

**Hotel Aqualux**  
Bardolino (VR)  
27-28 Settembre 2024

# Atti del convegno

editors **Giovanni Casiraghi & Marco Pradella**

Armonizzazione e semantica del laboratorio nelle Sepsis ICA *Marco Pradella*

Il documento sulle Sepsis di Regione Lombardia *Maristella Moscheni*

Il sistema di sorveglianza di Regione Puglia *Viviana Vitale*

La prevenzione del rischio infettivo a garanzia della qualità dell'assistenza:

"Sistema di Monitoraggio delle azioni regionali di controllo delle Infezioni Correlate all'Assistenza (SIMON)" *Paola M. Placanica*

Risvolti organizzativi correlati alle Sepsis ICA *Luca Fabbri - Annibale Raglio*

Infezioni delle vie urinarie *Fabio Manoni*

La risposta di una microbiologia alle calamità naturali *Vittorio Sambri*

Equità verticale, ICT e Sistemi Sanitari. Alcune applicazioni in Sanità *Fabrizio Clemente*

"La sfida ICA Sepsis: collaborazione tra medicina di laboratorio e clinica"

*Graziella Bonetti, Andrea Patroni*

Sepsis, ICA e Infezioni Ossee *Tudor Draghici*

"Progetto Pedianet" *Elisa Barbieri*

Stewardship e TDM antimicrobici, due facce della stessa medaglia? *Ines Bianco, Antonio Conti*

Sepsis, ICA e l'implementazione di una ceppoteca *Assunta Sartor*

Tubercolosi: ieri, oggi e domani *Assunta Sartor*

La diagnosi microbiologica di Sepsis e ICA integrata "One Health" *Alberto Colombo*

ICA di Genere *Paola Sabatini*

La Sepsis e le ICA: il punto di vista del Patologo Clinico *Paolo Doretto*

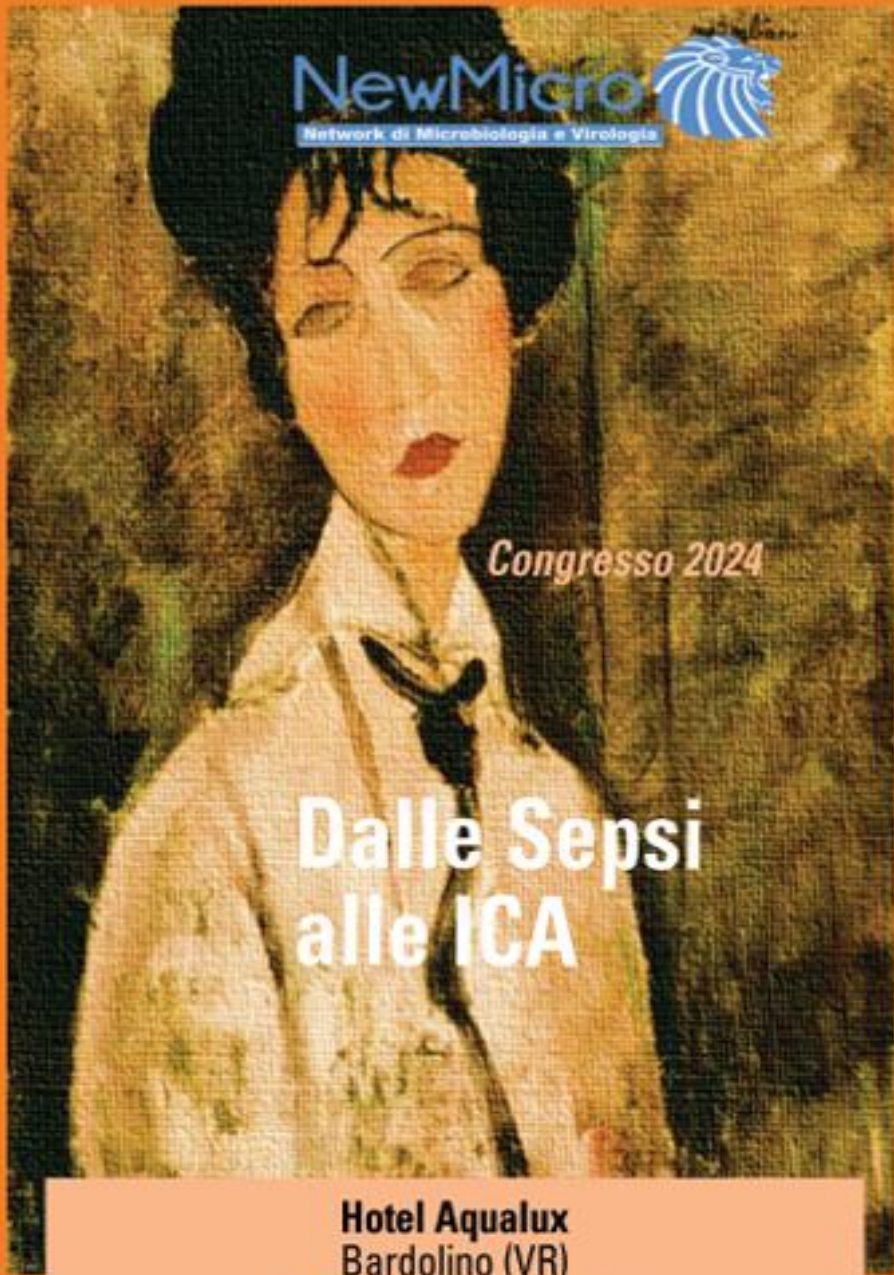
Data Bases Relazionali e SQL Le query dedicate Premal *Alessandro Orro*

"Discussione sulla sentenza della Corte di Cassazione III Civile n. 6386 del 3.3.2023" *Giovanni Casiraghi*

Reti collaborative microbiologiche: i POCT e gli obblighi

legali (malattie sottoposte a denunce) *Giovanni Casiraghi*

Poster Marco Toni NewMicro2024 - ECMU e IVU *Graziella Bonetti*



**Hotel Aqualux**  
Bardolino (VR)  
27-28 Settembre 2024

# Sepsi, ICA e l'implementazione di una ceppoteca

**Assunta Sartor**



**ASU FC**  
Azienda sanitaria  
universitaria  
Friuli Centrale

Direttore SOC Microbiologia - Udine

# Sepsi ICA



L'importanza rivestita dalla ceppoteca è rilevante, è paragonabile ad una raccolta bibliografica, col vantaggio di fornire germi di paragone per eventuali confronti e conferme in un ambito di maggiore sicurezza del paziente e all'affidabilità dei controlli di qualità ad integrazione di quelli disponibili sul mercato, con in aggiunta la possibilità di testare la strumentazione sottoposta a lla legislazione europea/ nazionale.

# CEPPOTECA



ELSEVIER

Review Article

### Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains

Ning Guo<sup>a,b</sup>, Qiang Wei<sup>a,\*</sup>, Yi Xu<sup>b,\*</sup>



microorganisms

Review

### Preservation, Characterization and Exploitation of Microbial Biodiversity: The Perspective of the Italian Network of Culture Collections

Luciana De Vero<sup>1,\*</sup>, Maria Beatrice Boniotti<sup>2</sup>, Marilena Budroni<sup>3</sup>, Pietro Buzzini<sup>4</sup>, Stefano Cassanelli<sup>1</sup>, Roberta Comunian<sup>5</sup>, Maria Gullo<sup>1</sup>, Antonio F. Logrieco<sup>6</sup>, Ilaria Mannazzu<sup>3</sup>, Rosario Musumeci<sup>7</sup>, Iolanda Perugini<sup>8</sup>, Giancarlo Perrone<sup>6</sup>, Andrea Pulvirenti<sup>1</sup>, Paolo Romano<sup>9</sup>, Benedetta Turchetti<sup>4</sup> and Giovanna Cristina Varese<sup>8</sup>

STANDARD OPERATING PROCEDURE for:

Department of Applied Technology, Institute of Applied Sciences and Technology, National Centre of Research and Technology, Burkina Faso; Food Research Institute, Council for Scientific and Industrial Research, Ghana; University of Development Studies, Department of Applied Biology, Ghana; University of Abomey-Calavi, Faculty of Agricultural Science, Benin, under the GreenGrowth Project

### Handling, maintenance and preservation of microbial isolates in culture-collection

Document ID	SOP-GG-01-00
Issued by	Pernille Johansen (PJ) (University of Copenhagen, Food Science) Clarisse Compaoré (CC) (Department of Applied Technology, IRSAT, CNRST) Hagrétou Sawadogo (HS) (Department of Applied Technology, IRSAT, CNRST) Lene Jespersen (LJ) (University of Copenhagen, Food Science)
Revision version	00
Date	May 2017
Approved by	Lene Jespersen

Review Article

### Preservation of Viable Microorganisms in the Laboratory: An Overview of Basics, Methods and Practical Recommendations for Beginners

Author: Evgeny Puchkov

Abstract



### STANDARD OPERATING PROCEDURES (SOPs) FOR SAMPLING OF MICROBIOME IN DIFFERENT ECOSYSTEMS

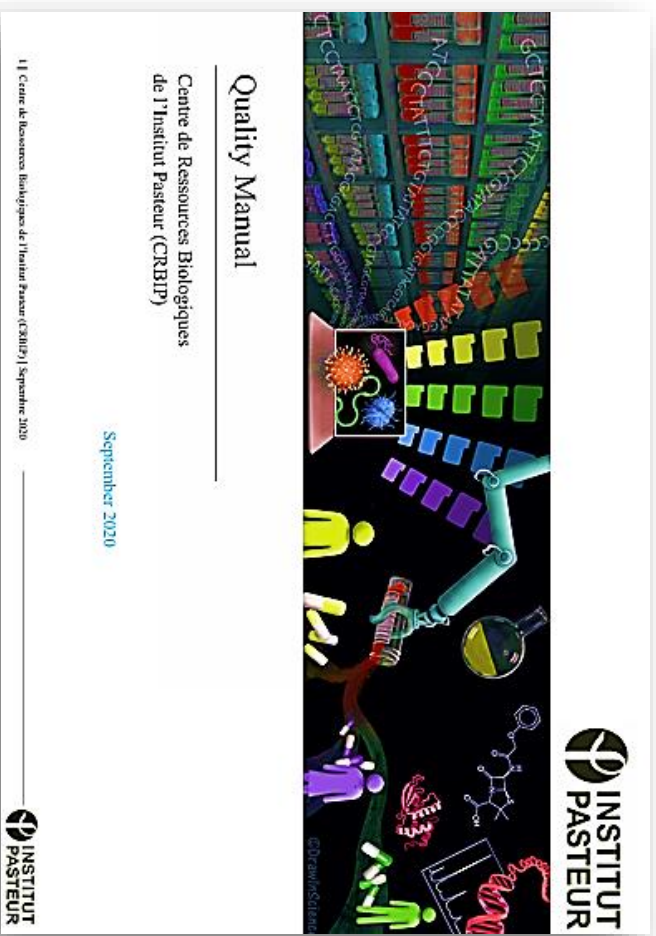
Luca Cocolin<sup>1</sup>, Annamaria Bevivino<sup>2</sup>, Rosa Alduina<sup>3</sup>, Marco Andreolli<sup>4</sup>, Luigi Bertolotti<sup>5</sup>, Angela Bianco<sup>6</sup>, Vittorio Capozzi<sup>7</sup>, Barbara Colitti<sup>5</sup>, Cristina Costa<sup>8,9</sup>, Manuela Costanzo<sup>2</sup>, Antonio Curtoni<sup>8,9</sup>, Luciana Di Gregorio<sup>2</sup>, Aya Elsayed<sup>1</sup>, Giovanna Felis<sup>4</sup>, Massimo Ferrara<sup>10</sup>, Ilario Ferrocino<sup>1</sup>, Alessia Fiore<sup>2</sup>, Andrea Franzetti<sup>11</sup>, Raimondo Gaglio<sup>12</sup>, Giuseppe Gallo<sup>3</sup>, Marco Garello<sup>1</sup>, Donato Giovannelli<sup>13</sup>, Elena Gonella<sup>1</sup>, Maria Gullo<sup>14</sup>, Silvia Lampis<sup>4</sup>, Marzia Licata<sup>13</sup>, Sahar Maghrebi<sup>1</sup>, Narcisa Mandras<sup>9</sup>, Marino Moretti<sup>15</sup>, Gianmarco Mugnai<sup>16</sup>, Nunzia Nappi<sup>13</sup>, Filomena Nazzaro<sup>17</sup>, Patrizia Nebbia<sup>5</sup>, Feliciano Oliva<sup>13</sup>, Andrea Peano<sup>5</sup>, Antonino Pollio<sup>13</sup>, Valeria Poscente<sup>2</sup>, Paola Quatrini<sup>3</sup>, Umra Rasool<sup>5</sup>, Anna Reale<sup>17</sup>, Janira Roana<sup>9</sup>, Elisa Salvetti<sup>4</sup>, Ciro Sannino<sup>16</sup>, Federico Sbarra<sup>2,15</sup>, Filippo Sevi<sup>2</sup>, Davide Spadaro<sup>1</sup>, Irene Stefanini<sup>1</sup>, Silvia Tabacchioni<sup>2</sup>, Jacopo Tartaglia<sup>15</sup>, Valeria Tatangelo<sup>11</sup>, Benedetta Turchetti<sup>16</sup>, Giacomo Zara<sup>5</sup>, Teresa Zotta<sup>18</sup>, and Giovanna Cristina Varese<sup>15</sup>.

#### CARIBBEAN REGIONAL MICROBIOLOGY STANDARD OPERATING PROCEDURES

Propagation and Maintenance of Quality Control Organisms – SOP No: CRM-SOP 19



STRENGTHENING OF MEDICAL LABORATORY SERVICES IN THE CARIBBEAN A CARIFORUM Project Funded by the European Union and implemented by CARIC



## About the CRBIP

The Biological Resource Center of the Institut Pasteur (CRBIP, for its initials in French) encompasses five biobanks and collections:

- CIP** >26K bacterial strains
- ICAReB** >100K human samples
- PCC** >750 cyanobacterial strains
- CVIP** >200 viral strains
- CNCM** >3K microbial strains >1K cell lines



## The QMS of the CRBIP

The quality management system (QMS) covers the following activities **acquisition, production or preparation, control, conservation and distribution** of biological materials : bacteria, viruses, cyanobacteria and biological human samples.

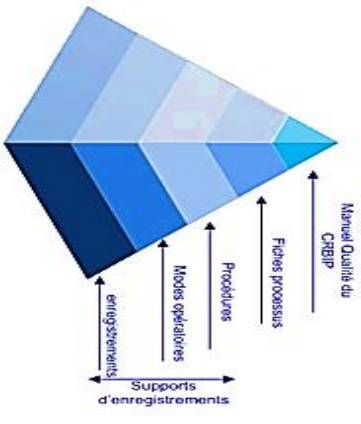
The QMS applies to three entities: **CIP, PCC and ICAReB**. All of them located at the Institut Pasteur campus Paris. The CRBIP is certified under the National standard NF S96-900.



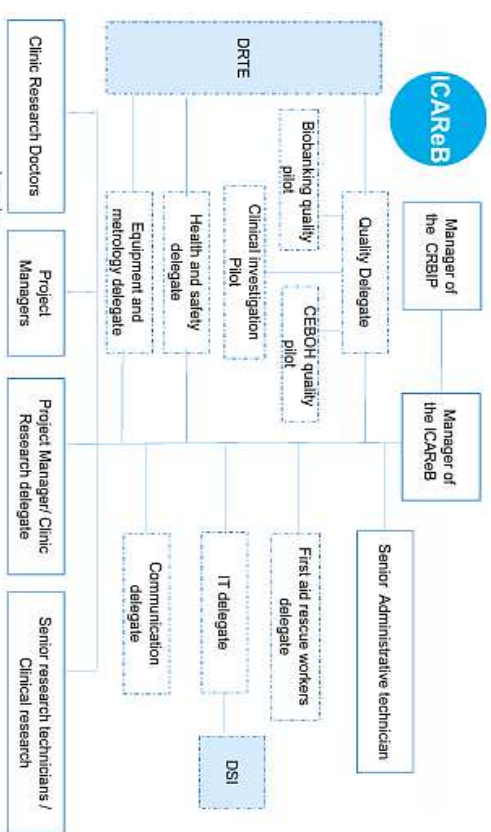
## File management

The general files of CRBIP are available in the WebCampus document management tool.

The records are available physically (paper) and on-line using the Gala network of the Institut Pasteur Paris.



## Organization charts of the Collections



## Descrizione del processo di ricezione, stoccaggio, recupero del materiale

- ▶ Scheda preparato
- ▶ Anonimizzazione o Pseudoanonimizzazione dei dati (eliminazione dati anagrafici, ri-numerazione campione-germe)
- ▶ Stoccaggio
- ▶ Software di gestione
- ▶ Controllo frigoriferi
- ▶ Selezione e Restituzione campione/i su richiesta,
- ▶ Aliquotazione

## SW come minimum, il management system della ceppoteca include:

- ▶ responsabilità (8.1)
- ▶ obiettivi e policies (8.2)
- ▶ informazioni documentali (8.2, 8.3 and 8.4)
- ▶ cambi e modifiche
- ▶ accessi non autorizzati
- ▶ back-up
- ▶ archiviazione
- ▶ recupero
- ▶ tempo di conservazione
- ▶ disponibilità

## Controlli

- ▶ Descrizione campioni ceppoteca (per singola scheda o per gruppi)
- ▶ Obsolescenza campioni
- ▶ Query per tipologie (germe, data, resistenze)
- ▶ Malfunzionamenti frigoriferi,
- ▶ Procedure di recovery

✓ responsabilità (8.1)

✓ obiettivi e policies (8.2)

✓ informazioni documentali (8.2, 8.3 and 8.4)

# Ceppoteca





ASU FC  
Azienda sanitaria  
universitaria  
Friuli Centrale



REGIONE AUTONOMA  
FRIULI VENEZIA GIULIA

UOC Microbiologia

Direttore:  
Dr.ssa Assunta SARTOR

### SCHEDA CEPPOTECA

UDINE, \_\_\_\_\_

Numero progressivo	Data raccolta ceppo	Modalità conservazione	fresco e congelato -20°C	note
--------------------	---------------------	------------------------	--------------------------	------

Risultato  Pos  Dubbio  Neg per sierologia per:  *E. histolytica*,  *S. stercoralis*,  Schistosoma,  
 Toxocara,  Leishmania,  Trichinella,  Echinococco

#### Tecnica/e utilizzata/e per la diagnosi:

microscopia diretta e dopo arricchimento formolo/etilacetato/etere

colorazione/i estemporanea/e: \_\_\_\_\_

colorazione/i permanente/i: \_\_\_\_\_

ricerca a. nucleici:  SI  NO Tecnica: \_\_\_\_\_ Ditta: \_\_\_\_\_

ricerca antigeni:  SI  NO Tecnica: \_\_\_\_\_ Ditta: \_\_\_\_\_

esame culturale per *Entamoeba histolytica*





## Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains

Ning Guo<sup>a,b</sup>, Qiang Wei<sup>a,\*</sup>, Yi Xu<sup>b,\*</sup><sup>a</sup>National Pathogen Resource Center (NPRC), Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China<sup>b</sup>Institute of Biothermal Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 June 2020

Received in revised form 10 November 2020

Accepted 19 November 2020

## Keywords:

Cryopreservation

Cryoprotectants

Pathogenic microbial strains

## ABSTRACT

The preservation of pathogenic microbial strains is of great significance for basic research in microbiology and utilization of microbial resources. Appropriate preservation methods can maintain high survival rate and genetic stability of pathogenic microbial strains for a long time. This study summarizes the current status of preservation of strains, discusses the limitations and damaging factors of cryopreservation and prospects for optimization, and explores the mechanism of cryopreservation of strains. Our main objective is to provide a reference for the long-term effective preservation of microbial resources and guarantee of national biosafety.

© 2020 Published by Elsevier B.V. on behalf of KeAi Communications Co., Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Table 1**

Comparison of major advantages and disadvantages of the methods used for preservation.

Methods	Advantages	Disadvantages
Periodic subcultures	Simple operation and convenient storage	Short-term storage and ease of mutation
Drying	Relatively long-term storage	Narrow range of strains and ease of mutation
Freeze-drying	Long-term storage and preservation of a wide range of strains	High operating costs and complicated operation
Cryopreservation	Long-term storage, wide application (range of strains), and low-cost protocol	Cryoprotectants required and high energy consumption

## Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains

Ning Guo<sup>a,b</sup>, Qiang Wei<sup>a,\*</sup>, Yi Xu<sup>b,\*</sup><sup>a</sup>National Pathogen Resource Center (NPRC), Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China<sup>b</sup>Institute of Biothermal Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 June 2020

Received in revised form 10 November 2020

Accepted 19 November 2020

## Keywords:

Cryopreservation

Cryoprotectants

Pathogenic microbial strains

## ABSTRACT

The preservation of pathogenic microbial strains is of great significance for basic research in microbiology and utilization of microbial resources. Appropriate preservation methods can maintain high survival rate and genetic stability of pathogenic microbial strains for a long time. This study summarizes the current status of preservation of strains, discusses the limitations and damaging factors of cryopreservation and prospects for optimization, and explores the mechanism of cryopreservation of strains. Our main objective is to provide a reference for the long-term effective preservation of microbial resources and guarantee of national biosafety.

© 2020 Published by Elsevier B.V. on behalf of KeAi Communications Co., Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Table 2**

Influencing factors and results of cryopreservation.

Impact factors	Procedure	Outcomes	References
Cryoprotectants	10% skim milk	10% skim milk improves bacterial survival	22
	15% glycerin		
	A natural deep eutectic solvent	Improves the vitality of lactic acid bacteria	25
Cryoprotectants	Ice recrystallization inhibitors such as vinyl alcohol and ethylene glycol	Compared to glycerol, they increase the recovery rate of <i>Escherichia coli</i> by four times	20
	Sucrose	Significantly improve the survival rate of bacteria and fungi	18
	Trehalose		
	Skim milk		
Cooling and warming rates	Sodium glutamate		
	5 to 800 °C/min	Rapid cooling and slow cooling have better preservation effects than those of intermediate cooling.	27
	800 to 5000 °C/min		
	>5000 °C/min		
Cooling rates: -1 °C/min, -10 °C/min, -20 °C/min, and -40 °C/min	Application of -10 °C/min cooling and 0 °C/min rewarming or -1 °C/min cooling and 0 °C/min rewarming can obtain a higher survival rate	28	
Temperature	Warming rates: 0 °C/min, 20 °C/min, and 40 °C/min		
	-20 °C	The morphology of bacteria is almost unchanged under low temperature	30
	-70 °C		
	-196 °C		
-80 °C			
Other factors	Repeated freeze-thaw cycles	The mutation rate of the strain is very low	31
		With longer freezing and thawing durations, bacterial cells become smaller than normal cells and their morphology changes.	31
	The ratio of cryoprotectants to bacterial suspension	Survival is higher at a ratio of NADESs to <i>S. thermophilus</i> of 1:1 (v/v) than that of a 4:1 (v/v) ratio.	21

## Review Article

# Preservation of Viable Microorganisms in the Laboratory: An Overview of Basics, Methods and Practical Recommendations for Beginners

## Abstract

Preservation of viable microbial cultures in laboratory practice is necessary for performing both short-term and long-term projects with microorganisms *in vitro*. There is no universal method to preserve cultures of live microbial cells of different taxonomic groups. This brief review summarizes the basics of methods for short-term and long-term preservation of viable cultures of microorganisms *in vitro*. Practical recommendations are presented for the preservation of viable cultures of microorganisms, which can be useful in conventional microbiological laboratories.

**Keywords:** Microbial cultures; Low-temperature preservation; Subculturing; Viability

All methods of preserving viable cultures of microorganisms in laboratory practice are based on a *decrease in metabolic activity or even a complete cessation of all 'chemical reactions in cells*. This can be done primarily by *lowering the temperature and/or activity of the water*.

# Ceppoteca aziendale: criteri di inclusione

La ceppoteca aziendale consta di collezioni annuali di isolati batterici. I ceppi di interesse che vengono selezionati, vuoi per sede del prelievo, vuoi per presenza di particolari meccanismi di resistenza batterica, vuoi per tipo di microorganismo, sono i seguenti:

**Tutti gli isolati da Emocolture e da Liquor;      Tutti gli isolati che presentano meccanismi di resistenza batterica:**

***Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA)**

***Pseudomonas aeruginosa* multi-farmaco resistente (MDR)**

***Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia spp*, *Stenotrophomonas maltophilia* multi-farmaco resistenti (MDR)**

***Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi**

***Enterobacteriaceae* produttrici di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL)**

***Enterococcus faecium/faecalis* vancomicina resistente (VRE)**

- \* Tutti gli isolati di interesse medico o epidemiologico di seguito elencati:
- \* Isolati causa di infezione di artroprotesi/protesi valvolari;
- \* Isolati da dispositivi intravascolari (CVC, Midline, ecc) causa di infezioni catetere correlate;

Dermatofiti/funghi causa di dermatomicosi

Isolati causa di infezioni gastrointestinali quali *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio spp*, *Campylobacter* e *Shigella*, *Ecoli tossinogenico*

Isolati esigenti quali *Haemophilus Influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Nocardia*, *Legionella spp*

Cluster epidemiologici o ceppi sottoposti a sorveglianza sanitaria (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida auris*)

Isolati del programma "Veq Neqas"

Isolati di interesse clinico infettivologico espressamente richiesto dalla Clinica di Malattie infettive.

## Definizione

Per ceppoteca si intende una “collezione” di microrganismi , un archivio in cui cellule microbiche, ottenute da una coltura pura, dopo essere state caratterizzate e classificate vengono mantenute in uno stato inattivo grazie a vari metodi, debitamente stoccate in opportune condizioni ambientali, al fine di essere conservate per un tempo indeterminato.

Tali ceppoteche assolvono a molteplici scopi , tra cui ricerca, insegnamento e/o controllo di qualità interno.

L' inattivazione dei batteri, ovvero la soppressione della loro capacità funzionale in termini di crescita (riproduzione), sintesi di metaboliti e reazioni enzimatiche evidenti, può essere effettuata con diverse metodiche.

## Metodica

Nel nostro laboratorio viene utilizzato il sistema CRYOBANK®, ossia un sistema che prevede l'utilizzo di sferette di vetro per la conservazione prolungata a basse temperature di microrganismi.

Ciascuna unità CRYOBANK® consente la conservazione di circa 25 colture identiche, permettendo la collezione di un grande numero di ceppi in uno spazio esiguo.

Ogni provetta di plastica contiene 1mL di soluzione criocconservante ipertonica che riveste le sferette di vetro a cui i microrganismi possono aderire.

Quando l'acqua nelle cellule viene convertita in ghiaccio, i soluti si accumulano nell'acqua libera residua; questo aumento localizzato della concentrazione di sale può denaturare le biomolecole e la formazione di cristalli di ghiaccio può danneggiare le membrane cellulari.

Il fluido crioprotettivo protegge i microrganismi dalle basse temperature, in quanto viene adsorbito sulla superficie dei microrganismi e forma uno strato viscoso che protegge le membrane, mentre la natura porosa delle perle consente ai microrganismi di aderire prontamente alla superficie.

Questo metodo si è dimostrato una procedura sicura, affidabile e semplice per la conservazione di un'ampia gamma di microrganismi in laboratorio.

# Conservazione di un microrganismo

Il Tecnico di Laboratorio provvede ad identificare con pennarello indelebile il microrganismo in oggetto precedentemente associato ad un numero sequenziale.

Utilizzando una coltura pura e fresca inocula asetticamente una provetta  
® fino ad ottenere una densità equivalente agli standard McFarland 3/4.

Si richiude la provetta con il tappo e si miscela con cura per inversione, per distribuire uniformemente la sospensione.

Mediante pipetta sterile viene poi rimossa la maggior quantità possibile di liquido crioconservante.

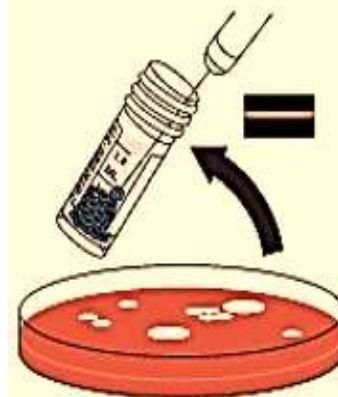
La provetta viene quindi riposta nel rack corrispondente (anch'esso precedentemente identificato con numero sequenziale) e stoccata nel congelatore a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Progettato per l'uso a  $-70^{\circ}\text{C}$ , questo sistema può essere utilizzato anche a  $-20^{\circ}\text{C}$  per la conservazione di alcuni batteri, ma le tempistiche massime di stocca più esigenti come *Neisseria gonorrhoea*, *Campylobacter coli* ecc.

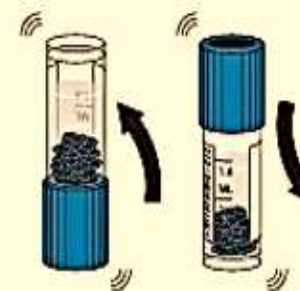
L'uso efficiente dello spazio è particolarmente adatto a metodi di lavoro come il "Seed Lot System" che garantisce la stabilità genetica di una coltura riducendo al minimo il numero di passaggi dall'isolamento originale.

La possibilità di guasto del congelatore è una preoccupazione e dovrebbe essere presa in considerazione la fornitura di backup, un secondo congelatore.

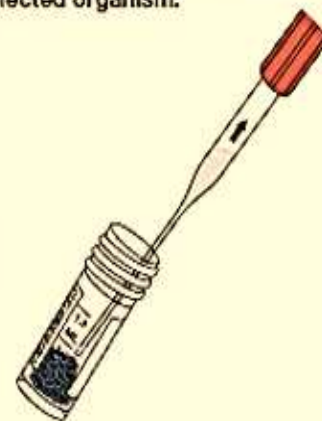
The introduction of the linear bar coding allows for faster scanning and traceable differentiation in your **CRYOBANK®**. The bar coding allows for full traceability and may be used with all commonly available bar code readers. Alternatively the organism coding can be transcribed onto the cryovial or onto another permanent record as desired.



1. Scan the bar-code to allocate to the sample, or alternatively label the cryovial and inoculate with selected organism.



2. Mix carefully by inverting the cryovial.



3. Remove fluid with a sterile pipette.



4. Scan bar-code on the cryovial and box to your software. Store inoculated cryovial in the cryobox at selected temperature.

## Recupero di un microrganismo

Il Tecnico di laboratorio provvede a identificare il ceppo di interesse e a rimuovere la provetta  
® corrispondente dal congelatore.

Dopo aver svitato il tappo della provetta si preleva una sferetta inserendo un ago sterile attraverso il foro della sfera stessa o utilizzando anse monouso sterili.

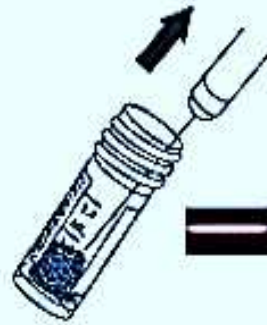
La sferetta può quindi essere lasciata cadere in un idoneo terreno liquido o strisciata direttamente sulla superficie di un idoneo terreno solido, per poi procedere a intubare nella condizioni ideali per il germe in esame.

Dopo l'uso, il TSLB provvede ad eliminare la sferetta in condizioni di sicurezza secondo le modalità consigliate per i materiali contaminati.

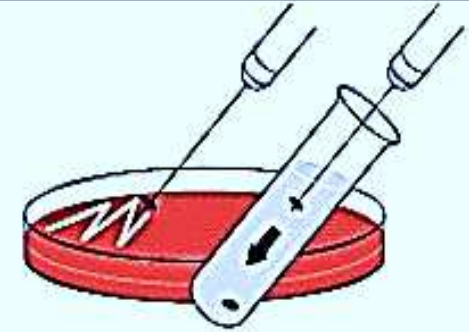
Al termine dell'operazione la provetta viene riposta quanto prima in congelatore, in quanto le altre sferette potranno essere utilizzate per ulteriori colture future.

## Controlli di qualità

Per poter validare una seduta di identificazione, il TSLB deve quotidianamente testare il ceppo ATCC *Escherichia coli* e confermarne l'identificazione con score superiore a 2.0. Tale procedura permette di validare l'intera seduta di identificazione batterica. Inoltre settimanalmente il TSLB è tenuto a calibrare lo strumento mediante apposita metodica di calibrazione automatica.



1. Remove cryovial from freezer and scan barcode. Aseptically remove a single bead with a sterile needle.



2. Streak the bead over surface of an appropriate solid medium or drop into a liquid medium. Incubate as required.

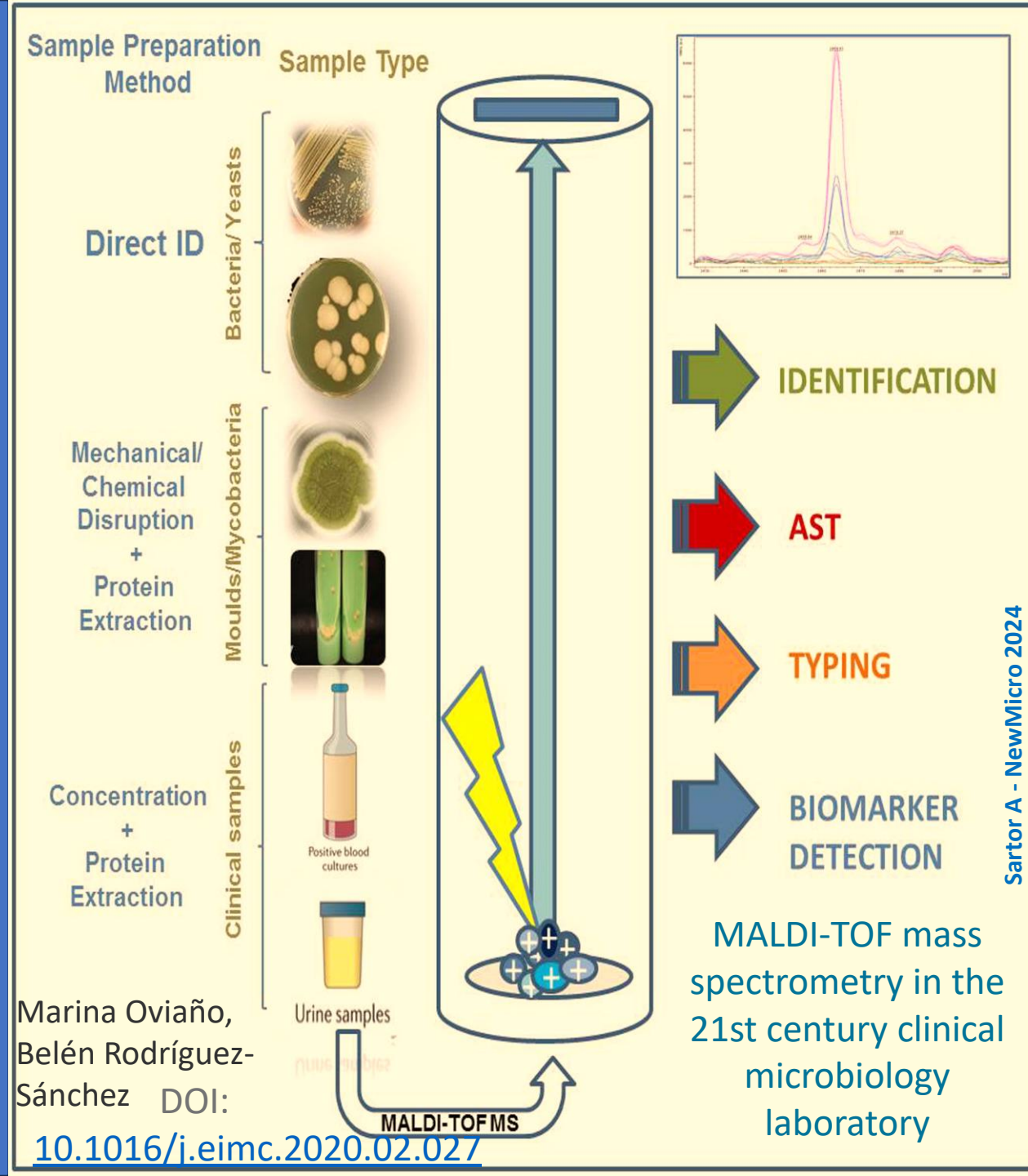
## Modalità di selezione

È fondamentale verificare la purezza e l'identità del ceppo prima di porre le colture in ceppoteca.

A tal proposito ciascun isolato viene preventivamente identificato mediante strumentazione Maldi-TOF.

# Identificazione: Maldi-TOF

Il MALDI-TOF (Fig.1), acronimo di “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight”, sfrutta la tecnica della spettrometria di massa; è infatti formato da una componente detta “sorgente” (MALDI), che genera gli analiti (molecole analizzate), e da una componente detta “analizzatore” (TOF), che elabora e confronta i dati prodotti dagli analiti. Per ottenere l’output di spettrometria di massa, sarà necessario un confronto tra i dati ottenuti sperimentalmente e i dati archiviati in banche dati specifiche (le cosiddette "librerie"), così da poter restituire dati di analisi con un grado variabile di affidabilità. La tecnica consiste nell'assorbire la colonia d’interesse (ottenuta tramite esame colturale classico, quindi isolata in piastra dopo opportuna semina) su di una matrice, la quale all’interno dello strumento, in presenza di condizioni di vuoto, viene irradiata con un fascio laser. Il risultato è la disgregazione del campione in numerosissimi frammenti, i quali vengono accelerati da un campo elettromagnetico adiacente e migrano fino a raggiungere una membrana analizzatrice. Il risultato in

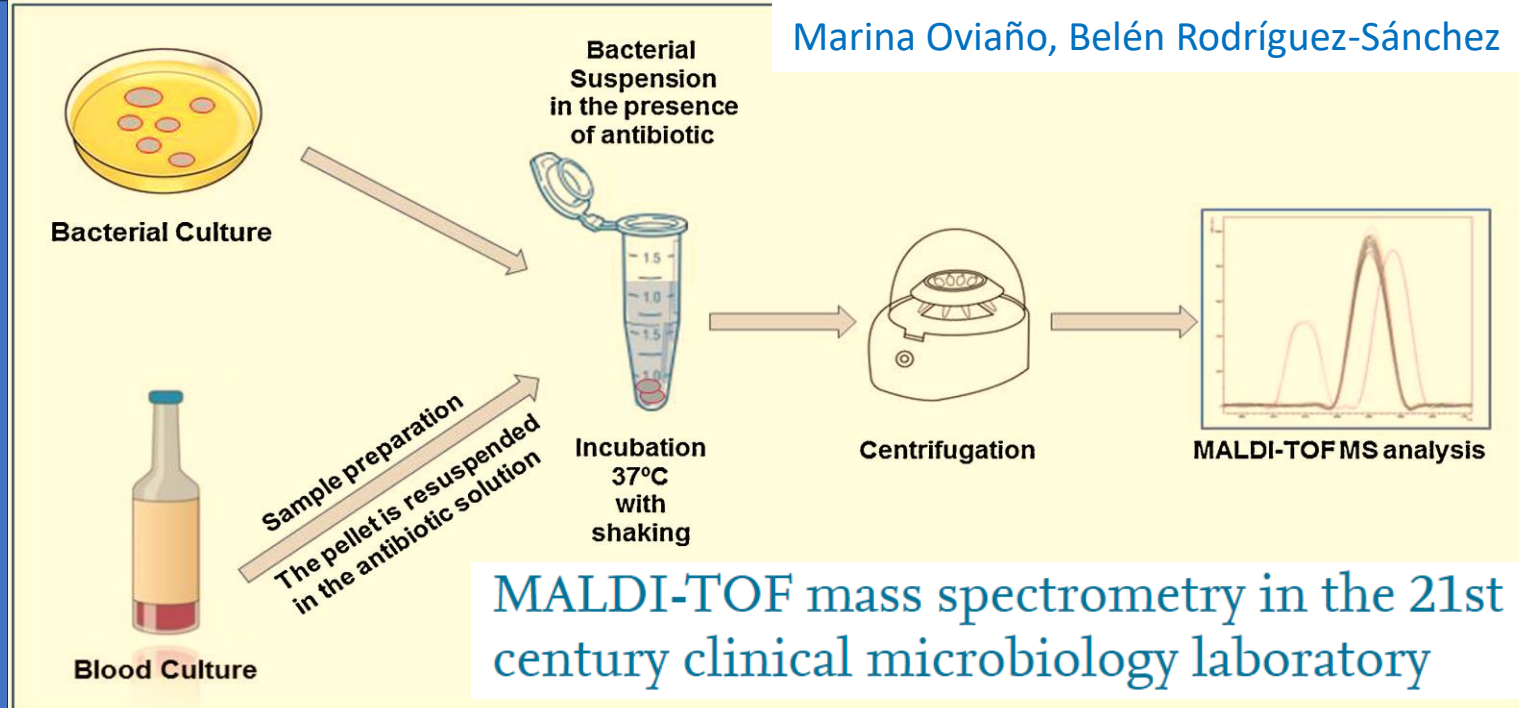




output di un biotipizzatore MALDI-TOF, è uno spettro relativo all'intensità rilevata (proporzionale al tempo di volo degli analiti) per unità del rapporto  $m/z$ , ovvero del rapporto tra la massa e la carica delle proteine (sotto forma di ioni) analizzate. La diversa composizione proteica dei differenti microrganismi permette la produzione di "cluster spettrali" associati e immagazzinati in un database. Lo spettro prodotto perciò verrà direttamente associato ad un microrganismo con un livello di affidabilità variabile. L'accuratezza percentuale con cui si raggiunge il risultato finale arriva fino al 99,9%.

Affinchè un identificazione sia valutata valida, deve raggiungere uno "score" uguale o superiore a 2.0.

## Identificazione: Maldi-TOF



### Direct identification of microorganisms from clinical samples using MALDI-TOF

Differential centrifugation	Short-incubation	Commercial kits
- 10 min centrifugation at 1000 rpm	- Add some drops from the blood culture broth	MBT SEPSITYPER, Bruker Daltonics
- Recover the supernatant	to a Columbia agar plate	
- 2 min centrifugation at 14,000 rpm	- Do not spread	VITEK® MS Blood Culture Kit, bioMérieux
- Transfer the pellet to the MALDI-target plate or submit it to protein extraction	- Incubate during 3–4 h at 36 °C	
	- Recover the microorganism from the plate and transfer it to the MALDI-target plate	Rapid BACpro® II Nittobo, Ltd.

# Tempistiche di conservazione

Il periodo di tempo specifico durante il quale una coltura rimarrà vitale in una data condizione di conservazione dipende in primis dal ceppo batterico stesso. La morte cellulare durante la conservazione è inevitabile, ma dovrebbe essere ridotta al minimo.

Le colture batteriche utilizzate regolarmente (cioè giornalmente/settimanalmente) possono essere conservate su piastre di agar o in colture stabili in frigorifero a 4°C.

Nel caso in cui si vogliano conservare i ceppi batterici nella ceppoteca aziendale, si utilizza preferenzialmente lo stoccaggio a -76°C in quanto il tempo ottimale di conservazione a questa temperatura si è dimostrato stimato in 5 anni.

I batteri esigenti devono necessariamente essere stoccati a temperatura -70°C, mentre gli altri batteri si è dimostrato resistano fino a 3 anni anche se stoccati a temperatura superiore (-20°C).

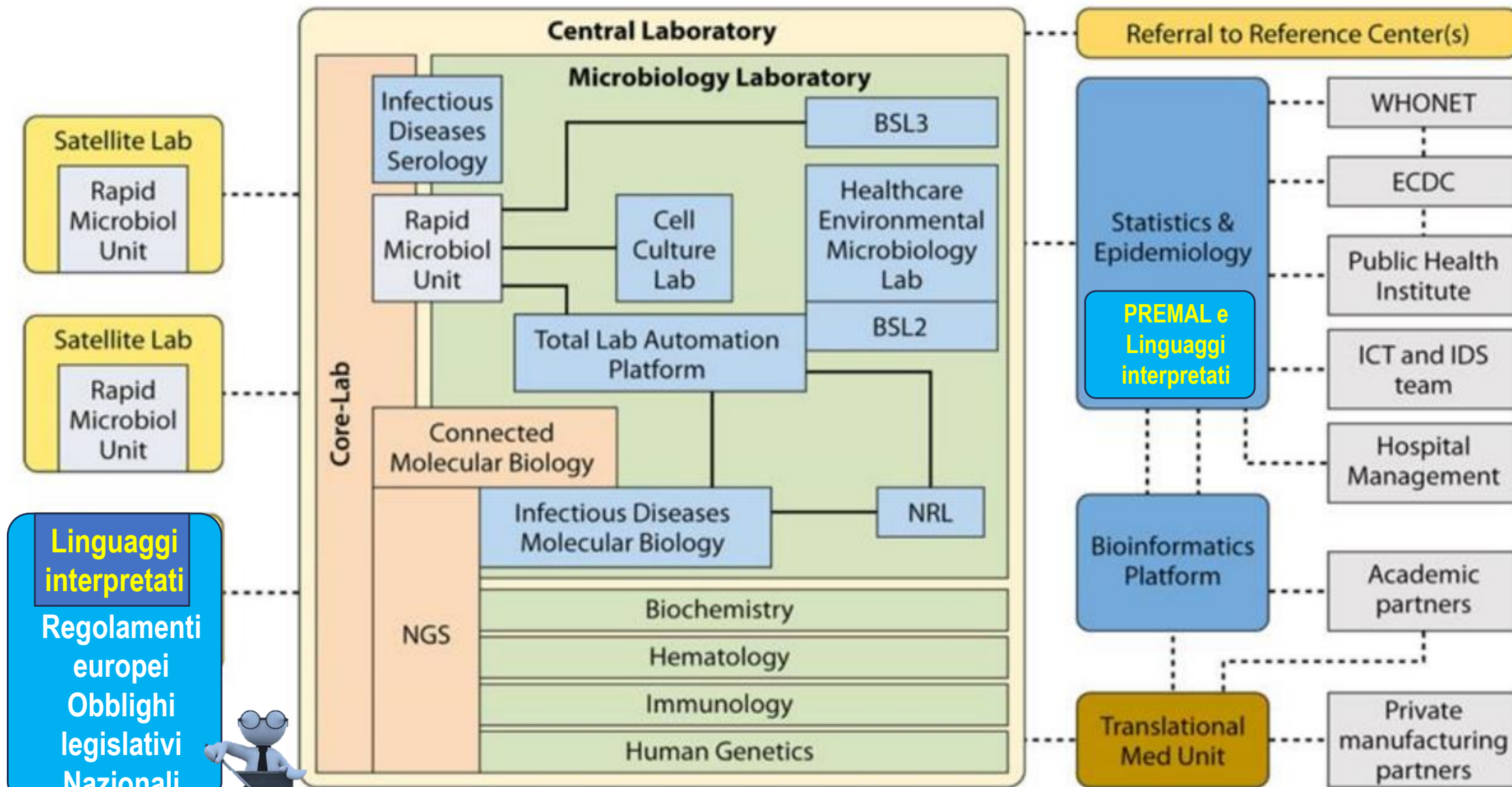
A tal proposito di consulti la tabella 1 dove sono riportate le tempistiche di vitalità generalizzate dei ceppi batterici nelle diverse temperature di conservazione.

I ceppi conservati nella nostra ceppoteca vengono stoccati nei congelatori a -76°C per permetterne una più lunga conservazione (a tal proposito si allega la Tabella 2, che dimostra i risultati sulla vitalità di diversi microrganismi stoccati mediante sistema CRYOBANK® nelle due diverse temperature di conservazione).

Dopo il periodo di conservazione raccomandato di cinque anni è cura del Tecnico di Laboratorio valutare la vitalità dei ceppi batterici stoccati, e, nel caso si voglia mantenere vitale per ulteriori anni il ceppo di interesse, provvedere ad una subcoltura e all'inoculo di una nuova provetta CRYOBANK®.

**Table 1. Approximate time bacterial cultures remain viable in different storage conditions.**

Condition	Temp (°C)	Time (approx.)
Agar plates	4	4 - 6 weeks
Stab cultures	4	3 weeks - 1 year
Standard freezer	-20	1 - 3 years
Super-cooled freezer	-80	1 - 10 years
Freeze dried	≤4	15 years+



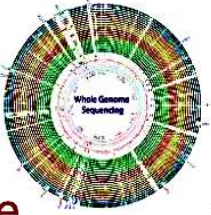
## PFGE = Pulse Field Gel Electrophoresis

- + Buona risoluzione
- + metodo basato su DNA
- + Economico
- Non rapido (fino ad 1 settimana)
- Difficoltà nella standardizzazione
- Non esistono sw per la interpretazione automatizzata



## WGS = Whole Genome Sequencing

- + Massima risoluzione
- + Permette analisi di resistenze
- Elevate competenze del laboratorio
- Elevate potenze di calcolo e competenze bioinformatiche
- Non rapido (almeno 1 settimana)
- Costoso
- Cut-offs non fissato



## MLST = Multi Locus Sequence Typing-PCR

- + Buona risoluzione
- + Sequenze basate su un database centralizzato
- + Buona riproducibilità
- Non rapido (più di un giorno)
- Tecnologie richieste non semplici (PCR e sequenziatore) -> costi elevati
- Non applicabile per tutte le specie, necessita di specifici geni MLST per ogni specie

Sartor A. - 2023

## IR Biotyper

- + Alta risoluzione
- + Facile da utilizzare
- + Risultati in tempo reale (< 3 h)
- + Sw completamente automatizzato
- + economico
- Necessità di standardizzare la coltura
- /+ Metodo fenotipico





# GRAZIE

**Assunta Sartor**

[assunta.sartor@asufc.sanita.fvg.it](mailto:assunta.sartor@asufc.sanita.fvg.it)



Responsabile SOC Microbiologia  
ASUFC - Udine

SIPMeL Gruppo di Studio  
«Management Sanitario»

