



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra



Dipartimento federale dell'interno DFI
Ufficio federale della sanità pubblica UFSP

Direttive per l'utilizzo e la sorveglianza degli Heater-Cooler Devices (HCD) in sala operatoria

Contenuto

1	L'essenziale in breve.....	4
2	Contesto	5
3	Direttive.....	6
3.1	Misure immediate per l'utilizzo degli HCD in sala operatoria.....	6
3.2	Pianificazione, documentazione e controllo qualità per la manutenzione e la sorveglianza degli HCD	6
3.3	Garanzia della tracciabilità	6
3.4	Monitoraggio microbiologico e follow-up.....	7
3.5	Accertamenti sulle misure operative e strutturali	7
4	Maggiori informazioni	8
5	Bibliografia.....	8
Allegato tecnico: Guida al monitoraggio microbiologico degli Heater-Cooler Devices (HCD)		
1	Aspetti generali	1
2	Fase pre-analitica	1
2.1	Materiale di prelievo idoneo al monitoraggio microbiologico.....	1
2.2	Raccomandazioni per il prelievo di campioni e la frequenza dei controlli per dispositivi con circuiti d'acqua in spazi critici in termini di igiene (sale operatorie, terapia intensiva).....	2
2.3	Prelievo di campioni	2
2.3.1	Prelievo di campioni d'acqua da 50 ml.....	2
2.3.2	Prelievo di campioni d'acqua da 1 litro (sensibilità più elevata).....	3
2.3.3	Prelievo di strisci delle superfici	3
2.3.4	Prelievo di campioni d'aria	3
3	Elaborazione dei campioni per la ricerca del <i>M. chimaera</i> in laboratorio	3
3.1	Esecuzione di prelievi d'acqua da 50 ml.....	3
3.2	Esecuzione di prelievi d'acqua da 1 l.....	4
3.3	Esecuzione degli strisci	4
3.4	Esecuzione di piastre di raccolta aria	5
3.5	Ulteriore procedura e stesura di un rapporto.....	5
3.5.1	Terreni di coltura contaminati da colonie batteriche (MGIT oppure agar Middlebrook 7H11)	5
3.5.2	Nessuna crescita di micobatteri dopo 7 settimane.....	6
4	Rilevazione di legionelle	6
4.1	Fase pre-analitica	6

Direttive per l'uso e la sorveglianza degli Heater-Cooler Devices (HCD) in sala operatoria

4.2	Esecuzione in laboratorio	6
5	Analisi della carica batterica totale nei campioni d'acqua	6
5.1	Fase pre-analitica	7
5.2	Esecuzione in laboratorio	7
6	Maggiori informazioni	8
7	Bibliografia.....	8

1 L'essenziale in breve

L'Ufficio federale della sanità pubblica e l'Istituto svizzero per gli agenti terapeutici Swissmedic emanano le seguenti direttive secondo le raccomandazioni della task-force svizzera *Mycobacterium chimaera*.¹

1. Tutti gli Heater-Cooler Devices (HCD)², ossia i dispositivi di riscaldamento/raffreddamento che regolano la temperatura della circolazione extracorporea, devono essere utilizzati in modo tale che l'aria nelle sale operatorie non venga contaminata dagli aerosol generati durante il funzionamento dei dispositivi stessi.
2. Gli HCD mobili possono essere utilizzati in sala operatoria soltanto se il monitoraggio microbiologico mensile dell'acqua presente nei dispositivi conferma l'assenza di *M. chimaera*, *Pseudomonas* e legionelle. Informazioni dettagliate sul monitoraggio microbiologico sono riportate nell'allegato tecnico. Sono esclusi da queste misure i modelli di HCD con un sistema di circolazione dell'acqua a tenuta d'aria o che funzionano senza acqua.
3. Occorre accertare se si possono adottare misure operative o strutturali per evitare il rischio microbiologico associato all'impiego di HCD, installandoli ad esempio in un locale adiacente alla sala operatoria.
4. Occorre altresì attenersi a istruzioni per l'uso dei fabbricanti aggiornate di HCD nonché alle istruzioni contenute nella presente direttiva a titolo integrativo.
5. L'impiego e la manutenzione degli HCD devono essere definiti in un apposito documento (Standard Operating Procedure).
6. Per garantire la tracciabilità, è necessario garantire una documentazione aggiornata e accessibile su manutenzione e sorveglianza (controllo qualità) degli HCD nonché sul loro utilizzo con i pazienti.
7. In caso di utilizzo di HCD in altre situazioni (ad esempio in terapia intensiva), la valutazione del rischio compete all'ospedale.

¹Erik C. Böttger, Zurigo; Florian Banderet-Uglicioni, Basilea; Simon Costabile, Zurigo; Samuel Erny, Berna; Céline Gardiol, Berna; Achim Häussler, Zurigo; Peter Keller, Zurigo; Daniel Koch, Berna; Virginie Masserey, Berna; Rafael Moreno, Berna; Hugo Sax, Zurigo; Matthias Schlegel, San Gallo; Bettina Schulthess, Zurigo; Rami Sommerstein, Berna; Thomas Suter, Berna; Markus Wälti, Berna; Andreas Widmer, Basilea

²Sinonimo: Heater-Cooler Units (HCU)

2 Contesto

Nel luglio 2014, l'Ufficio federale della sanità pubblica (UFSP), insieme a Swissmedic, ha informato l'opinione pubblica di casi isolati di infezioni causate dall'agente patogeno *Mycobacterium chimaera* e intervenute a seguito di operazioni a cuore aperto con impianto di dispositivi cardiaci (1). Questo batterio, classificato tra i micobatteri non tubercolari (NTM), è ampiamente diffuso nell'ecosistema, anche nell'acqua potabile. In precedenza il *M. chimaera* era noto solo come agente patogeno di rari casi di pneumonia in pazienti affetti da patologie polmonari croniche.

Da allora il batterio è stato riscontrato in Svizzera in dieci pazienti con sintomi clinici di infezione cronica sistemica che avevano subito in precedenza un'operazione a cuore aperto con posa di impianto (ad es. impianto valvolare o protesi dell'aorta). Gli interventi chirurgici corrispondenti risalivano in media a due anni prima ed erano stati eseguiti utilizzando dispositivi di ipotermia o Heater-Cooler-Devices (HCD) della società Sorin (ora LivaNova) di tipo 3T (2,3,4).

Accertamenti più approfonditi hanno dimostrato che, al momento delle operazioni, gli HCD 3T della Sorin erano contaminati microbiologicamente. Le colture microbiologiche realizzate sui pazienti e sull'acqua dei circuiti di cardioplegia dei dispositivi erano risultate positive al batterio *M. chimaera*. È stato dimostrato che, durante l'impiego di HCD contaminati, il loro sistema di scarico dell'aria aveva diffuso nell'ambiente aerosol contaminati dai batteri *M. chimaera* in grado di moltiplicarsi (3). A livello internazionale sono stati riscontrati 70 casi di pazienti che hanno contratto un'infezione causata da *M. chimaera* dopo un intervento a cuore aperto o cardio-vascolare in cui era stato utilizzato un dispositivo Sorin/LivaNova 3T (aggiornamento: dicembre 2016). Sulla base del numero di operazioni cardiovascolari eseguite con il tipo di HCD in questione, negli ospedali in cui sono stati registrati questi casi il rischio di contrarre un'infezione causata da *M. chimaera* si situa tra 1:100 e 1:1000 pazienti (5).

In casi isolati, anche i campioni d'acqua prelevati da HCD di altri fabbricanti sono risultati positivi ai batteri *M. chimaera*. A oggi non sono stati pubblicati studi scientifici riguardanti campioni d'aria positivi di HCD contaminati prodotti da altri fabbricanti né sono stati pubblicati casi di infezioni comprovate da *M. chimaera* riscontrate dopo operazioni in cui sono stati impiegati HCD prodotti da altri fabbricanti.

Il fabbricante dei dispositivi in questione e le autorità preposte alla sanità a livello mondiale, compresi lo European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), la statunitense Food and Drug Administration (FDA) e i Centers for Disease Control and Prevention (CDC), hanno diffuso messaggi di allerta con la raccomandazione urgente di rispettare le istruzioni aggiornate del fabbricante in materia di manutenzione e utilizzo dei dispositivi (5,6,7).

Allo stato attuale delle conoscenze, a causa della formazione di un biofilm non è possibile sterilizzare in modo definitivo gli HCD contaminati da *M. chimaera* (8). Se si prevede di continuare a impiegare dispositivi precedentemente contaminati, oltre alla manutenzione periodica con ricambio dell'acqua e disinfezione secondo le istruzioni del fabbricante, si raccomanda una sorveglianza microbiologica dei dispositivi (serbatoi dell'acqua) e dell'ambiente circostante mediante campionamenti di acqua e aria.

Data la difficoltà nel curare queste infezioni e tenendo conto del fatto che le stesse sono state riscontrate soltanto dopo un periodo di latenza da uno a cinque anni, la priorità assoluta consiste nel prevenire nuovi contagi. Le seguenti direttive si rivolgono quindi agli ospedali che utilizzano HCD in sala operatoria e in particolare ai cardiotecnici responsabili dell'impiego e della manutenzione di questi dispositivi.

3 Direttive

3.1 Misure immediate per l'utilizzo degli HCD in sala operatoria

- È necessario assicurarsi di avere a disposizione le istruzioni del fabbricante aggiornate per l'utilizzo, la regolare pulizia, disinfezione e manutenzione dei propri HCD. Dette istruzioni, che riguardano i dispositivi di tutti i fabbricanti, devono essere rispettate da subito e in modo imperativo; esse sono particolarmente importanti se si utilizzano dispositivi 3T Sorin (LivaNova).
- Mettere immediatamente fuori servizio qualsiasi HCD, indipendentemente dal fabbricante, qualora l'acqua utilizzata presenti colorazioni visibili (simili alla presenza di alghe) o intorbidimenti, due indizi di crescita batterica. Consultare il servizio di igiene ospedaliera e il rappresentante del fabbricante per definire le misure indispensabili da adottare prima di un'eventuale rimessa in funzione del dispositivo.
- Mettere immediatamente fuori servizio gli HCD che in passato sono risultati positivi al *M. chimaera* e per i quali non sono disponibili risultati di laboratorio di campionamenti dell'aria che dimostrino l'assenza di micobatteri (si veda anche l'Allegato tecnico).
- Posizionare gli HCD in modo tale che gli scarichi delle ventole siano diretti lontano dal campo chirurgico per ridurre il rischio eventuale che l'acqua fuoriesca dal dispositivo in forma di aerosol, raggiungendo il campo sterile ed esponendo il paziente a un rischio elevato di infezione.
- Non utilizzare acqua potabile non filtrata per lavare, riempire o rialimentare gli HCD, ma utilizzare esclusivamente acqua potabile sterilizzata o acqua potabile prefiltrata con un filtro con diametro dei pori < 0.22 µm. L'acqua deionizzata e l'acqua sterilizzata ottenuta tramite osmosi inversa sono sconsigliate poiché possono favorire la corrosione all'interno dei sistemi.
- Non aprire il coperchio dei serbatoi d'acqua degli HCD poiché si potrebbero contaminare gli apparecchi, ad es. con batteri presenti nell'ambiente.

3.2 Pianificazione, documentazione e controllo qualità per la manutenzione e la sorveglianza degli HCD

- D'intesa con il servizio di igiene ospedaliera locale, allestire un piano e un documento procedurale (Standard Operating Procedure, SOP) per la regolare pulizia, disinfezione e manutenzione degli HCD.
- Introdurre un programma di controllo qualità per queste procedure di manutenzione. Le fasi di pulizia, disinfezione e manutenzione devono essere documentate specificando il o i soggetti che le hanno eseguite.

3.3 Garanzia della tracciabilità

- Introdurre un sistema che consenta di identificare precisamente, per ogni paziente, l'HCD utilizzato durante l'operazione, menzionando ad esempio il numero di serie del dispositivo nella documentazione medica dell'intervento. Questa procedura può, all'occorrenza, servire ai fini della tracciabilità (traceability).

3.4 Monitoraggio microbiologico e follow-up

- Introdurre un monitoraggio microbiologico per gli HCD di **qualsiasi** fabbricante contenenti acqua e impiegati in sala operatoria che non dispongano di un sistema di scarico a tenuta d'aria. In tal senso, si prega di osservare le raccomandazioni sul monitoraggio microbiologico degli HCD riportate nell'Allegato tecnico della presente direttiva.
- Fino a nuovo ordine, prelevare almeno una volta al mese campioni d'acqua dagli HCD per verificare la presenza di micobatteri, legionelle e carica batterica totale. In caso di risultato positivo, eseguire accertamenti microbiologici più approfonditi (campionamenti dell'aria durante il funzionamento, strisci delle superfici).
- Gli HCD che in passato sono risultati positivi al batterio *M. chimaera* e che non hanno potuto essere decontaminati seguendo le istruzioni di pulizia del fabbricante (7) devono essere sostituiti da HCD non contaminati.
- Nel contesto della problematica attuale, qualsiasi riscontro di micobatteri non tubercolari, legionelle o altri bacilli gram negativi non fermentanti nell'acqua di HCD sono importanti dal punto di vista dell'igiene ospedaliera e devono essere segnalati immediatamente ai collaboratori responsabili del servizio di igiene ospedaliera della struttura in questione.
- Per stimare il rischio microbiologico, i risultati delle analisi mensili dell'acqua presente negli HCD devono essere valutati in correlazione con i risultati dei campionamenti dell'aria e delle analisi relative agli strisci delle superfici.
- Allo stato attuale delle conoscenze, non è sicuro continuare a usare in sala operatoria un HCD contaminato da *M. chimaera* durante il funzionamento del quale sono risultati positivi anche i campionamenti dell'aria. Il dispositivo in questione dovrebbe essere immediatamente messo fuori servizio e, dopo aver consultato il fabbricante, essere sottoposto a manutenzione e disinfezione conformemente alle sue raccomandazioni. Se i campionamenti dell'aria e gli strisci delle superfici ambientali risultano negativi, il servizio di igiene ospedaliera responsabile può valutare come più basso il rischio microbiologico e decidere eventualmente, d'intesa con i settori competenti, di mantenere l'HCD contaminato in funzione.
- Le colture microbiologiche di sorveglianza dovrebbero essere eseguite tutti i mesi anche se i risultati delle analisi confermassero a più riprese l'assenza del *M. chimaera*, poiché non è possibile escludere un'eventuale contaminazione del dispositivo durante la sostituzione dell'acqua.
- La responsabilità delle analisi spetta al servizio di igiene ospedaliera dell'istituto in questione che deve anche organizzarle, garantirne la documentazione ai fini della tracciabilità e adottare eventuali misure di follow-up secondo le presenti direttive.

3.5 Accertamenti sulle misure operative e strutturali

- Determinare se è possibile adottare misure operative o strutturali atte a ridurre il rischio microbiologico associato agli HCD. A seconda della valutazione dei rischi, gli HCD che contengono acqua possono essere impiegati in un locale diverso dalla sala operatoria. In tal caso, tenere conto delle indicazioni del fabbricante sulla lunghezza massima dei tubi e chiarire con il fabbricante se è tecnicamente possibile usare un dispositivo installato in un locale adiacente alla sala operatoria senza supervisione visiva diretta.

- All'acquisto o sostituzione di HCD, tenere in considerazione tutte le indicazioni tecniche disponibili e scegliere i dispositivi che meno possono influenzare il flusso dell'aria nell'ambiente di funzionamento. Rispettare le istruzioni del fabbricante riguardanti manutenzione e pulizia.

4 Maggiori informazioni

Ufficio federale della sanità pubblica

Ufficio federale della sanità pubblica
UFSP Divisione Malattie trasmissibili
Tel. +41 (0)58 463 87 06
epi@bag.admin.ch

Swissmedic

Istituto svizzero per gli agenti terapeutici
Swissmedic Divisione Dispositivi medici
Tel. +41 (0)58 462 02 23
questions.devices@swissmedic.ch

5 Bibliografia

1. Ufficio federale della sanità pubblica. Comunicato stampa del 14.7.2014. Misure per una maggiore sicurezza dei pazienti in cardiocirurgia. <https://https://www.admin.ch/gov/it/pagina-iniziale/documentazione/comunicati-stampa.msg-id-53774.html>
2. Kohler, P., S. P. Kuster, G. Bloemberg, B. Schulthess, M. Frank, F. C. Tanner, M. Rössle, C. Böni, V. Falk, M. J. Wilhelm, R. Sommerstein, Y. Achermann, J. Ten Oever, S. B. Debast, M. J. Wolfhagen, G. J. Brandon Bravo Bruinsma, M. C. Vos, A. Bogers, A. Serr, F. Beyersdorf, H. Sax, E. C. Böttger, R. Weber, J. van Ingen, D. Wagner, and B. Hasse. 2015. Healthcare-associated prosthetic heart valve, aortic vascular graft, and disseminated *Mycobacterium chimaera* infections subsequent to open heart surgery. *European Heart Journal* **36**:2745-2753.
3. Sax, H., G. Bloemberg, B. Hasse, R. Sommerstein, P. Kohler, Y. Achermann, M. Rössle, V. Falk, S. P. Kuster, E. C. Böttger, and R. Weber. 2015. Prolonged Outbreak of *Mycobacterium chimaera* Infection After Open-Chest Heart Surgery. *Clinical Infectious Diseases* **61**:67-75.
4. Sommerstein, R., C. Rüegg, P. Kohler, G. Bloemberg, S. P. Kuster, and H. Sax. 2016. Transmission of *Mycobacterium chimaera* from Heater-Cooler Units during Cardiac Surgery despite an Ultraclean Air Ventilation System. *Emerging Infectious Diseases* **22**:1008-1013.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Health Alert Network. 13 ottobre 2016. CDC Advises Hospitals to Alert Patients at Risk from Contaminated Heater-Cooler Devices Used during Cardiac Surgery. <https://emergency.cdc.gov/han/han00397.asp>
6. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 21 novembre 2016. Rapid risk assessment: Invasive cardiovascular infection by *Mycobacterium chimaera* associated with the 3T heater-cooler system used during open-heart surgery. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/RRA-mycobacterium-chimaera-November-2016.pdf>
7. United States Food and Drug Administration (U.S. FDA). 13 ottobre 2016. UPDATE: *Mycobacterium chimaera* Infections Associated with LivaNova PLC (formerly Sorin Group Deutschland GmbH) Stöckert 3T Heater-Cooler System: FDA Safety Communication. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/ucm520191.htm>
8. Schreiber, P. W., S. P. Kuster, B. Hasse, C. Bayard, C. Rüegg, P. Kohler, P. M. Keller, G. V. Bloemberg, F. Maisano, D. Bettex, M. Halbe, R. Sommerstein, and H. Sax. 2016. Reemergence of *Mycobacterium chimaera* in Heater-Cooler Units despite Intensified Cleaning and Disinfection Protocol. *Emerging Infectious Diseases* **22**:1830-1833.

Allegato tecnico

Guida al monitoraggio microbiologico degli Heater-Cooler Devices (HCD)

1 Aspetti generali

La presente guida funge da allegato tecnico alle «Direttive per l'utilizzo e la sorveglianza degli Heater-Cooler Devices (HCD) in sala operatoria». Le procedure descritte di seguito servono a rilevare i micobatteri non tubercolari a crescita lenta, in particolare il *M. chimaera*. I micobatteri a crescita rapida presenti nei campioni ambientali sono generalmente inoffensivi.

In questa sede vengono descritti anche i metodi microbiologici per individuare le legionelle e determinare la carica batterica totale presente nell'acqua. Analisi approfondite condotte su campioni d'acqua provenienti da HCD hanno infatti dimostrato che i dispositivi possono essere contaminati microbiologicamente da agenti patogeni diversi dai micobatteri.

Le procedure citate per i micobatteri sono state sviluppate e valutate al Centro nazionale per i micobatteri (NZM, Università di Zurigo, Istituto di microbiologia medica) in collaborazione con il servizio di igiene ospedaliera dell'Ospedale universitario di Zurigo e altri partner internazionali (tra cui i laboratori di riferimento in materia di micobatteri di Paesi Bassi e Germania). Questi metodi sono stati pubblicati nella letteratura specializzata (1, 3-6). Le procedure per rilevare le legionelle e determinare la carica batterica totale si basano sulle misure applicabili per l'acqua potabile definite nell'Ordinanza sui requisiti igienici (ORI; RS 817.024.1).

I laboratori esperti possono applicare metodi di rilevazione diversi da quelli riportati di seguito. Se si applicano metodi e terreni di coltura alternativi (ad es. i terreni Löwenstein-Jensen anziché i terreni Middlebrook di cui sotto), è auspicabile eseguire esperimenti di validazione in via preliminare per determinare la sensibilità analitica.

Le analisi devono essere condotte in un laboratorio dotato di un sistema di gestione della qualità (laboratorio accreditato). Il laboratorio deve avere esperienza nelle analisi di campioni ambientali e gli esami condotti su questi campioni devono rientrare nell'ambito delle attività soggette a un controllo qualità.

2 Fase pre-analitica

2.1 Materiale di prelievo idoneo al monitoraggio microbiologico

- Campione d'acqua in recipiente sterile (ad es. provetta TTP 50 ml), volume 50 ml
- Membrana filtrante in nitrato di cellulosa con diametro dei pori di 0,45 µm (ad es. ditta Sartorius, codice ordine: 13806- 50-ACN) dopo filtrazione di un campione d'acqua da 1 litro secondo SN EN ISO 11731-2:2008
- Strisci delle superfici in recipiente sterile (ad es. provetta TTP 50 ml)
- Campionatore piastra agar Middlebrook 7H10 da 90 mm dopo raccolta dell'aria

2.2 Raccomandazioni per il prelievo di campioni e la frequenza dei controlli per dispositivi con circuiti d'acqua in spazi critici in termini di igiene (sale operatorie, terapia intensiva)

Di seguito sono riportate nel dettaglio le misure della fase pre-analitica per i vari campioni ambientali.

- Regola generale valida per tutte le analisi di campioni ambientali: il momento più propizio per eseguire l'analisi dipende dal problema da affrontare, di regola è auspicabile scegliere il momento il cui il rischio è al suo massimo livello (= prima della disinfezione periodica o della sostituzione dell'acqua; per i campioni d'aria, durante il funzionamento degli HCD).
- Trasporto dei campioni: il più rapidamente possibile al laboratorio (entro 24 ore al massimo dal prelievo).
- Allegare il modulo di richiesta di analisi per il laboratorio debitamente compilato.
- Conservare i campioni il più possibile al fresco.

2.3 Prelievo di campioni

2.3.1 Prelievo di campioni d'acqua da 50 ml

- Controllare una volta al mese i dispositivi con circuito d'acqua impiegati in spazi critici dal punto di vista dell'igiene (sale operatorie, terapia intensiva).
- Eseguire le analisi prima delle misure periodiche di manutenzione/disinfezione prescritte dal fabbricante.
- Documentare la definizione e la posizione dei punti di prelievo (ev. con un disegno delle installazioni), specificando anche il nome e la qualifica dello specialista che ha eseguito tale definizione (ad es. collaboratore del reparto cardiotecnica).
- Ai fini delle analisi, contrassegnare con precisione i punti di prelievo per evitare qualsiasi confusione.
- Testare singolarmente gli elementi del dispositivo con circuito d'acqua tecnicamente separati (ad es. circuito cardio-vascolare del paziente, circuito cardioplegico degli HCD).
- Prima di procedere con i prelievi, etichettare in modo chiaro gli elementi del dispositivo e i contenitori dei campioni.
- I contenitori dei campioni devono essere sterili all'interno e a tenuta d'acqua (trasporto in tutta sicurezza).
- Per i campioni d'acqua, la quantità minima da prelevare è di 50 ml.
- Documentare il momento, la modalità e i risultati delle analisi dei campioni in modo tale da garantirne la tracciabilità.

La documentazione dei campioni a disposizione del laboratorio e del servizio di igiene ospedaliera competente dovrebbe comprendere le seguenti indicazioni (disponibili sul consueto modulo di domanda al laboratorio):

- nome, indirizzo e numero di telefono del committente
- nome e indirizzo dell'oggetto/dispositivo e della sede
- nome completo del responsabile del campionamento (se possibile in stampatello)
- data e ora in cui è stato prelevato il campione
- descrizione precisa dei punti di prelievo sottoposti a campionamento.

2.3.2 Prelievo di campioni d'acqua da 1 litro (sensibilità più elevata)

Procedura analoga; utilizzare recipienti sterili da 1 litro.

2.3.3 Prelievo di strisci delle superfici

Se gli HCD la cui contaminazione da *M. chimaera* è stata dimostrata continuano a essere utilizzati, si possono prelevare strisci dalle superfici nell'ambiente circostante (stesso locale, sede di funzionamento dell'apparecchio) mentre il dispositivo è in uso per valutare il rischio microbiologico.

Gli strisci superficiali devono essere eseguiti con un apposito tampone imbevuto di NaCl 0,9% su una superficie di 10x10 cm.

Per la documentazione e la domanda di analisi al laboratorio, procedere come per i campioni d'acqua.

2.3.4 Prelievo di campioni d'aria

Se gli HCD la cui contaminazione da *M. chimaera* è stata dimostrata continuano a essere utilizzati, si possono prelevare campioni dell'aria nell'ambiente circostante (stesso locale, sede di funzionamento dell'apparecchio) mentre il dispositivo è in uso per valutare il rischio microbiologico.

A seconda della modalità costruttiva degli HCD, il loro funzionamento e la direzione in cui viene espulsa l'aria fredda del sistema di raffreddamento possono influenzare la potenziale contaminazione dell'aria attorno ai dispositivi. I campioni d'aria dovrebbero essere prelevati vicino e nella direzione dello scarico dell'aria degli HCD monitorati.

I campioni d'aria vengono raccolti con un campionatore microbiologico d'aria (ad es. MAS-100 NT; MBV, Stäfa, Svizzera), con le seguenti impostazioni di raccolta:

- durata della raccolta: 2,5 min
- flusso d'aria: 100 l/min
- totale volume aria raccolta: 250 l
- mezzo di campionamento: piastre agar Middlebrook 7H11 da 90 mm

Per la documentazione e la domanda di analisi al laboratorio, procedere come per i campioni d'acqua.

3 Elaborazione dei campioni per la ricerca del *M. chimaera* in laboratorio

3.1 Esecuzione di prelievi d'acqua da 50 ml

1. Centrifugare il campione (3'300 x g, 15 minuti, temperatura ambiente) e decantare fino a circa 5 ml.
2. Aggiungere 5 ml di soluzione di decontaminazione (kit MycoPrep della ditta BD codice ordine: 240862).
3. Agitare bene (vortexare) e capovolgere due volte le provette
Attenzione: agitando in modo troppo energico si ossida e si rende inattivo il NALC presente nella soluzione di decontaminazione!
4. Successivamente, far riposare i campioni per 15 minuti a temperatura ambiente.
5. Con 30 ml di tampone fosfato (fornito in polvere e da ricostituire nel kit MycoPrep della ditta BD) riempire fino a 40 ml (per campioni da 20 ml, riempire fino a 50 ml), richiudere le provette e capovolgere più volte manualmente ogni provetta.
6. Centrifugare (3'300 x g, 15 minuti, temperatura ambiente).

7. Decantare con cautela il surnatante nella soluzione disinfettante.
8. Per evitare qualsiasi contaminazione, pulire il bordo con un tampone intriso di alcool etilico al 70% (V/V).
9. Rimettere in sospensione il sedimento in 2 ml di tampone fosfato, agitare bene (vortexare).
10. Trasferire 0,5 ml di questa preparazione in un MGIT e inoculare 0,25 ml sulla piastra agar Middlebrook 7H11.
11. Incubare le piastre per 7 settimane a 37 °C sotto 5-10% CO₂.
12. Conservare il materiale rimanente come campione di riserva a +4 °C fino all'ottenimento del risultato finale delle analisi.

3.2 Esecuzione di prelievi d'acqua da 1 l

Strumenti necessari:

- pompa a vuoto Sartorius codice art. SM 16692
- beuta da vuoto 2 litri Sartorius codice art. SM 16672
- dispositivo per filtrazione sotto vuoto Sartorius codice art. SM 16201
- bottiglia di Woulff Sartorius codice art. SM 16610

Esecuzione pratica:

1. filtrare il campione d'acqua (1 litro) attraverso una membrana filtrante in nitrato di cellulosa con diametro dei pori di 0,45 µm (ditta Sartorius codice ordine: 13806-50-ACN).
2. Posizionare la membrana filtrante su piastre agar Middlebrook 7H10 da 90 mm e premere leggermente. Le piastre vengono incubate per 7 settimane a 37 °C sotto 5-10% CO₂.
3. Controllare la crescita 1x a settimana.

Per i campioni d'acqua provenienti da dispositivi che, stando alle analisi iniziali, presentano una contaminazione polimicrobica, potrebbe essere necessaria una decontaminazione preliminare della membrana filtrante:

1. trasferire la membrana filtrante in una provetta sterile (ditta TTP, 50 ml).
2. Aggiungere circa 7 ml di soluzione di decontaminazione (kit MycoPrep della ditta BD codice ordine: 240862) e trattare la provetta in un bagno a ultrasuoni per 1 minuto a 50-60 kHz.
3. Lasciare per 20 minuti sull'agitatore-incubatore, poi rimuovere la membrana filtrante.
4. Per la neutralizzazione, aggiungere circa 7 ml di tampone fosfato.
5. Centrifugare (3'300 x g, 15 minuti, temperatura ambiente).
6. Eliminare il surnatante, rimettere in sospensione il sedimento in 2 ml di tampone fosfato dopodiché inocularne 0,25 ml in un terreno di coltura solido e 0,5 ml in un terreno di coltura liquido (terreno liquido MGIT con PANTA e supplemento di crescita).
7. Incubare i terreni di coltura per 7 settimane a 37 °C.

3.3 Esecuzione degli strisci

1. Trasferire lo striscio in una provetta da 50 ml e riempirla con 5 ml di acqua sterile.
2. Aggiungere 5 ml di soluzione di decontaminazione (kit MycoPrep della ditta BD codice ordine: 240862).
3. Agitare bene (vortexare) e capovolgere due volte la provetta.
4. Successivamente, far riposare i campioni per 15 minuti a temperatura ambiente.
5. Riempire con 30 ml di tampone fosfato fino a 40 ml, a questo punto rimuovere il tampone dello striscio. Richiudere le provette e capovolgere più volte manualmente ogni provetta.

6. Centrifugare (3'300 x g, 15 minuti, temperatura ambiente).
7. Decantare con cautela il surnatante nella soluzione disinfettante.
8. Per evitare qualsiasi contaminazione, pulire il bordo con un tampone intriso di alcool etilico al 70% (V/V).
9. Rimettere in sospensione il sedimento in 2 ml di tampone fosfato, agitare bene (vortexare).
10. Trasferire 0,5 ml di questa preparazione in un MGIT e inoculare 0,25 ml sulla piastra agar Middlebrook 7H11.
11. Incubare le piastre per 7 settimane a 37 °C sotto 5-10% CO₂.
12. Conservare il materiale rimanente come campione di riserva a +4 °C fino all'ottenimento del risultato finale delle analisi.

3.4 Esecuzione di piastre di raccolta aria

Incubare le piastre per 7 settimane a 37 °C sotto 5-10% CO₂.

Controllare la crescita 1x a settimana.

3.5 Ulteriore procedura e stesura di un rapporto

3.5.1 Terreni di coltura contaminati da colonie batteriche (MGIT oppure agar Middlebrook 7H11)

1. Eseguire la colorazione di Ziehl-Neelsen sulla colonia o sul materiale di coltura MGIT.
2. In presenza di bacilli acido resistenti, preparare una sospensione delle colonie in 3 ml di NaCl 0,9%.
3. Utilizzare 0,5 ml delle colonie in sospensione per l'identificazione molecolare, l'estrazione del DNA con l'InstaGene Matrix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) secondo le istruzioni del fabbricante.
4. Attuare una procedura di identificazione molecolare per determinare la specie; ad es. il protocollo «RealTime-16S-rDNA-PCR» con una sonda 16S-rRNA per micobatteri, seguito dal sequenziamento dell'amplificato (1, 2). Analizzare l'emologia della sequenza 16S-rDNA con l'ausilio di una banca dati (ad es. SmartGene IDNS 16S rDNA Database; SmartGene AG, Zugo oppure NCBI GenBank). Un solo nucleotide differenzia la sequenza 16S-rDNA del *M. chimaera* da quella del *M. intracellulare*, consentendo di distinguere le due specie (7). Alternative:
 - a. sistemi commerciali d'identificazione di biologia molecolare per micobatteri non tubercolari (AID Autoimmun Diagnostika GmbH Mykobakterien Line Blot oppure HAIN GenoType Mycobacterium AS). **Attenzione:** i Line Blot attualmente disponibili in commercio identificano erroneamente il *M. chimaera* come un *M. intracellulare*. Su richiesta, il Centro nazionale per i micobatteri può identificare le specie.
 - b. Identificazione MALDI-TOF MS: Bruker Daltonic MALDI Biotyper 3.1 Software, protocollo MALDI secondo A.B. Prana et al. (apranada@labmed.de).
5. Conservare la sospensione di coltura a 4 °C fino all'identificazione della specie.
6. Utilizzare 0,5 ml della sospensione di coltura 0,9% NaCl per inoculare una provetta MGIT con supplemento di crescita e 0,25 ml per inoculare una piastra agar Middlebrook 7H11 per la raccolta di staminali.
7. In caso di MGIT positivo, eseguire un esame microscopico Ziehl-Neelsen del materiale di coltura, inoculare 0,25 ml del terreno MGIT positivo su agar cioccolato per escludere contaminanti a crescita rapida.
8. Conservare il MGIT positivo fino a raccolta di staminali eseguita.
9. Redigere un rapporto sui micobatteri identificati e inviarlo al mittente.

10. Conservare la raccolta di staminali per eventuali analisi epidemiologiche.

Contaminazione dei terreni di coltura: eliminare i terreni di coltura se si osserva una contaminazione su > 1/3 delle frazioni di batteri a crescita rapida, non acido resistenti o di muffa. Richiedere nuovo materiale per l'analisi e ripetere l'analisi.

3.5.2 Nessuna crescita di micobatteri dopo 7 settimane

Redigere un rapporto segnalando «nessuna crescita di micobatteri» se, dopo 7 settimane d'incubazione, non è stata rilevata alcuna crescita di bacilli acido resistenti.

4 Rilevazione di legionelle

Durante i test di controllo, in alcuni HCD è stata rilevata la presenza di legionelle. Si raccomanda quindi di eseguire colture di controllo mensili con campioni d'acqua provenienti da HCD.

4.1 Fase pre-analitica

Prelievo del campione d'acqua (da 100 ml fino a 1 litro); analogo ai paragrafi 2.3.1 e 2.3.2.

4.2 Esecuzione in laboratorio

Procedimento di filtrazione secondo SN EN ISO 11731-2:2008:

1. filtrare il campione d'acqua (1 litro) attraverso una membrana filtrante in nitrato di cellulosa con diametro dei pori di 0,45 µm (ditta Sartorius codice ordine: 13806-50-ACN).
2. Posare il filtro su agar GVPC per legionella.
3. Incubare per 7 giorni a 36 °C ±2 °C sotto 5-10% CO₂.
4. Contare le colonie bianco/grigio, bombate (= sospetto di legionelle).
5. Preparare una subcoltura su agar Columbia arricchito con sangue di montone e agar GVPC per legionella.
6. Incubare per 7 giorni a 36 °C ±2 °C sotto 5-10% CO₂.
7. Crescita su GVPC/crescita su sangue = assenza di legionelle
Crescita su GVPC/assenza di crescita su sangue = sospetto di legionelle
8. Confermare mediante identificazione molecolare o test di agglutinazione al lattice.
9. Redigere un rapporto sulla specie e sulle UFC/ml.
10. Conservare la raccolta di staminali per eventuali analisi epidemiologiche.

5 Analisi della carica batterica totale nei campioni d'acqua

In alcune strutture sono stati impiegati HCD la cui acqua presentava intorbidimenti o colorazioni visibili. In seguito, le analisi dell'acqua hanno rivelato una contaminazione microbica molto elevata, in particolare con *Pseudomonas sp.* e altri bacilli gram negativi non fermentanti.

Dato che, conformemente alle istruzioni del fabbricante, questi dispositivi devono essere riempiti con acqua potabile filtrata, è presumibile che compaia una colonizzazione microbica, a seconda delle manipolazioni tecniche e della funzione di filtrazione. Gli impianti alimentati con acqua potabile disperdono una carica batterica totale elevata (da 0 a 1'200 unità formanti colonie [UFC] / ml).

Nell'Allegato 2B dell'Ordinanza sui requisiti igienici svizzera, la soglia di tolleranza per l'acqua potabile è < 300 UFC/ml.

Allegato tecnico: monitoraggio microbiologico degli Heater-Cooler Devices (HCD)

Per quanto concerne le analisi dell'acqua potabile, l'UFSP ha recepito la «Bestimmung der Totalzellzahl und des quantitativen Verhältnisses der Zellen niedrigen bzw. hohen Nukleinsäuregehaltes in Süßwasser mittels Durchflusszytometrie» quale metodo di analisi raccomandato nel Manuale Svizzero delle Derrate Alimentari (MSDA).

Questo metodo è stato sviluppato da Eawag, Dipartimento di Microbiologia ambientale, e validato in collaborazione con 14 istituti con sede in Svizzera e all'estero.

5.1 Fase pre-analitica

Prelievo del campione d'acqua (da 100 ml fino a 1 litro); analogo ai paragrafi 3.1 e 3.2.

5.2 Esecuzione in laboratorio

Per una descrizione dettagliata, si veda:

[Ufficio federale della sanità pubblica 2012: Durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben](#) (in tedesco)

Procedura alternativa con sensibilità minore:

metodo di filtrazione (cfr. par. 4.2) e determinazione della carica batterica aerobica a 37 °C su terreni di coltura non selettivi.

6 Maggiori informazioni

Centro nazionale per i micobatteri

Università di Zurigo

Istituto di microbiologia medica

Dr. Peter Keller, Sost. responsabile

Gloriastrasse 30/32

8006 Zurigo

Telefono: +41 44 634 05 16

E-Mail: pkeller@imm.uzh.ch

7 Bibliografia

1. **Achermann, Y., M. Rossle, M. Hoffmann, V. Deggim, S. Kuster, D. R. Zimmermann, G. Bloemberg, M. Hombach, and B. Hasse.** 2013. Prosthetic valve endocarditis and bloodstream infection due to *Mycobacterium chimaera*. *Journal of Clinical Microbiology* **51**:1769-1773.
2. **Bosshard, P. P., R. Zbinden, S. Abels, B. Böddinghaus, M. Altwegg, and E. C. Böttger.** 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **44**:1359-1366.
3. **Kohler, P., S. P. Kuster, G. Bloemberg, B. Schulthess, M. Frank, F. C. Tanner, M. Rössle, C. Böni, V. Falk, M. J. Wilhelm, R. Sommerstein, Y. Achermann, J. Ten Oever, S. B. Debast, M. J. Wolfhagen, G. J. Brandon Bravo Bruinsma, M. C. Vos, A. Bogers, A. Serr, F. Beyersdorf, H. Sax, E. C. Böttger, R. Weber, J. van Ingen, D. Wagner, and B. Hasse.** 2015. Healthcare-associated prosthetic heart valve, aortic vascular graft, and disseminated *Mycobacterium chimaera* infections subsequent to open heart surgery. *European Heart Journal* **36**:2745-2753.
4. **Sax, H., G. Bloemberg, B. Hasse, R. Sommerstein, P. Kohler, Y. Achermann, M. Rössle, V. Falk, S. P. Kuster, E. C. Böttger, and R. Weber.** 2015. Prolonged Outbreak of *Mycobacterium chimaera* Infection After Open-Chest Heart Surgery. *Clinical Infectious Diseases* **61**:67-75.
5. **Schreiber, P. W., S. P. Kuster, B. Hasse, C. Bayard, C. Rüegg, P. Kohler, P. M. Keller, G. V. Bloemberg, F. Maisano, D. Bettex, M. Halbe, R. Sommerstein, and H. Sax.** 2016. Reemergence of *Mycobacterium chimaera* in Heater-Cooler Units despite Intensified Cleaning and Disinfection Protocol. *Emerging Infectious Diseases* **22**:1830-1833.
6. **Sommerstein, R., C. Rüegg, P. Kohler, G. Bloemberg, S. P. Kuster, and H. Sax.** 2016. Transmission of *Mycobacterium chimaera* from Heater-Cooler Units during Cardiac Surgery despite an Ultraclean Air Ventilation System. *Emerging Infectious Diseases* **22**:1008-1013.
7. **Tortoli, E., L. Rindi, M. J. Garcia, P. Chiaradonna, R. Dei, C. Garzelli, R. M. Kroppenstedt, N. Lari, R. Mattei, A. Mariottini, G. Mazzarelli, M. I. Murcia, A. Nanetti, P. Piccoli, and C. Scarparo.** 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:1277-1285.