri usi, sempre mediante siringa sterile, si possono inoculare per la semina una piastra di Petri con terreno adatto (ad es. Streptococchi 5% e 10% per i monitori, Ygglyticose 5% e 10% per i monitori) e incubare per 48 ore in condizioni di incubazione di anaerobiosi nell'ambiente d'incubazione.

Risultato Attesti	Citi
Bacteroides fragilis ATCC 25285	Crescita

**LIMITI DELLA PROCEDURA**

La crescita dei microorganismi dipende dalle condizioni ambientali in alcuni specifici casi (presenza di antimicrobici nel campione tempo di incubazione, etc.) I microorganismi non possono crescere e limitata alla cultura di organismi anaerobici. Alcuni patenti microorganismi anaerobici stretti se esposti per troppo tempo manipolazione del campione possono non crescere.  
Alcune particolari condizioni (ad es. errore immagazzinamento trattamento termico) dei pazienti o presenza di anticorpi (esaminare) possono indurre un'anomala fase di latenza nelle cr queste circostanze i campioni riportati come negativi dallo strumento. Aspettare il raggiungimento del valore di torbidità 0,1 un significativo inizio di crescita durante gli ultimi cicli di lettura ulteriormente investigati.

Se si deve eseguire un antibiogramma si raccomanda di usare terreno adatto in condizioni di anaerobiosi.

**PRESTAZIONI**

**-CONTROLLI DI QUALITÀ MICROBIOLOGICA SECONDO FA**  
Test di fertilità sono stati inoculati in maniera indipendente tra di batteri anaerobici (Bacteroides fragilis ATCC 25285 e Clostridium 11437) compressa tra 10 e 100 CFU/ml; i fasci sono stati poi per 12 ore.

Tutte le diluizioni di entrambi i microorganismi sono cresciute. Test di sterilità: Sono stati allestiti fasci contenenti matrice come controllo negativo dei test. I fasci sono stati incubati per 48 ore e i campioni positivi sono stati incubati per 24 ore prima di essere esaminare) possono indurre un'anomala fase di latenza nelle cr queste circostanze i campioni riportati come negativi dallo strumento. Aspettare il raggiungimento del valore di torbidità 0,1 un significativo inizio di crescita durante gli ultimi cicli di lettura ulteriormente investigati.

Se si deve eseguire un antibiogramma si raccomanda di usare terreno adatto in condizioni di anaerobiosi.

**PRESTAZIONI**

**-CONTROLLI DI QUALITÀ MICROBIOLOGICA SECONDO FA**  
Test di fertilità sono stati inoculati in maniera indipendente tra di batteri anaerobici (Bacteroides fragilis ATCC 25285 e Clostridium 11437) compressa tra 10 e 100 CFU/ml; i fasci sono stati poi per 12 ore.

Tutte le diluizioni di entrambi i microorganismi sono cresciute. Test di sterilità: Sono stati allestiti fasci contenenti matrice come controllo negativo dei test. I fasci sono stati incubati per 48 ore e i campioni positivi sono stati incubati per 24 ore prima di essere esaminare) possono indurre un'anomala fase di latenza nelle cr queste circostanze i campioni riportati come negativi dallo strumento. Aspettare il raggiungimento del valore di torbidità 0,1 un significativo inizio di crescita durante gli ultimi cicli di lettura ulteriormente investigati.

Se si deve eseguire un antibiogramma si raccomanda di usare terreno adatto in condizioni di anaerobiosi.

**PRESTAZIONI**

**-CONTROLLI DI QUALITÀ MICROBIOLOGICA SECONDO FARMACOEPA**  
Test di fertilità sono stati inoculati in maniera indipendente tra di lieviti (Candida albicans ATCC 2091 e Candida glabrata ATCC 5487) compressa tra 10 e 100 CFU/ml; i fasci sono stati poi incubati nello strumento per 12 ore.

Tutte le diluizioni di entrambi i microorganismi sono cresciute. Test di sterilità: Sono stati allestiti fasci contenenti matrice come controllo negativo dei test. I fasci sono stati incubati per 24 ore prima di essere esaminare) possono indurre un'anomala fase di latenza nelle cr queste circostanze i campioni riportati come negativi dallo strumento. Aspettare il raggiungimento del valore di torbidità 0,1 un significativo inizio di crescita durante gli ultimi cicli di lettura ulteriormente investigati.

Se si deve eseguire un antibiogramma si raccomanda di usare terreno adatto.

**LIMITI DELLA PROCEDURA**

La crescita dei microorganismi dipende dalle condizioni ambientali, è quindi possibile in alcuni specifici casi (presenza di antimicrobici nel campione, vitalità, temperatura di incubazione, etc.) I microorganismi non possono crescere. L'applicazione del kit è limitata alla cultura di organismi aerobi, microaerofili o capnofili. Alcuni particolari organismi quali i funghi filamentosi (ad esempio Aspergillus spp.) che si caratterizzano da una bassa velocità di crescita possono non crescere e comunque richiedono una specifica cultura.

Alcuni livelli di torbidità del campione sono separati dal sistema, che indica la necessità di diluire il campione prima della processazione.  
Centi batteri possono crescere a causa della loro resistenza all'antibiotico presente i fascio del test. Sono disponibili i kit: eseguire una contazione di 1 gram su 10 campione (risultato positivo al fine di confermare la presenza di miceti) e/o escludere l'attività di un campione.

Alcune particolari condizioni (ad es. errore immagazzinamento del campione, gas trattamento termico) dei pazienti o presenza di anticorpi nel campione (esaminare) possono indurre un'anomala fase di latenza nelle crescite degli organismi: queste circostanze i campioni riportati come negativi dallo strumento ma che mostra un significativo inizio di crescita durante gli ultimi cicli di lettura dovrebbero essere ulteriormente investigati.

Se si deve eseguire un antibiogramma si raccomanda di usare una subcoltura su di terreno adatto.

**PRESTAZIONI**

**-CONTROLLI DI QUALITÀ MICROBIOLOGICA SECONDO FARMACOEPA**  
Test di fertilità sono stati inoculati in maniera indipendente tra i fasci con una quantità di lieviti (Candida albicans ATCC 2091 e Candida glabrata ATCC 5487) compressa tra 10 e 100 CFU/ml; i fasci sono stati poi incubati nello strumento per 12 ore.

Tutte le diluizioni di entrambi i microorganismi sono cresciute. Test di sterilità: Sono stati allestiti fasci contenenti matrice senza microorganismi come controllo negativo dei test. I fasci sono stati incubati per 24 ore prima di essere esaminare) possono indurre un'anomala fase di latenza nelle crescite degli organismi: queste circostanze i campioni riportati come negativi dallo strumento ma che mostra un significativo inizio di crescita durante gli ultimi cicli di lettura dovrebbero essere ulteriormente investigati.

Se si deve eseguire un antibiogramma si raccomanda di usare una subcoltura su di terreno adatto.

**PRESTAZIONI**

**-CONTROLLI DI QUALITÀ MICROBIOLOGICA SECONDO FARMACOEPA**  
Test di fertilità sono stati inoculati in maniera indipendente tra i fasci con una quantità di lieviti (Candida albicans ATCC 2091 e Candida glabrata ATCC 5487) compressa tra 10 e 100 CFU/ml; i fasci sono stati poi incubati nello strumento per 12 ore.

Tutte le diluizioni di entrambi i microorganismi sono cresciute. Test di sterilità: Sono stati allestiti fasci contenenti matrice senza microorganismi come controllo negativo dei test. I fasci sono stati incubati per 24 ore prima di essere esaminare) possono indurre un'anomala fase di latenza nelle crescite degli organismi: queste circostanze i campioni riportati come negativi dallo strumento ma che mostra un significativo inizio di crescita durante gli ultimi cicli di lettura dovrebbero essere ulteriormente investigati.

Se si deve eseguire un antibiogramma si raccomanda di usare una subcoltura su di terreno adatto.

**PRESTAZIONI**

**-CONTROLLI DI QUALITÀ MICROBIOLOGICA SECONDO FARMACOEPA**  
Test di fertilità sono stati inoculati in maniera indipendente tra i fasci con una quantità di lieviti (Candida albicans ATCC 2091 e Candida glabrata ATCC 5487) compressa tra 10 e 100 CFU/ml; i fasci sono stati poi incubati nello strumento per 12 ore.

Tutte le diluizioni di entrambi i microorganismi sono cresciute. Test di sterilità: Sono stati allestiti fasci contenenti matrice come controllo negativo dei test. I fasci sono stati incubati per 24 ore prima di essere esaminare) possono indurre un'anomala fase di latenza nelle crescite degli organismi: queste circostanze i campioni riportati come negativi dallo strumento ma che mostra un significativo inizio di crescita durante gli ultimi cicli di lettura dovrebbero essere ulteriormente investigati.

Se si deve eseguire un antibiogramma si raccomanda di usare una subcoltura su di terreno adatto.

**PRESTAZIONI**

**-CONTROLLI DI QUALITÀ MICROBIOLOGICA SECONDO FARMACOEPA**  
Test di fertilità sono stati inoculati in maniera indipendente tra i fasci con una quantità di lieviti (Candida albicans ATCC 2091 e Candida glabrata ATCC 5487) compressa tra 10 e 100 CFU/ml; i fasci sono stati poi incubati nello strumento per 12 ore.

Tutte le diluizioni di entrambi i microorganismi sono cresciute. Test di sterilità: Sono stati allestiti fasci contenenti matrice come controllo negativo dei test. I fasci sono stati incubati per 24 ore prima di essere esaminare) possono indurre un'anomala fase di latenza nelle crescite degli organismi: queste circostanze i campioni riportati come negativi dallo strumento ma che mostra un significativo inizio di crescita durante gli ultimi cicli di lettura dovrebbero essere ulteriormente investigati.

Se si deve eseguire un antibiogramma si raccomanda di usare una subcoltura su di terreno adatto.

**PRESTAZIONI**

**-CONTROLLI DI QUALITÀ MICROBIOLOGICA SECONDO FARMACOEPA**  
Test di fertilità sono stati inoculati in maniera indipendente tra i fasci con una quantità di lieviti (Candida albicans ATCC 2091 e Candida glabrata ATCC 5487) compressa tra 10 e 100 CFU/ml; i fasci sono stati poi incubati nello strumento per 12 ore.

Tutte le diluizioni di entrambi i microorganismi sono cresciute. Test di sterilità: Sono stati allestiti fasci contenenti matrice come controllo negativo dei test. I fasci sono stati incubati per 24 ore prima di essere esaminare) possono indurre un'anomala fase di latenza nelle crescite degli organismi: queste circostanze i campioni riportati come negativi dallo strumento ma che mostra un significativo inizio di crescita durante gli ultimi cicli di lettura dovrebbero essere ulteriormente investigati.

Se si deve eseguire un antibiogramma si raccomanda di usare una subcoltura su di terreno adatto.

**COLTURA DI LIQUIDI BIOLOGICI:**

Sono stati analizzati 885 liquidi biologici umani per il confronto rispetto al metodo di riferimento (colture su piastrine di Petri) con 48 ore di incubazione in aerobiosi ed anaerobiosi.  
Lavaggio Broncovoelenti: (BAL) 411;  
Aspirati Bronchiali (BA): 70;  
Liquidi (effusioni) pleurici (PE): 63;  
Liquidi Sinoviali (SF): 14;  
Liquidi Peritoneali (PF): 102;  
Liquido Cefalorachidiano (CSF): 25.

**Terreni utilizzati:**

- MacConkey Agar
- Sabouraud Agar
- Agar Sangue
- Agar Coccidato

Si sono ottenuti i seguenti risultati a 6 ore e con un out off positivo/negativi pari a 0 CFU/ml:  
Sensibilità 86,64%  
Specificità 88,25%

Valore predittivo negativo (VPN) 97,81%  
Valore predittivo positivo (VPP) 84,00%  
Efficienza 91,53 %

**COLTURA DI PUNTE DI CATETERE:**

Sono stati analizzati 144 campioni clinici (punte di cateteri venosi centrali a lunga permanenza selezionati secondo linee guida) rispetto al metodo di riferimento (tecnica di cultura in piastra semi-quantitativa secondo metodo di Maki modificato Bowa, con incubazione overnight e successiva incubazione di 5 giorni per i campioni negativi). Sono stati considerati rispettivamente i seguenti cut-off:  
Metodo di Maki: >15 CFU/ml;  
Metodo HB&L Culture kit con settaggio a 6 ore di incubazione: tutti i campioni positivi referati dallo strumento che alla successiva subcoltura (su terreni analoghi ai test di Maki) siano superiori a 15 CFU/ml.

Sensibilità 94%  
Specificità 91,2%  
VPN 99 %  
VPP 62%  
Efficienza 91,67%

**NOTA:**

Il valore di sensibilità è riportato senza esclusione delle contaminazioni. In dettaglio, su 6 campioni falsi negativi totali 5 sono stati classificati contaminanti. Il valore di specificità è anch'esso riportato senza ulteriore modifica dovuta all'interpretazione clinica finale (su 11 falsi positivi totali 5 campioni sono stati valutati clinicamente significativi).

**COLTURA DI LIQUIDI DI CONSERVAZIONE DELLE CORNEE UMANE:**

Sono stati analizzati 100 liquidi di conservazione delle cornee umane per il confronto rispetto al metodo di riferimento utilizzato alla Banca degli Occhi sede dello studio (inoculo di flaconi BacTec FX) con 120 ore di incubazione in aerobiosi ed anaerobiosi. Come test ulteriore i medesimi campioni sono stati testati contemporaneamente anche secondo le modalità della Farmacopea europea (incubazione 14 giorni). I campioni positivi al metodo HB&L CULTURE KIT sono stati rispettivamente 3 e 2. Il campione positivo discordante è stato poi ritenuto un falso positivo dato che nella modalità di Farmacopea europea è risultato negativo. Sui risultati 99 campioni si sono ottenuti i seguenti risultati a 48 ore e con un out-off positivo/negativi pari a 0 CFU/ml:  
Sensibilità 100%  
Specificità 100%  
Valore predittivo negativo (VPN) 100%  
Valore predittivo positivo (VPP) 100%  
Efficienza 100%

**SMALTIMENTO DEI RIPIUTI**

Smaltire i reattivi utilizzati o non utilizzati ed i materiali monouso contaminati seguendo le procedure relative ai prodotti inativi o potenzialmente inattivi. È responsabilità di ogni laboratorio gestire i rifiuti e gli eventuali prodotti a seconda della loro natura e della loro pericolosità ed assicurarsi (o farne assicurare) il trattamento e lo smaltimento conformemente alla legislazione vigente.

**BIBLIOGRAFIA**

- (ICAT). Centro Nazionale Trapianti. Linee Guida per il prelievo, la processazione e la distribuzione di tessuti d'organo. Luglio 2013.
- European Directorate for the Quality of Medicines & Health-Care (EDQM) European Pharmacopoeia, 7th edn, vol 1
- Thuret G, Garrigou A, Chiquet C, Vautrin A-C, Caille N, Bourdelle M, Acquart S, Aubert G, Maugery J and Gain P. Sensitivity and specificity of blood culture bottles in the detection of coagulase negative gram culture media contamination by bacteria and fungi. Br. J. Ophthalmol., 2002.

# Riferimenti bibliografici

- ✓ Sensibilità e rapidità dei flaconi da emocoltura di Bactec nel rilevamento delle contaminazioni dei liquidi di conservazione delle cornee da batteri e funghi in confronto con i terreni convenzionali per la crescita microbica.
- ✓ Efficienza di diversi flaconi da emocoltura di Bactec nei test di sterilità specifici per funghi sui terreni per l'organocoltura delle cornee, non rilevando nessuna differenza statisticamente significativa in velocità ed in sensibilità di rilevamento fra i flaconi Bactec Aerobic/F, Bactec Mycosis IC/F e Bactec Myco/F Lytic di Becton Dickinson. Questo lavoro eradica il preconcetto che la contaminazione funginea sia difficile da diagnosticare e valida l'uso, per Bactec, di solo due flaconi (per aerobi ed anaerobi) per i test di sterilità dei terreni di coltura delle cornee.

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

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

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

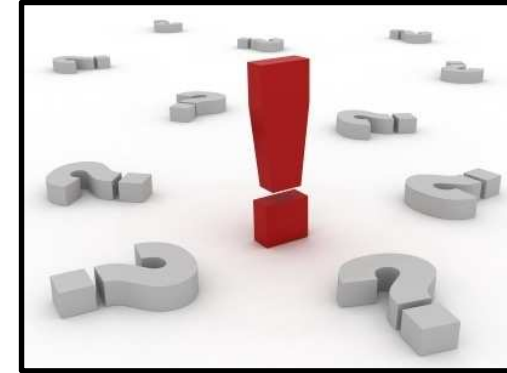
# Riferimenti bibliografici

- ✓ Comparazione il sistema HB&L di Alifax con quello di Bactec, per la rilevazione di microrganismi contaminanti i liquidi di conservazione delle cornee a 31°C.
- ✓ I controlli sono stati effettuati dopo 6 giorni di coltura a 31°C, alla fine della coltura a 31°C e dopo 24 ore di conservazione nel medium di trasporto.
- ✓ I risultati (su 10655 campioni analizzati) indicano 147 campioni riscontrati positivi con almeno uno dei due metodi, 127 campioni riscontrati positivi con entrambi i metodi; 14 campioni positivi con HB&L e negativi con Bactec; 6 positivi con Bactec e negativi con HB&L.
- ✓ La sensibilità (95.5%), la specificità (99.8%), il valore predittivo positivo (99.9%) e negativo (90.1%) sono per il sistema HB&L di Alifax molto alti.
- ✓ HB&L è un sistema rapido per il rilevamento delle contaminazioni microbiche nei liquidi di conservazione delle cornee, in aggiunta ai metodi già esistenti.

D. Camposampiero, S. Grandesso, E. Zanetti, S. Mazzucato, M. Solinas, M. Parekh, A. C. Frigo, M. Gion, D. Ponzin. Evaluation of the HB&L System for the Microbiological Screening of Storage Medium for Organ-Cultured Corneas. Journal of Ophthalmology (2013)



## TEST DI STERILITA'



- ✓ Come effettuarlo: cfr. Farmacopea, inoculazione diretta nel terreno di coltura con metodi classici o automatizzati
- ✓ Con che volumi: tra 2.5 e 20 mL, non più del 10%V/V per i metodi classici; volumi standardizzati dalle aziende per i metodi automatici
- ✓ Su quali liquidi: medium a 31°C e medium di deturgenza e trasporto
- ✓ A che tempo di incubazione: medium a 31°C a 6 giorni dall'inizio dell'incubazione e a fine quarantena; medium di deturgenza e trasporto a 24 ore dall'inizio dell'incubazione
- ✓ Come validarlo: validazione interna, apposita certificazione di destinazione d'uso, riferimenti bibliografici.

# Ringraziamenti

- Al Presidente, Dr. Davide Camposampiero, e al Comitato Scientifico della Società Italiana Banche degli Occhi.
- Alla Dott.ssa Raffaella Mistò, Responsabile della Banca degli occhi di Monza.
- A tutte le banche degli occhi che hanno risposto al questionario.

**Grazie per l'attenzione!**