



# Test microbiologici per filtrazione delle soluzioni di mantenimento delle cornee: studio preliminare di applicabilità

**M. Corneli**

Banca degli Occhi della Regione Marche

# Di cosa parleremo

## 1. Introduzione

- Condizioni di partenza

## Risultati

Evidenze sperimentali

## 2. Procedura sperimentale

- Metodi a confronto
- Studio di applicabilità

## 3. Conclusioni

Osservazioni

Sviluppo futuro





# 1

# Introduzione

*Quando un uomo rivolge tutta la volontà verso una data cosa, finisce sempre per raggiungerla.*

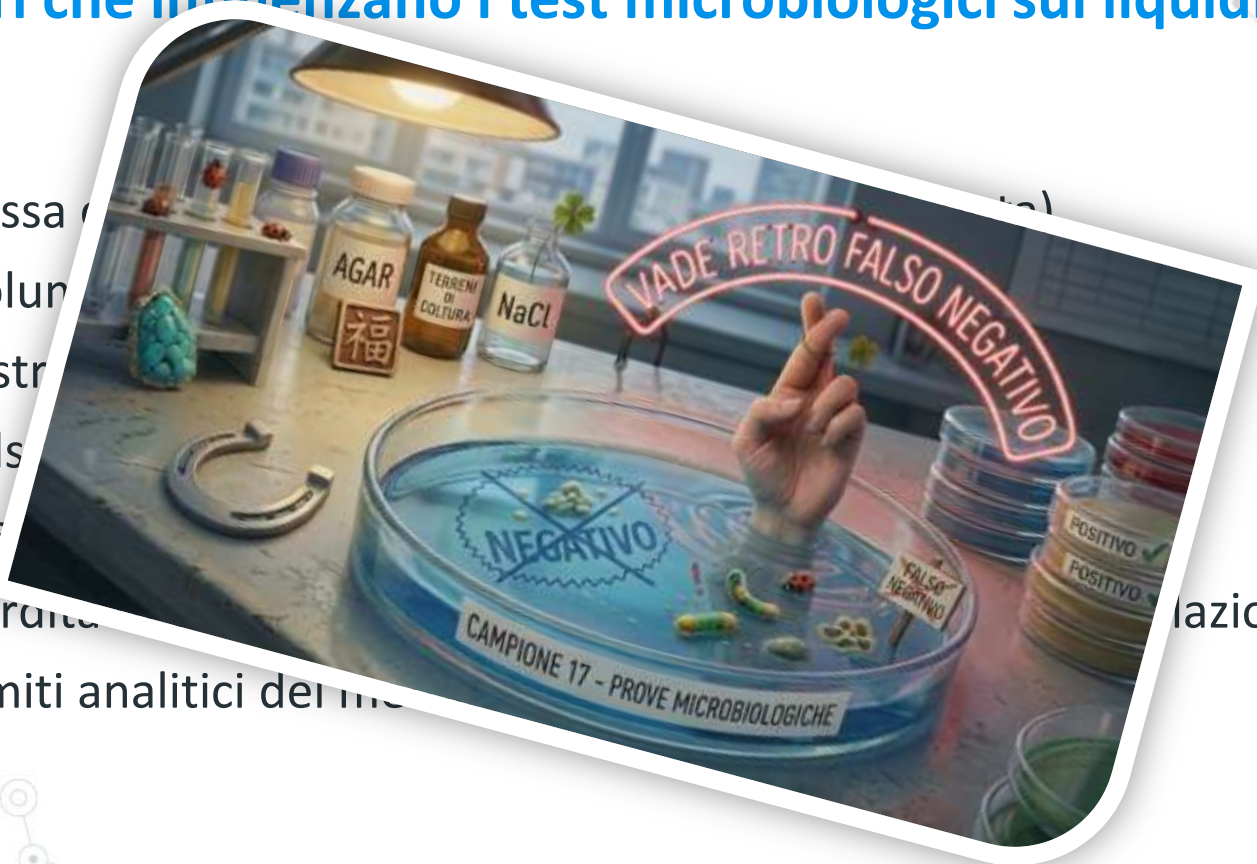
*Hermann Hesse*

# Un percorso sotto controllo e di Qualità



# Fattori che influenzano i test microbiologici sui liquidi

- ◎ Bassa
- ◎ Volum
- ◎ Distr
- ◎ Ads
- ◎ Sta
- ◎ Perdita
- ◎ Limiti analitici del me



olazione.

# Cosa testiamo?

ASSENZA DI CONTAMINAZIONE	CONTAMINAZIONE OMOGENEA	CONTAMINAZIONE DISOMOGENEA Apparente < Reale
 <p data-bbox="583 489 1344 762"><b>Murphy's law</b> <u>/mɜːfɪz lɔː/</u> Anything that can go wrong, will go wrong.</p>		

# Farmacopea Europea e saggio di sterilità

EUROPEAN PHARMACOPOEIA

## 2.6. BIOLOGICAL TESTS

Table 2.6.1.2 – Minimum quantity to be used for each medium

Quantity per container	Minimum quantity to be used for each medium unless otherwise justified and authorised
<i>Liquids</i>	
– less than 1 ml	The whole contents of each container
– 1-40 ml	Half the contents of each container but not less than 1 ml
– greater than 40 ml and not greater than 100 ml	20 ml
– greater than 100 ml	10 per cent of the contents of the container but not less than 20 ml
<i>Other preparations soluble in water or in isopropyl myristate</i>	The whole contents of each container to provide not less than 200 mg
<i>Drugs</i>	
– less than 50 mg	The whole contents of each container
– 50 mg or more but less than 300 mg	Half the contents of each container but not less than 50 mg
– 300 mg to 5 g	150 mg
– greater than 5 g	500 mg
<i>Catgut and other surgical sutures for veterinary use</i>	3 sections of a strand (each 30 cm long)

È possibile applicare il **METODO PER FILTRAZIONE** alla soluzione di mantenimento in ipotermia a 4°C?

### TEST FOR STERILITY OF THE PRODUCT TO BE EXAMINED

The test may be carried out using the technique of membrane filtration or by direct inoculation of the culture media with the product to be examined. Appropriate negative controls are included. The technique of membrane filtration is used whenever the nature of the product permits, that is, for filterable aqueous preparations, for alcoholic or oily preparations and for preparations miscible with or soluble in aqueous or oily solvents provided these solvents do not have an antimicrobial effect in the conditions of the test.



# 2

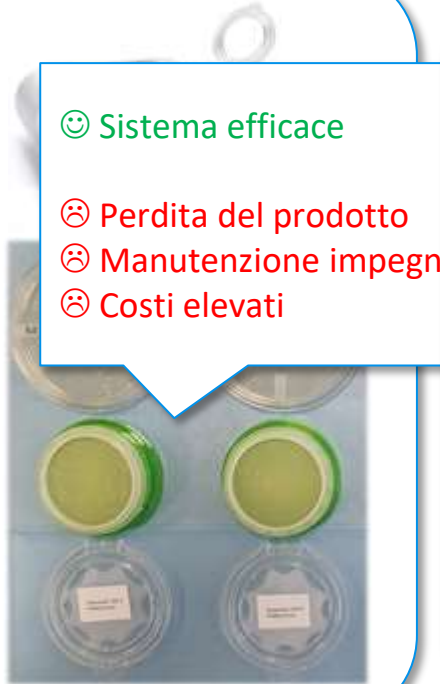
# Procedura sperimentale

*Lo sperimentatore che non sa cosa sta cercando, non comprenderà ciò che trova.*

*Claude Bernard*

# Come filtrare?

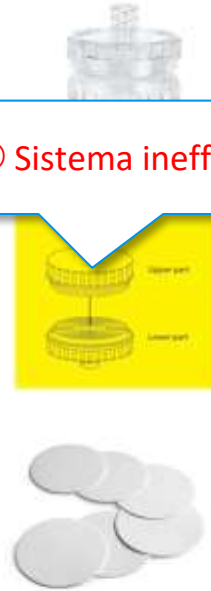
Tentativo n°1



😊 Sistema efficace

- ☹️ Perdita del prodotto
- ☹️ Manutenzione impegnativa
- ☹️ Costi elevati

Tentativo n°2



☹️ Sistema inefficace

Tentativo n°3



S

0,22µm

M

# Caratteristiche dei filtri



Caratteristica	Filtro M	Filtro S
Tipo di dispositivo	Filtro a siringa	Filtro in linea a siringa o pompa
Membrana	PVDF idrofilo da 0,22 $\mu$ m	PVDF idrofilo da 0,22 $\mu$ m
Volume consigliato	10-100ml	Fino a 1-2l
Applicazione tipica	Filtrazione piccoli volumi	Filtrazioni medi/grandi volumi
Pressione massima	10,3bar (150psi)	3,1bar (45psi)
Flusso	40ml/min	100ml/min
Area filtrante	4,52cm <sup>2</sup>	10cm <sup>2</sup>
Conessioni	Female Luer-Lock / Male Luer-Slip	Female Luer-Lock / Male Luer-Lock
Hold-up volume	$\leq$ 0,1ml	$\leq$ 2,2ml
Sterilizzazione	si	si

# Test preliminari

Media Fill → controllo negativo



Recupero dei microrganismi dal filtro → controllo positivo



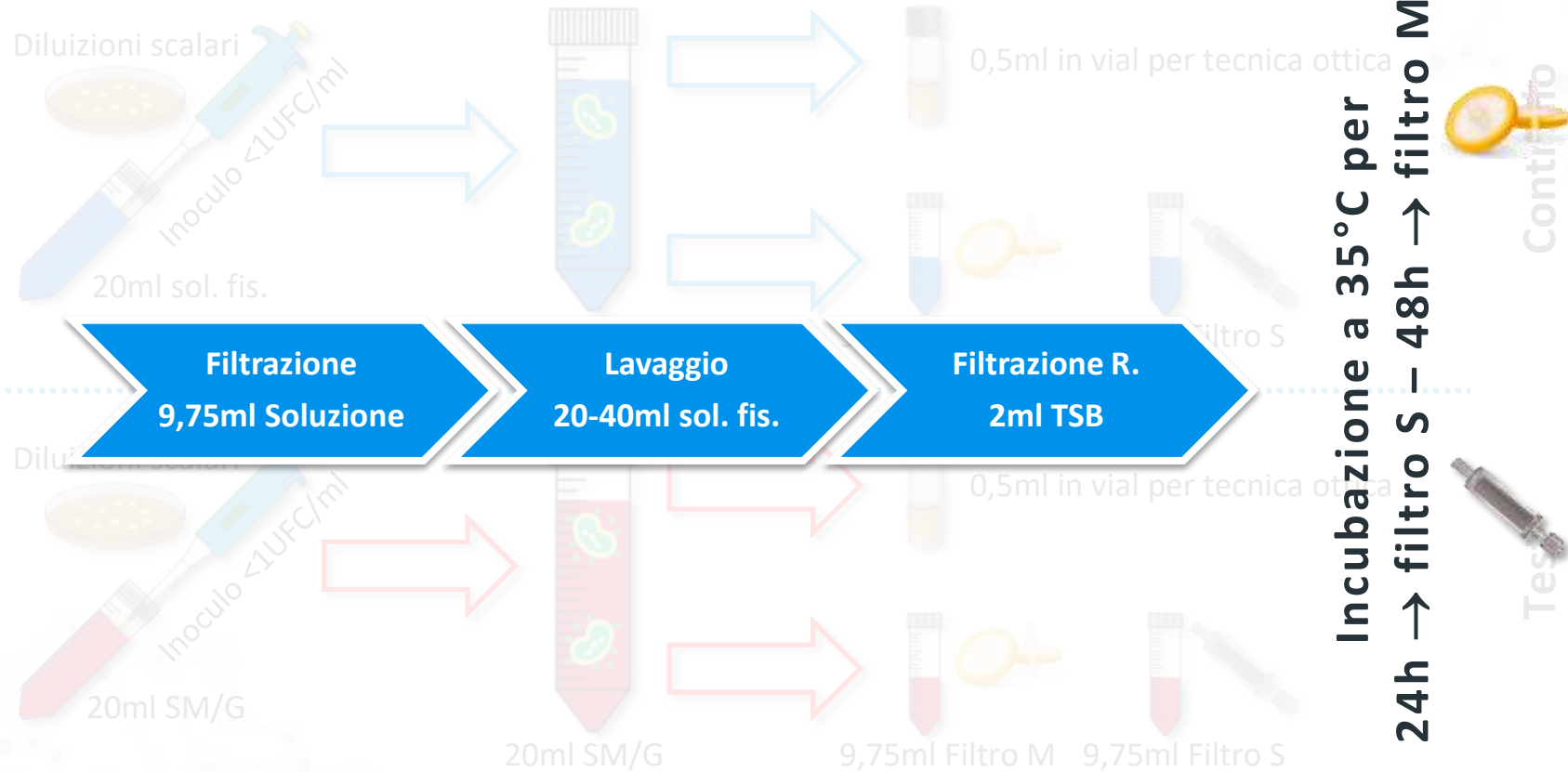
Lavaggio della Soluzione di Mantenimento/Gentamicina dal filtro → controllo positivo



Incubazione a 35°C per  
24h → filtro S – 48h → filtro M



# Studio di applicabilità





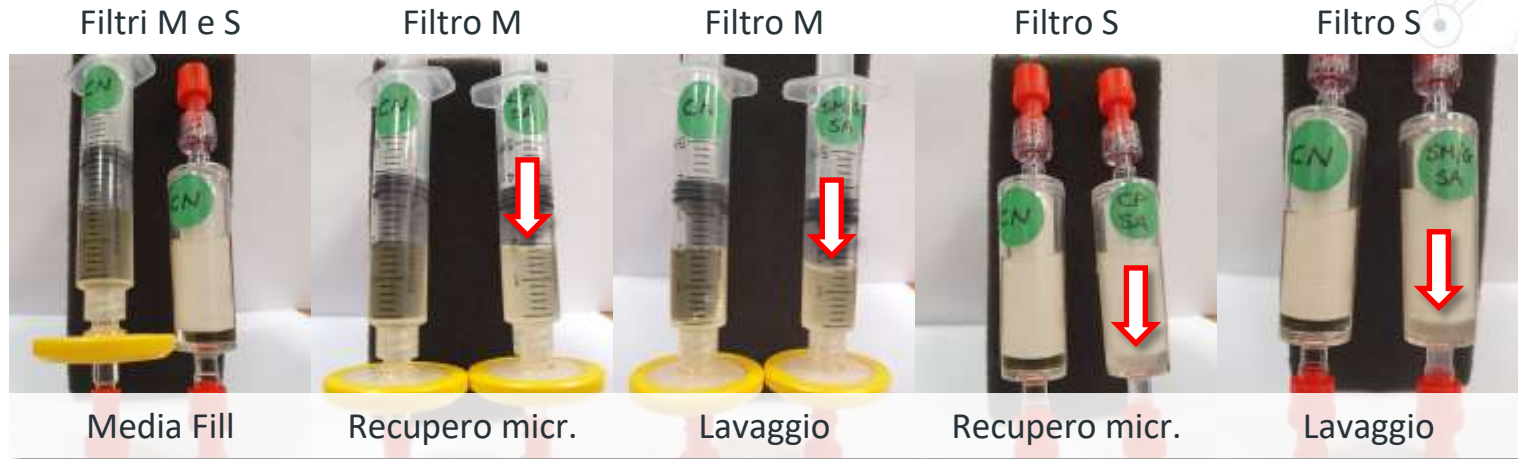
# 3

# Risultati

*Non fidatevi troppo dei risultati di un esperimento, a meno che non siano confermati dalla teoria.*

*Sir Arthur Eddington*

# Test preliminari: *S. aureus*



Specie (●SA)	Filtro	Crescita microbica (torbidità TSB)		
		Media Fill (●CN)	Recupero microrganismi (●CP)	Lavaggio (●SM/G)
<i>S. aureus</i> ATCC-6538 – 52UFC sensibile alla Gentamicina	M (48h)	Negativo	Positivo	Positivo
	S (24h)	Negativo	Positivo	Positivo

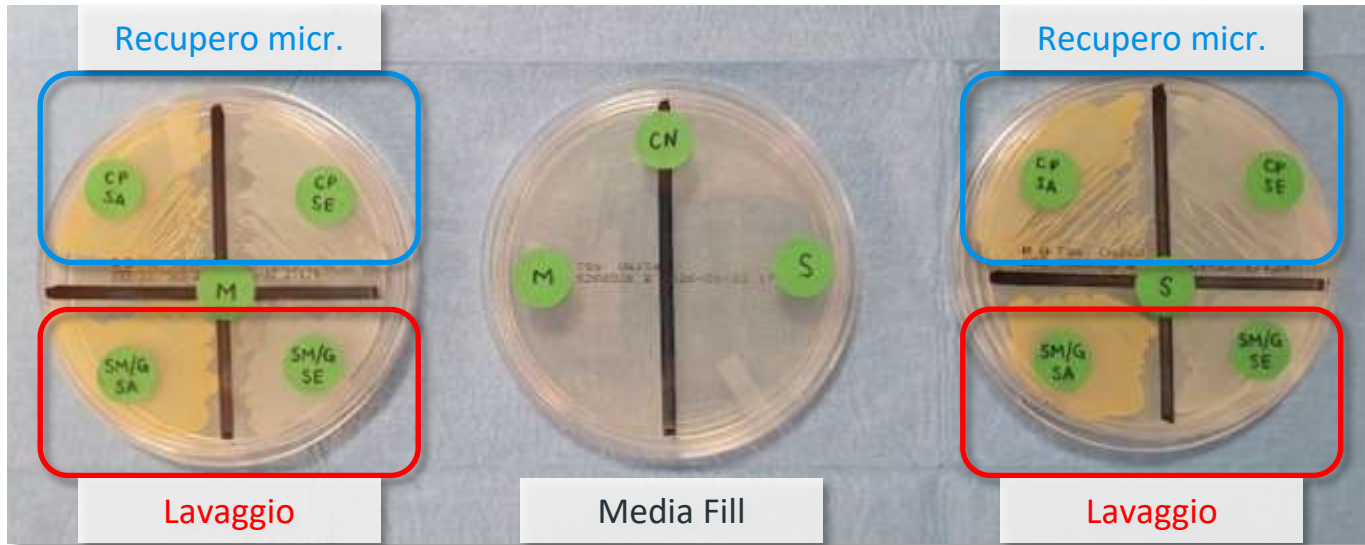
# Test preliminari: *S. epidermidis*




Specie (●SE)	Filtro	Crescita microbica (torbidità TSB)		
		Media Fill (●CN)	Recupero microrganismi (●CP)	Lavaggio (●SM/G)
<i>S. epidermidis</i> ATCC-12228 – 16UFC sensibile alla Gentamicina	M (48h)	Negativo	Positivo	Positivo
	S (24h)	Negativo	Positivo	Positivo

# Conferma della crescita su TSA




●SA: *S. aureus* – ●SE: *S. epidermidis*







# Test di filtrazione: *E. faecium*

Specie	Tecnica di rilevazione	Crescita microbica	
		Soluzione fisiologica	SM/G
<i>E. faecium</i> ISOLATO DA CORNEA  ~0,7UFC/ml o ~14UFC/20ml  resistente alla Gentamicina	Tecnica ottica (24h) 	Positivo (0,5ml in terreno per batteri)	Negativo (0,5ml in terreno per batteri)
	Filtro M (48h) 	Positivo (TSB)	Positivo (TSB)
	Filtro S (24h) 	Positivo (TSB)	Positivo (TSB)
Esito del controllo positivo (inoculo microbico + SM/G in vial per tecnica ottica): POSITIVO			


# Test di filtrazione: *E. faecalis*

Specie	Tecnica di rilevazione	Crescita microbica	
		Soluzione fisiologica	SM/G
<i>E. faecalis</i> ATCC-29212  ~0,4UFC/ml o ~8UFC/20ml  resistente alla Gentamicina	Tecnica ottica (24h) 	Negativo (0,5ml in terreno per batteri)	Negativo (0,5ml in terreno per batteri)
	Filtro M (48h) 	Positivo (TSB)	Positivo (TSB)
	Filtro S (24h) 	Positivo (TSB)	Positivo (TSB)
Esito del controllo positivo (inoculo microbico + SM/G in vial per tecnica ottica): POSITIVO			

# Test di filtrazione: *C. albicans*

Specie	Tecnica di rilevazione	Crescita microbica	
		Soluzione fisiologica	SM/G
<i>C. albicans</i> ATCC-18231  ~0,9UFC/ml o ~18UFC/20ml  resistente alla Gentamicina	Tecnica ottica (24h) 	Negativo (0,5ml in terreno per miceti)	Negativo (0,5ml in terreno per miceti)
	Filtro M (48h) 	Positivo (TSB)	Positivo (TSB)
	Filtro S (24h) 	Positivo (TSB)	Positivo (TSB)
Esito del controllo positivo (inoculo microbico + SM/G in vial per tecnica ottica): POSITIVO			

# Test a confronto su casi reali

Cornea	Cornea in TSB	Tecnica ottica (0,5ml × 2)	Filtro S 	Identificazione
01	Negativo	Negativo	Negativo	-
02	Negativo	Negativo	Negativo	-
03	Negativo	Negativo	Negativo	-
04	Negativo	Negativo	Negativo	-
05	Positivo	Positivo	Positivo	<i>S. epidermidis</i> – Gent. R
06	Negativo	-	-	-
07	Negativo	-	-	-
08	Positivo	Negativo	Positivo	<i>S. lugdunensis</i> – Gent. R
09	Negativo	-	-	-
10	Positivo	Positivo	Positivo	<i>E. faecalis</i> – Gent. R

## La performance del filtro S non stupisce, perché...





# 4

# Conclusioni

*In questioni di scienza, l'autorità di un migliaio di persone non vale tanto quanto l'umile ragionamento di un singolo individuo.*

*Galileo Galilei*

## Considerazioni finali

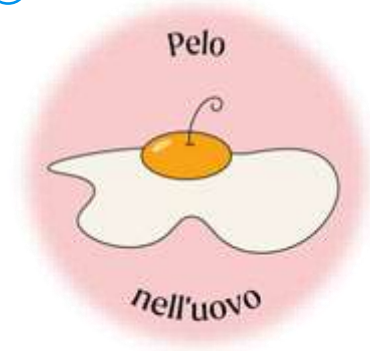
- ◎ Il metodo per filtrazione funziona?
  - I risultati preliminari sono stati incoraggianti e sarebbe interessante saggiare cosa accade anche nel caso delle cornee conservate in coltura d'organo a 31°C.
- ◎ Il metodo presenta delle criticità?
  - Assolutamente sì: le cellule microbiche adsorbite al tessuto o alla superficie interna del flacone non verrebbero rilevate.

## Considerazioni finali

- ◎ Il metodo potrebbe essere applicato di routine?
  - Una volta validato, potrebbe essere di aiuto nel caso di cornee con criticità dal punto di vista microbiologico e per le quali sarebbe opportuno avere maggiori garanzie.
- ◎ Di cosa deve tenere conto il processo di validazione?
  - Certamente della capacità di evidenziare tutti i tessuti positivi e del mantenimento delle caratteristiche delle soluzioni filtrate, al fine di non arrecare danni alle cornee.

## Considerazioni finali

- ◎ È necessario andare ad evidenziare cariche microbiche così basse?
  - Questa la lascio rispondere a voi... 😊



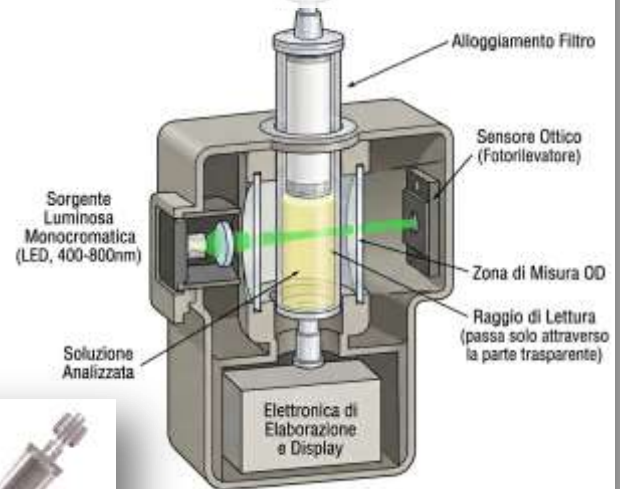
# Sviluppi futuri



Preincubazione per  
Inoculo in vial per risul



## Letture spettrofotometrica diretta e curva di crescita con referto



**GRAZIE E UN SALUTO DA...**

**Max**

**Silvia**

**Sonia**



**Banca degli Occhi della Regione Marche**