



# **Colorazione di Gram e sicurezza microbiologica delle cornee per trapianto**

**Davide Camposampiero**

Fondazione Banca degli Occhi del Veneto

XIV Congresso SIBO

Società Italiana Banche degli Occhi

Torino, 28 maggio 2022

# La gestione del rischio microbiologico associato alla conservazione dei tessuti oculari

**CONSERVAZIONE 2-6°C**

**Contaminazione: 11-39%**

- Selezione del donatore
- Mantenimento della salma
- Disinfezione pre-prelievo
- Antibiotici nei liquidi di conservazione
- Trasporto e conservazione a temperatura controllata

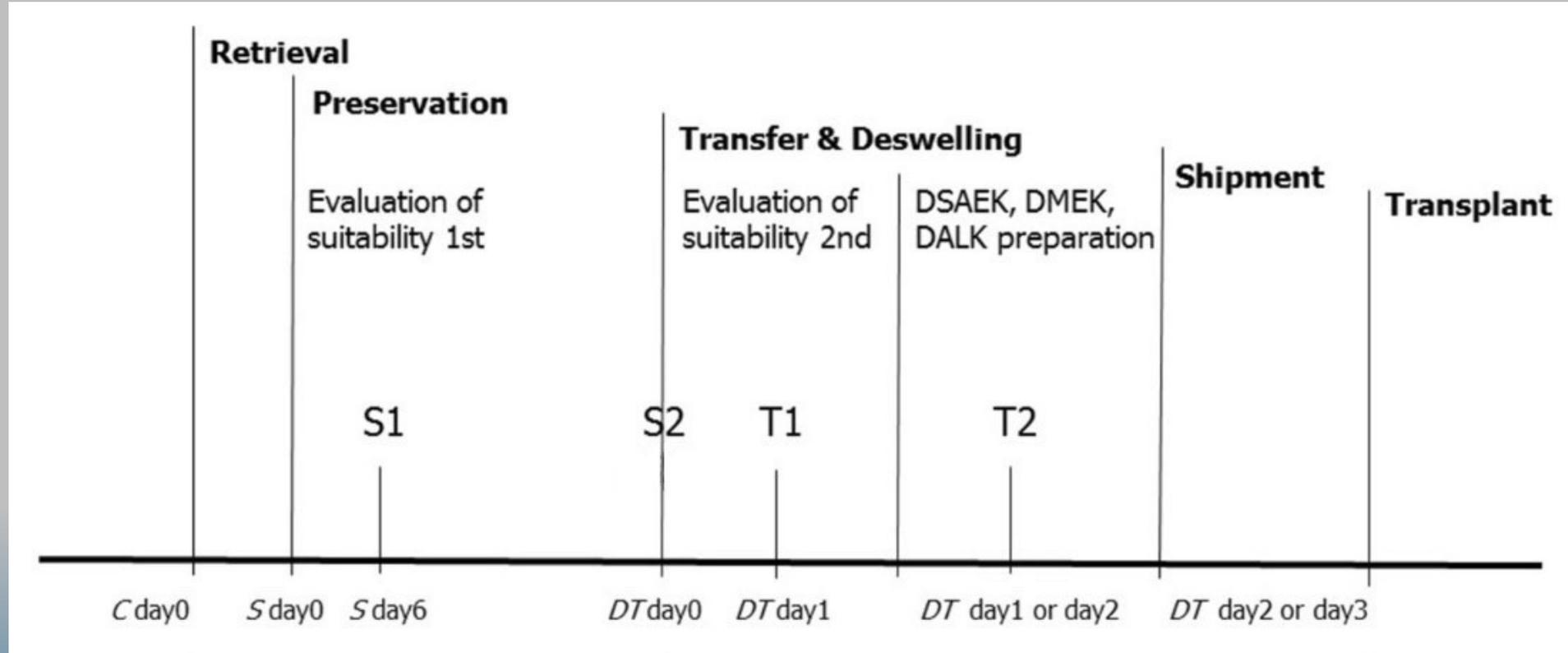
**CONSERVAZIONE 31-37°C**

**Contaminazione: 5-7%**

- Antibiotici nei liquidi di conservazione
- Controlli microbiologici obbligatori

I microrganismi più frequentemente isolati appartengono ai generi *Staphylococcus* (20%) e *Candida* (75%).

# Schema dei controlli microbiologici su cornee conservate a 31-37°C



Gram stain and addition of amphotericin B to improve the microbial safety of human donor corneas.  
D. Camposampiero, A. Fasolo et al. *Cell Tissue Bank* 2021 Nov 17.

# Il nuovo contesto

- Contrazione dei tempi di spedizione e di trapianto dei tessuti pre-tagliati (DSAEK/ALK) e pre-strippati (DMEK)
- Gli ultimi controlli microbiologici sono in corso al momento del trapianto
- Incremento delle contaminazioni in banca da *Candida spp.* (lenta crescita!) e aumento delle infezioni fungine post-trapianto (Aldave et al. Cornea, 2013)

# Serie storica delle contaminazioni S2 e delle reazioni avverse in FBOV

Anno	Cornee idonee per trapianto	Cornee S2 POS (%)	Cornee S2 POS spedite	Cornee S2 POS trapiantate	Reazioni avverse
2015	2674	35 (1.3)	15	1	1
2016	2862	24 (0.8)	5	0	0
2017	3125	43 (1.4)	7	5	1
2018	3022	41 (1.4)	11	2	0
2019	3154	42 (1.3)	11	1	1

# Progetto GRAM

Colorazione di Gram eseguita sul  
sedimento del terreno al termine della  
conservazione

Cell Tissue Bank  
<https://doi.org/10.1007/s10561-021-09981-1>

**Gram stain and addition of amphotericin B to improve  
the microbial safety of human donor corneas**

**Davide Camposampiero · Adriano Fasolo · Giuseppe Saccon · Pietro M. Donisi ·  
Elisa Zanetti · Diego Ponzin**



# Protocollo operativo

- Centrifuga a 4500 rpm per 5 min di 50 mL di terreno di conservazione **a fine coltura**
- Prelievo del pellet e deposizione su vetrino con **citocentrifuga**
- Colorazione automatica secondo il metodo **Gram**
- Osservazione al m.o. con obiettivo ad immersione (**1000x**)



# La sensibilità del metodo

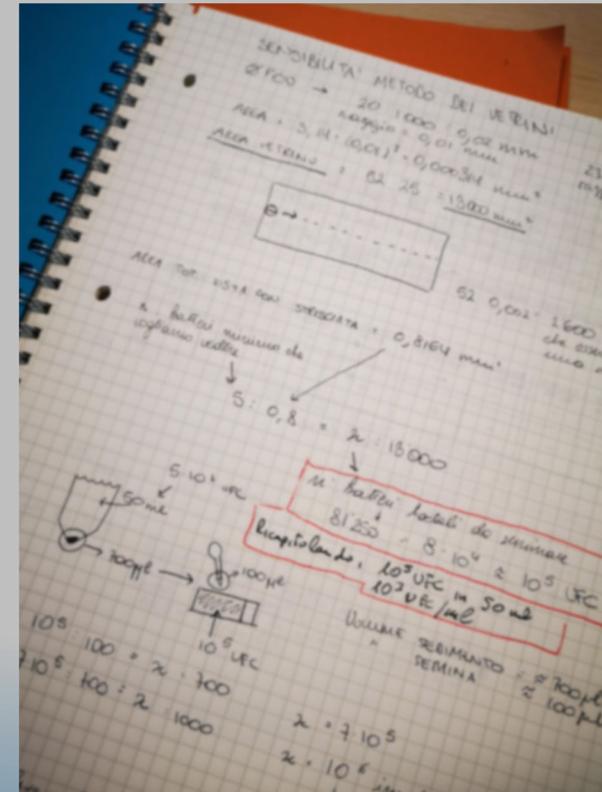
La minima carica batterica rilevabile mediante valutazione microscopica dopo colorazione di Gram è di  $10^{2-3}$  UFC/mL.

Il *time to detection* per una carica batterica di  $10^2$  UFC/mL è di:

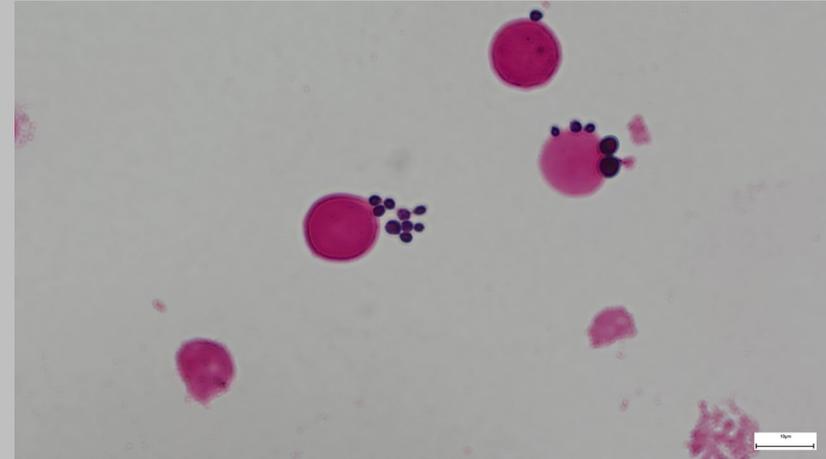
- ~5 ore per HB&L \*
- 10-15 ore per Bactec BD \*\*

\* : Manuale operativo HB&L Alifax rev. 2.7 2021.

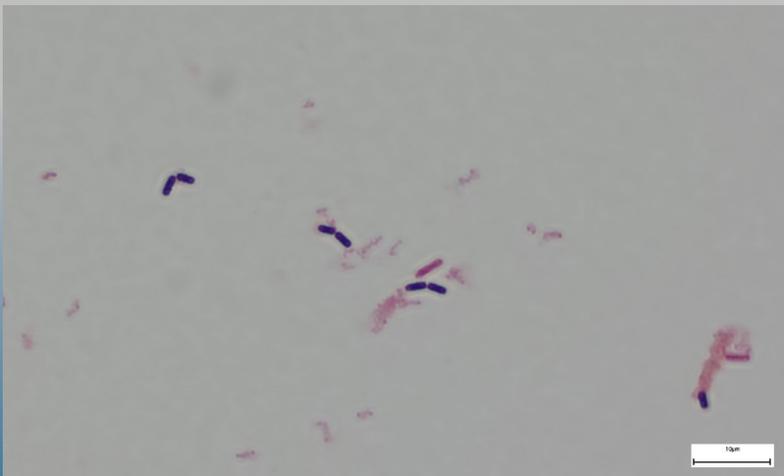
\*\* : Haimi-Cohen et al. J. Clin. Microbiol. 2002.



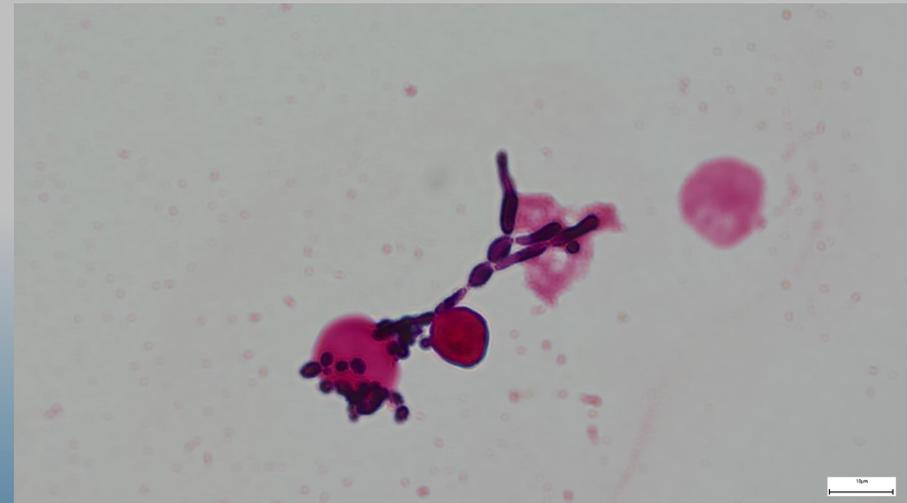
# Risultati



*Candida sp.*



*Bacilli G+*



# Serie storica delle contaminazioni S2 e delle reazioni avverse in FBOV

Anno	Cornee idonee per trapianto	Cornee S2 POS (%)	Cornee S2 POS spedite	Cornee S2 POS trapiantate	Reazioni avverse
2015	2674	35 (1.3)	15	1	1
2016	2862	24 (0.8)	5	0	0
2017	3125	43 (1.4)	7	5	1
2018	3022	41 (1.4)	11	2	0
2019	3154	42 (1.3)	11	1	1
<b>2020</b>	<b>3044</b>	<b>15 (0.5)</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>2021</b>	<b>3465</b>	<b>20 (0.6)</b>	<b>3 + 3 n.e.</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

# Conclusioni

- La colorazione di Gram sul sedimento è una procedura rapida ed economica, meno sensibile rispetto ai test colturali, che affianca efficacemente i sistemi convenzionali.
- L'immediatezza del risultato del Gram risolve le criticità legate a:
  - crescita lenta di alcuni microrganismi (es. *Candida*)
  - contrazione dei tempi di trasporto e trapianto
- La colorazione di Gram può essere utilizzata anche per:
  - dirimere i risultati dubbi degli esami colturali
  - fornire al chirurgo l'identificazione preliminare di un eventuale contaminante, in attesa del referto di laboratorio

# Grazie per l'attenzione

