

# Considerazioni su due diversi metodi di analisi: HB&L e BacT/Alert 3D



Padova 25 novembre 2016

Dott. Luporini Marco

Centro Conservazione Cornee  
P.Perelli

Per la Banca delle Cornee "Piero Perelli" di Lucca è fondamentale :

- cercare di garantire l'autosufficienza regionale;



**1° Paziente trapiantata nel 1978.**

La paziente è stata rintracciata e contattata nel 2009 in occasione del decennale della istituzione della banca delle cornee e presentava l'occhio trapiantato perfettamente funzionante a distanza di oltre 33 anni dal trapianto.

Per la Banca delle Cornee "Piero Perelli" di Lucca è fondamentale :

- cercare di garantire l'autosufficienza regionale;
- cercare di soddisfare le varie richieste dei nostri chirurghi, restando al passo con il progredire della tecniche e della strumentazione;



**1° Paziente trapiantata nel 1978.**

La paziente è stata rintracciata e contattata nel 2009 in occasione del decennale della istituzione della banca delle cornee e presentava l'occhio trapiantato perfettamente funzionante a distanza di oltre 33 anni dal trapianto.

Per la Banca delle Cornee "Piero Perelli" di Lucca è fondamentale :

- cercare di garantire l'autosufficienza regionale;
- cercare di soddisfare le varie richieste dei nostri chirurghi, restando al passo con il progredire della tecniche e della strumentazione;
- garantire la miglior qualità possibile;



**1° Paziente trapiantata nel 1978.**

La paziente è stata rintracciata e contattata nel 2009 in occasione del decennale della istituzione della banca delle cornee e presentava l'occhio trapiantato perfettamente funzionante a distanza di oltre 33 anni dal trapianto.

Per la Banca delle Cornee "Piero Perelli" di Lucca è fondamentale :

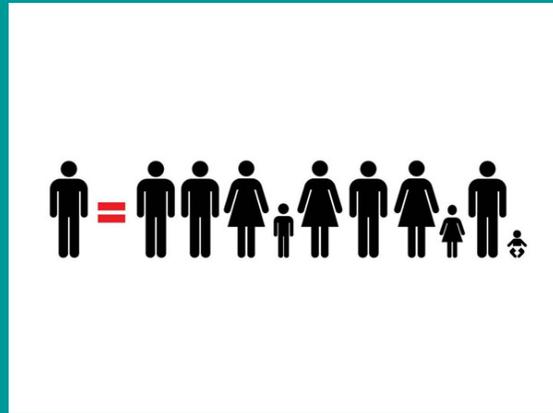
- cercare di garantire l'autosufficienza regionale;
- cercare di soddisfare le varie richieste dei nostri chirurghi, restando al passo con il progredire della tecniche e della strumentazione;
- garantire la miglior qualità possibile;
- **garantire la sicurezza dei tessuti;**



**1° Paziente trapiantata nel 1978.**

La paziente è stata rintracciata e contattata nel 2009 in occasione del decennale della istituzione della banca delle cornee e presentava l'occhio trapiantato perfettamente funzionante a distanza di oltre 33 anni dal trapianto.

**Nel 2015 sono state prelevate circa 1200 cornee.  
Sono state messe in coltura circa 900 cornee;  
trapiantate 490 cornee.**



# Il flusso operativo per i tessuti corneali



# SCOPO

Confrontare due diversi strumenti automatizzati (BacT/Alert 3D di BioMérieux e il sistema HB&L di Alifax) al fine di metterne in risalto le varie caratteristiche e peculiarità e verificare al meglio quale sia la reale sensibilità e specificità del metodo utilizzato per le analisi microbiologiche sui terreni impiegati per la coltura e il trasporto dei tessuti idonei al trapianto.

Il lavoro è stato suddiviso in **due fasi**:

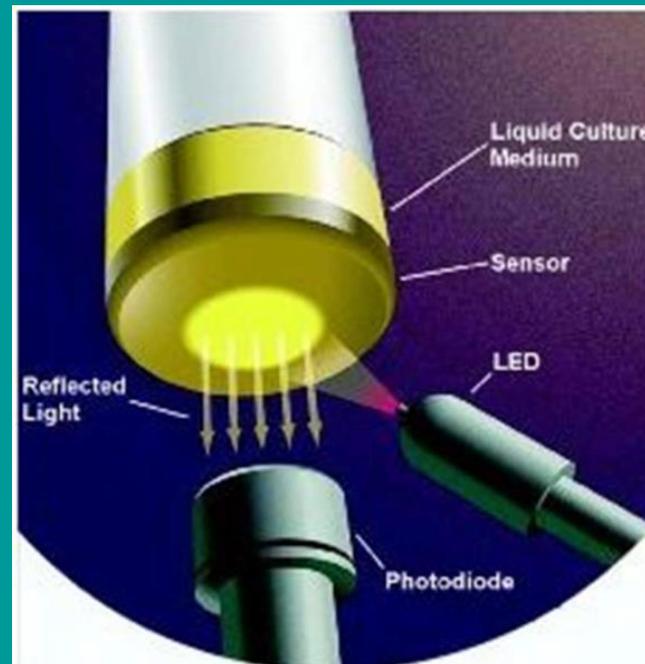
1. Determinazione per i due strumenti del **limit of detection (LOD** – n° più basso delle unità formanti colonie (CFU) per campione che possono essere rilevate dallo strumento).
2. **Confronto dei due strumenti** con diluizioni seriali di microrganismi, inoculate al **tempo zero**, al **tempo + 24 ore** per simulare il controllo microbiologico svolto sul terreno di trasporto e al **tempo + 5 giorni** per simulare il controllo microbiologico svolto sul terreno di coltura.

# BacT/Alert 3D (BioMérieux)

Tecnologia brevettata del sensore colorimetrico

Basato sulla variazione di colore un sensore posto sul fondo del flacone a causa dell'accumulo di  $\text{CO}_2$ .

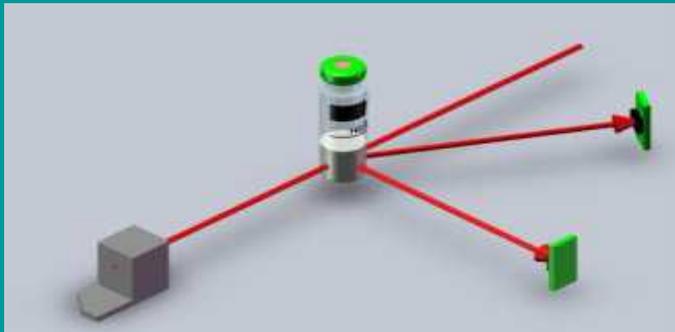
**N.B:** Volume di campione minimo richiesto di 3 ml a flacone.



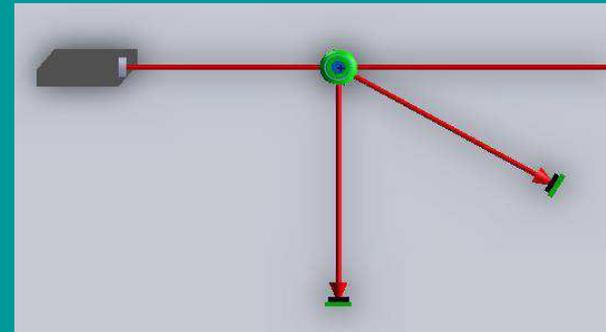
# HB&L - Uroquattro (Alifax)

Tecnologia MULTIANGLE LASER LIGHT SCATTERING (MALS)

Basata sulla misura diretta della torbidità all'interno dei vials



**N.B:** Volume di campione richiesto di 0,5 ml a vials.



**30 °** Detector Rileva tutte le particelle "Sensibilità"  
**90 °** Detector Selettivo per forma e dimensione delle particelle "Specificità"



# HB&L - Uroquattro (Alifax)

Il segnale nefelometrico aumenta progressivamente con l'aumento della torbidità: **MISURAZIONE DIRETTA**

SE IL NUMERO DI PARTICELLE  IL SEGNALE 

INDICATA PER LE PARTICELLE DI DIMENSIONI DELL'ORDINE DI GRANDEZZA DEL  $\mu\text{m}$  IN QUANTO LA DIFFUSIONE PREVALE SULL'ASSORBIMENTO

LE DIMENSIONI DELLA CELLULA PROCARIOTE ( **$\sim 1-10 \mu\text{m}$** ) SONO IDEALI PER LA NEFELOMETRIA



LA NEFELOMETRIA RIESCE A MONITORARE LA CINETICA DI CRESCITA BATTERICA



# PRIMA FASE - Limit of Detection (LOD)

- Sono stati utilizzati i tre microrganismi più rappresentativi delle positività riscontrate nei tessuti corneali nel 2015 dalle varie banche degli occhi :
  - un gram negativo (**Pseudomonas aeruginosa**);
  - un micete (**Candida tropicalis**);
  - un gram positivo (**Staphylococcus aureus**).
- Sono state allestite 6 diluizioni seriali ( $10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^0$  UFC/ml) per ogni microrganismo, usando un terreno di coltura da noi prodotto (**IMDM + FBS**) senza però l'aggiunta di antibiotici.
- Per ogni diluizione sono stati inoculati :
  - **0,5 ml** in ogni vials (**Aerobi, Anaerobi, Miceti**) dell' **HB&L -Uroquattro**
  - **4 ml** nel flacone per **Anaerobi** e **3 ml** in quello per **Aerobi** del **BacT/Alert 3D**

# RISULTATI: Limit of Detection (LOD)

- Di seguito i risultati ottenuti:

UFC/mL	<b>Pseudomonas aeruginosa</b>		
	Ore positività		Differenza Oraria HB&L VS BacT/Alert
	HB&L	BacT/Alert	
$10^7$	2:20	7:11	- 4:51
$10^6$	3:25	8:51	- 5:26
$10^4$	5:50	11:31	- 5:41
$10^3$	6:50	12:31	- 5:41
$10^2$	8:05	13:11	- 5:06
$10^0$	7:25	14:11	- 6:46

# RISULTATI: Limit of Detection (LOD)

UFC/mL	<b>Candida tropicalis</b>		
	Ore positività		Differenza Oraria HB&L VS BacT/Alert
	HB&L	BacT/Alert	
$10^7$	3:30	9:03	- 5:33
$10^6$	5:10	11:12	- 6:02
$10^4$	10:00	14:52	- 4:52
$10^3$	8:50	15:21	- 6:31
$10^2$	10:35	16:31	- 5:56
$10^0$	12:20	15:41	- 3:21

# RISULTATI: Limit of Detection (LOD)

UFC/mL	<b>Staphylococcus aureus</b>		
	Ore positività		Differenza Oraria HB&L VS BacT/Alert
	HB&L	BacT/Alert	
$10^7$	1:50	6:13	- 4:23
$10^6$	2:45	7:33	- 4:48
$10^4$	4:15	10:33	- 6:18
$10^3$	4:45	11:43	- 6:58
$10^2$	5:15	11:43	- 6:28
$10^0$	5:40	12:33	- 6:53

# Discussione

- Tutti e due gli strumenti si sono dimostrati capaci di rilevare in tempi più che accettabili (massimo 15:41 h) concentrazioni di microrganismi molto esigue, circa 1 UFC/ml.

- **H&BL Uroquattro** è in grado di **rilevare i microrganismi in un tempo che è circa la metà** di quello impiegato dal sistema **BacT/ALERT 3D**.

\* Per esempio per lo **Staphylococcus aureus** alla concentrazione di **1 ufc/ml** è stata rilevata in **5 ore e 40 minuti** , rispetto alle **12 ore e 33 minuti** .

## SECONDA FASE - Confronto fra i due strumenti

- Sono stati utilizzati sempre i tre microrganismi più rappresentativi delle positività riscontrate nei tessuti corneali nel 2015 dalle varie banche degli occhi.
- Sono state allestite 4 diluizioni seriali ( $10^7, 10^4, 10^2, 10^1$  UFC/ml) per ogni microrganismo, usando il terreno di coltura normalmente utilizzato (TISSUE-C, Al.chi.mi.a. S.r.l) contenente una miscela di antibiotici e antimicotici (Penicillina G, Streptomina e Amfotericina B)
- Per ogni diluizione sono stati eseguiti i vari inoculi al tempo 0h, + 24 h e + 5 gg, così da simulare il controllo microbiologico svolto sul terreno di trasporto e sul terreno di coltura.
  - Le varie diluizioni sono state incubate a  $+31^\circ$  C.

# RISULTATI: Confronto fra i due strumenti

- Di seguito i risultati ottenuti:

<b>Pseudomonas aeruginosa</b>						
Ore positività	HB&L	BacT/Alert	HB&L	BacT/Alert	HB&L	BacT/Alert
UFC/mL	T 0 gg		+ 24 h		+ 5 gg	
$10^7$	2:40	8:00	2:00	8:00	2:00	5:12
$10^4$	7:55	13:00	7:00	9:00	2:10	6:00
$10^2$	11:15	16:00	12:00	16:00	10:30	15:00
$10^1$	13:00	18:00	13:00	18:00	11:15	18:00

# RISULTATI: Confronto fra i due strumenti

<b>Candida tropicalis</b>						
Ore positività	HB&L	BacT/Alert	HB&L	BacT/Alert	HB&L	BacT/Alert
UFC/mL	T 0 gg		+ 24 h		+ 5 gg	
$10^7$	5:05	9:5	5:00	8:31	2:15	7:23
$10^4$	13.2	16:2	13:00	16:3	10	15:03
$10^2$	N	19:00	14:3	19:00	12	19:00
$10^1$	N	N	N	N	N	N



# Kinetics of amphotericin B decay in a liquid medium and characterization of the decay process

Authors

[Authors and affiliations](#)

William H. Beggs

## Abstract

A turbidimetric microbiological assay procedure was used to study the kinetics of amphotericin B decay in a pH 7 liquid medium incubated at 37°C with aeration (shaking at 150 rpm). Disappearance of biologically active drug showed characteristics of a first-order reaction with a half-life of 4–5 h under these conditions. Decay was not as rapid at either 27°C or when the system was not aerated. Inactivation was slowed even further when both of these environmental conditions were used. The antioxidant *n*-propyl gallate preserved bioactivity of the drug during either 37°C-aerated or 27°C-nonaerated incubation. It is suggested that amphotericin B decay is primarily an autoxidative process in this system.

# RISULTATI: Confronto fra i due strumenti

<b>Staphylococcus aureus</b>						
Ore positività	HB&L	BacT/Alert	HB&L	BacT/Alert	HB&L	BacT/Alert
UFC/mL	T 0 gg		+ 24 h		+ 5 gg	
$10^7$	N	6:57	N	15:00	N	17:52
$10^4$	N	12:07	N	20:10	N	24:52
$10^2$	N	19:07	N	25:30	N	37:32
$10^1$	N	19:37	N	26:10	N	N

# Discussione

- Il sistema **BacT/Alert 3D** ha rilevato la positività di *Staphylococcus aureus* (sensibile agli antibiotici) al contrario di HB&L. Questo è spiegato dalla presenza delle resine adsorbenti antibiotici nei flaconi del BacT/Alert 3D.
- Quindi, quella che si potrebbe ritenere una falsa negatività di HB&L in realtà nella pratica del trapianto di cornea riveste un ruolo superfluo.
- Gli **eventuali microrganismi ancora presenti** per i quali **l'antibiotico ha effetto batteriostatico** verrebbero eliminati dal **potere battericida delle lacrime e dalla massiccia terapia antibiotica messa in atto post intervento.**
- **Questo è dimostrato anche dai dati in letteratura** che evidenziano una **incidenza di infezioni post trapianto che vanno dallo 0,04 allo 0,5% .**

# Discussione

Un dato fondamentale emerso di grande interesse è che **entrambi i sistemi sono capaci di rilevare i microrganismi resistenti.**

Infine dal confronto è emerso che **l'HB&L Uroquattro** si dimostra **uno strumento più innovativo e all'avanguardia:**

- per la **minor quantità di materiale** di cui ha bisogno per eseguire l'analisi;
- per il **miglior sistema di rilevamento** basato sulla tecnologia light scattering;
- per il fatto che è capace di fornire **risultati** attendibili **in un tempo** notevolmente **minore** rispetto al BacT/Alert 3D.

# Discussione

Per questo **nel Centro Conservazione Cornee** lo strumento **HB&L Uroquattro** è utilizzato per l'esecuzione del test di crescita microbica sui liquidi di trasporto e **per maggior sicurezza è stato anche interfacciato con il programma utilizzato per la gestione delle richieste** e le associazioni dei tessuti, in modo che **nel caso in cui ci sia un risultato positivo** il dato venga immediatamente inviato al gestionale per **bloccare l'uscita del tessuto** e mettere in atto le opportune misure.



**GRAZIE PER L'ATTENZIONE !**