

VALIDAZIONE DEL PROTOCOLLO DI FERTILITA' DEI TERRENI DI CONSERVAZIONE CORNEALI

F. Mangione², D. Rizzelli², R. Ceccuzzi¹, F. Lallitto², G. Mantegna¹, M.R. Di Palma¹, P. Cambieri²

¹Banca Occhi "F. Trimarchi", Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia

²S.C. Microbiologia e Virologia Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia

INTRODUZIONE

Una contaminazione batterica o fungina del tessuto corneale può avere effetti drammatici per il ricevente compromettendo spesso l'esito del trapianto. Per limitare il rischio di proliferazione microbica durante il periodo di conservazione della cornea vengono utilizzati terreni addizionati di antibiotici ed antimicotici.

I controlli microbiologici per rilevare un'eventuale contaminazione microbica si avvalgono sia di metodiche tradizionali che di metodiche più avanzate che prevedono l'utilizzo di flaconi per emocoltura introdotti in uno strumento con un sistema automatico di rilevazione della crescita microbica riducendo i tempi di risposta e garantendo un'elevata affidabilità. Tale metodica può essere utilizzata anche per campioni diversi da sangue previa validazione secondo le linee guida di riferimento.

Presso la S.C. Microbiologia e Virologia del Policlinico San Matteo di Pavia è in uso il sistema per emocolture BD BACTEC™ FX.

E' stato approntato un protocollo di validazione della fertilità dei terreni di conservazione delle cornee e di efficacia degli antibiotici ed antimicotici in essi contenuti utilizzati dalla Banca Occhi della nostra struttura.

Secondo la European Pharmacopoeia 8.2 (EP) la fertilità di un terreno per preparazioni oftalmiche risulta validata se le colture batteriche si positivizzano entro 3 giorni e quelle fungine entro 5 giorni dalla loro incubazione.

METODI

La fertilità dei terreni di conservazione della cornea è stata valutata come riportato dalla normativa di riferimento (EP). A tale scopo sono state allestite diluizioni scalari in soluzione fisiologica di ceppi ATCC, 4 batterici e 2 fungini come riportato nella EP. E' stato quindi effettuato un primo inoculo di 400UFC/ml nei terreni di conservazione da cui sono stati prelevati 2,5ml (1000 UFC) per l'inoculo in brodocolture. E' stato inoltre effettuato un secondo inoculo di 40UFC/ml nei terreni di conservazione e un inoculo di 2,5 (100 UFC) ml in brodocolture. Le brodocolture sono state incubate per 14 giorni, mentre i terreni di conservazione sono stati incubati a 30°C per 7 giorni(T0). Da questi terreni sono stati effettuati due ulteriori passaggi:

- Dopo 48h di incubazione (T2) da ogni terreno è stata prelevata un'aliquota pari a 100 µl e sottocolturata su piastra agar sangue.
- Dopo 7 giorni (T7) è stato effettuato un nuovo inoculo in flaconi Bactec.

RISULTATI

I flaconi Bactec inoculati al T0 con sospensioni batteriche si sono positivizzati entro 24h, quelli inoculati con sospensioni fungine entro 72h, mentre i flaconi inoculati al T7 sono risultati negativi dopo 14 giorni di incubazione. La sottocoltura su agar sangue al T2 ha mostrato un'inibizione totale della crescita di tutti i ceppi batterici ma non di quelli fungini.

CONCLUSIONI

La positivizzazione delle brodocolture inoculate al T0 entro le tempistiche riportate dalle linee guida di riferimento hanno permesso di validare la fertilità dei terreni di conservazione del tessuto corneale.

L'assenza di crescita batterica e micotica nelle brodocolture inoculate al T7 ha permesso di considerare idonei gli antibiotici ed antimicotici addizionati ai terreni di conservazione e trasporto.