



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina - DIMED

Corso di Laurea in

Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

“Nuovi approcci microbiologici per limitare la contaminazione da *Bacillus cereus* nel latte materno donato”

Relatore: Prof. Riccardo Manganelli

Correlatore: Dr. Mario Rassa

Laureanda: Anna Cardillo

Matricola: 1232510

Anno Accademico 2023 – 2024

INDICE

<i>ABSTRACT</i>	1
<i>SOMMARIO</i>	3
<i>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE</i>	4
<i>1. BATTERI SPORIGENI E NON SPORIGENI</i>	4
1.1 Caratteristiche dei batteri sporigeni	5
1.2 Caratteristiche microbiologiche del <i>Bacillus cereus</i>	5
<i>2. CONTAMINAZIONI AMBIENTALI BATTERICHE</i>	7
2.1 Contaminazioni batteriche alimentari: latte materno	7
2.2 Focolaio di contaminazione in BLUD	9
2.3 Impiego del Latte materno per i bambini fragili o prematuri.....	9
<i>3. BANCA DEL LATTE MATERNO DI VICENZA</i>	9
3.1 Requisiti per l' idoneità alla donazione.....	10
3.2 Lavorazione e pastorizzazione del latte	11
<i>4. DISINFEZIONE, SANIFICAZIONE E STERILIZZAZIONE</i>	11
4.1 Prodotti monouso e sterilizzazione strumenti utilizzati nella BLUD	13
4.2 Disinfezione chimica degli ambienti.....	13
<i>5. DISPOSITIVI DI RACCOLTA/TRASPORTO DEL LATTE E METODICHE DI DISINFEZIONE</i>	14
5.1 Metodiche di disinfezione ambienti di lavoro pre e post contaminazione.....	14
<i>6. ANALISI MICROBIOLOGICA DI AMBIENTI E CAMPIONI DI LATTE DONATO</i>	15
6.1 Tamponi ambientali	15
6.2 Campioni di latte per analisi microbiologica su coltura.....	16
6.3 Identificazione tramite Maldi – Tof e antibiogrammi Kirby Bauer	16
<i>CAPITOLO 2: SCOPO DELLO STUDIO</i>	19
<i>CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI</i>	20
<i>1. PAZIENTI E CAMPIONI</i>	20
1.1 Tiralatte materno	20

1.2 Tamponi ambientali	21
1.3 Analisi microbiologica su piastre di coltura	22
2. <i>METODICHE DI PULIZIA DEI TIRALATTE</i>	23
3. <i>METODICA DI LAVORAZIONE DEL LATTE E PREPARAZIONE DEL POOL</i>	25
4. <i>METODICA DI COLTURA DEI CAMPIONI DI LATTE</i>	26
5. <i>ANTIBIOGRAMMA SECONDO METODO KIRBY – BAUER</i>	27
6. <i>IDENTIFICAZIONE TRAMITE MALDI – TOF</i>	28
7. <i>DISINFETTANTI IMPIEGATI</i>	29
<i>CAPITOLO 4: RISULTATI</i>	33
1. <i>COMPARAZIONE CAMPIONI DI LATTE MATERNO DONATO PRE E POST CONTAMINAZIONE</i>	33
2. <i>COMPARAZIONE PRELIEVI AMBIENTALI PRE E POST CONTAMINAZIONE</i>	33
3. <i>ANTIBIOGRAMMI: SUSCETTIBILITÀ E RESISTENZE DEL BACILLUS CEREUS</i>	34
<i>CAPITOLO 5: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</i>	36
<i>ICONOGRAFIA</i>	42
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	43

ABSTRACT

-Introduzione

Il latte materno è fondamentale per una crescita e sviluppo corretti da parte dei neonati, specialmente di quelli prematuri. Il latte materno protegge i neonati pretermine da: enterocolite necrotizzante (NEC, grave patologia intestinale caratterizzata da un quadro infiammatorio/infettivo) da ROP (patologia della retina del neonato prematuro) e dalla displasia broncopolmonare. Nel caso della donazione, il latte viene ritirato dalle donatrici a domicilio, poi congelato e successivamente pastorizzato, per essere aliquotato in rapporto al peso corporeo del prematuro e somministrato nei pasti programmati.

Si rende necessario, per i neonati prematuri, gestire al meglio i campioni, attraverso l'impiego di indagini microbiologiche presso le Banche del latte materno (**BLUD**) e con l'utilizzo della procedura di pastorizzazione. Essa rappresenta un ottimo processo di sterilizzazione da agenti patogeni, ma non funziona al meglio contro le spore batteriche, come nel caso del *Bacillus cereus*, che resistono alle temperature raggiunte durante il processo di pastorizzazione.

Presso la Terapia Intensiva Neonatale (**TIN**) dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza nel mese di ottobre 2023 è stata riscontrata una contaminazione del latte donato da *B. cereus*, a partire dai contenitori non correttamente sterilizzati e conseguentemente del latte in essi contenuti, inviati per controlli regolari previsti dalla BLUD di Vicenza al laboratorio di Microbiologia.

-Scopo

In questo studio sono stati testati nuovi prodotti e nuove procedure di disinfezione degli ambienti, al fine di eliminare non solo il microrganismo, ma anche le spore, principali responsabili della contaminazione da *Bacillus cereus*. Tutto ciò, insieme ad un controllo microbiologico periodico più frequente, sia delle aliquote dei campioni di latte donato prima e dopo il processo di sterilizzazione sia dei controlli ambientali.

-Materiali e metodi

Le procedure impiegate per la disinfezione sono state l'utilizzo di soluzioni di perossido al 6% e il Klercide™ Sporicidal Active Chlorine (sporicida a base di ipoclorito) e il campionamento microbiologico con appositi tamponi ambientali (Kit SRK®).

La raccolta dei dati ambientali è avvenuta in due *steps*, prima dell'impiego dei nuovi disinfettanti e post disinfezione: al termine dello studio la presenza del *Bacillus cereus* non era più riscontrabile nei campioni analizzati.

-Risultati

I risultati ottenuti da questo studio confermano la necessità di adottare e aggiornare misure di controllo e disinfezione adatte ad eliminare tutti i principali patogeni che si possono riscontrare in ambito ospedaliero, per ridurre quanto più possibile il rischio di contaminazione ed infezioni nelle banche del latte.

-Discussione e conclusioni

Aggiornare le procedure di disinfezione ed effettuare indagini di tipo ambientale, oltre all'analisi microbiologica dei campioni del latte stesso, rappresentano la miglior metodica per garantire la sterilità degli ambienti di lavoro e del prodotto stesso, così che un neonato ricoverato in terapia intensiva, già in status fisico precario, non vada incontro ad ulteriori rischi di infezioni.

SOMMARIO

Presupposto dello studio. La contaminazione da *Bacillus cereus* del latte donato rappresenta un problema per l'utilizzo dello stesso. Nelle BLUD la raccolta, il controllo, lo screening e la distribuzione sono complicati molto spesso dalla presenza di campioni positivi per *Bacillus cereus*, un patogeno ampiamente distribuito nell'ambiente che può diventare patogeno umano se ingerito o inoculato in situazioni particolari e in alcune tipologie di pazienti (bambini sottopeso o immaturi, immunodepressi etc.).

Non c'è ancora un consenso condiviso in letteratura internazionale e nazionale sulle modalità di controllo prima e dopo la pastorizzazione e non ci sono raccomandazioni specifiche relative al *Bacillus cereus* nel latte donato, che rappresenta la maggiore causa di eliminazione del latte donato dopo la pastorizzazione, dal momento che la temperatura di pastorizzazione non è in grado di eliminare le spore del bacillo stesso (1).

Scopo dello studio. Verificare quanti campioni sono risultati contaminati e capire l'origine della contaminazione stessa. Inoltre, attraverso un aumento delle misure di controllo e disinfezione ridurre, da questo episodio in poi, il rischio nella donazione del latte raccolto.

Materiali e metodi. Lo studio è stato fatto su 66 campioni di latte, e su 42 controlli ambientali effettuati sia in ospedale che a livello domiciliare. Sono stati eseguiti ulteriori controlli per verificare se i *Bacillus* cresciuti sui terreni di coltura fossero gli stessi rilevati e coltivati sui tiralatte utilizzati dalle mamme donatrici a domicilio e sui controlli eseguiti alle mamme presso l'ambulatorio della microbiologia.

Risultati. Sono stati riscontrati 5 campioni di latte positivi per *Bacillus cereus* consegnati dalle mamme, e raccolti a domicilio. Dopo l'aumento delle misure di sicurezza, il numero di campioni positivi per *B. cereus* è risultato pari a zero.

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1. BATTERI SPORIGENI E NON SPORIGENI

Le specie batteriche sono presenti e diffuse ovunque, dall'acqua al terreno che ci circonda, e ampiamente rappresentati all'interno del nostro stesso organismo, in particolare a livello intestinale e a livello cutaneo. Le ridotte dimensioni (1 micron) rendono impossibile la visione diretta ad occhio nudo e sarà solo la scoperta del microscopio ottico che renderà possibile l'osservazione degli stessi. Con la successiva scoperta della colorazione di Gram, per la prima volta i batteri verranno suddivisi nei due grandi gruppi: Gram positivi e Gram negativi, sulla base della diversa colorazione delle pareti batteriche.

La velocità di replicazione, nelle varie specie è molto diversa così come diverse sono le richieste metaboliche necessarie per la crescita e la moltiplicazione batterica.

Tra le varie specie variano anche la richiesta di ossigeno, da batteri aerobi obbligati, fino a quelle anaerobiche strette e ve ne sono inoltre altre, soprattutto ambientali, in grado di sopravvivere in condizioni ambientali estreme, attraverso la produzione di spore. Quest'ultime, si riattivano qualora le condizioni metaboliche mutino e rendano possibile un aumento della fertilità, infatti in queste condizioni si assiste la trasformazione da spora inattiva, fino alla forma batterica metabolicamente replicativa (germinazione).

Nel tempo, attraverso i vari studi che si sono susseguiti, questi organismi sono stati classificati in diversi modi: sulla base delle loro caratteristiche, come la loro morfologia, la risposta alla colorazione di Gram o la necessità o meno di ossigeno per la crescita e moltiplicazione. Inoltre, sono stati caratterizzati anche in base alla loro relazione rispetto ad un organismo, sia umano che animale: come commensali, quindi presenti e in grado di moltiplicarsi senza però causare malattie e svolgendo funzioni che possono essere utili all'organismo stesso; patogeni facoltativi, cioè in grado di causare malattia solo in alcune condizioni particolari oppure patogeni obbligati, ovvero causanti una malattia in base alle caratteristiche specifiche possedute dal microorganismo come ad esempio la produzione di tossine (2).

In particolare, tra i batteri ambientali Gram positivi, il genere *Bacillus*, oggetto della nostra tesi, presenta la capacità di produrre spore nel caso in cui l'ambiente in cui risiedono, inizi a mostrare condizioni sfavorevoli per la loro sopravvivenza in forma replicativa.

1.1 Caratteristiche dei batteri sporigeni

I batteri sporigeni possiedono la caratteristica di una forma alternativa di vita rappresentata dalla spora, la quale consente a queste specie di riattivarsi quando le condizioni siano favorevoli dal punto di vista metabolico.

La spora rappresenta una forma di vita per il batterio, che ha come scopo quello di mantenere la specie in un periodo di condizioni avverse, in attesa di condizioni favorevoli. Essa possiede un basso contenuto di acqua, è in grado di resistere alla disidratazione, all'azione dei raggi UV e anche a molti altri agenti disinfettanti.

L'organismo umano, in particolare, può venire in contatto con le spore, di solito provenienti dall'ambiente esterno oppure, per esempio, nel caso del *Clostridioides difficile* anche per contatto diretto con soggetti infetti (3).

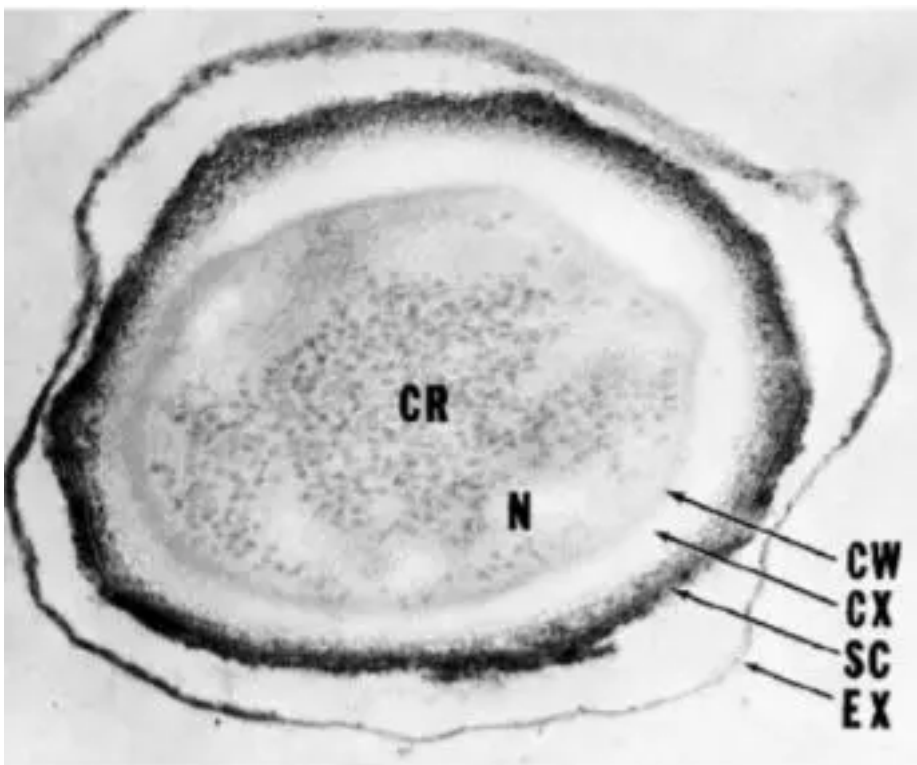


Fig. 1 Struttura dell'endospora di *Bacillus anthracis*. Dall'immagine si può osservare l'esosporio (EX), la membrana esterna (SC), la corteccia (CX), la membrana interna (CW) e il core [1]

1.2 Caratteristiche microbiologiche del *Bacillus cereus*

Il *Bacillus cereus* è un batterio Gram positivo appartenente alla famiglia delle *Bacillaceae*, aerobio o anaerobio facoltativo, mobile in quanto presenta flagelli peritrichi. Le specie di *Bacillus* sono ubiquitarie, alcune fanno parte della flora intestinale dell'uomo e di vari

animali, ma possono essere isolate anche dal terreno, polvere o acqua. Questo grazie alla capacità di resistere a varie tipologie di stress chimici e fisici (4).

Una delle caratteristiche principali del *B. cereus* è la capacità di produrre due tipi tossine: una ad azione diarroica e una ad azione emetica. Queste tossine possono rappresentare un serio problema di salute pubblica, specialmente quando coinvolgono i pazienti ospedalizzati e neonati prematuri a causa di un sistema immunitario immaturo.

I possibili veicoli del *B. cereus* che danno infezioni nei prematuri possono essere rappresentati da: ventilatori, cateteri centrali, tubi gastrici, ma anche dalla ingestione di *Bacillus* tramite il latte contaminato (Fig. 3). L'ingestione dello stesso può essere in grado di dare infezioni, per questa ragione è fondamentale procedere ad attenti e regolari controlli nelle Banche del latte (BLUD) come, peraltro segnalato dalla letteratura internazionale (1).

Name _____		Surname _____		Date _____			
Personal hygiene			Equipment and Environment hygiene				
<input type="radio"/>	Did you follow personal hygiene rules regularly?	Yes	No	<input type="radio"/>	Did you wash all the components of the breast pump using hot water and soap after the use?	Yes	No
<input type="radio"/>	Did you wash your hand with soap and hot water accurately before the collection?	Yes	No	<input type="radio"/>	Did you rinse out all the components accurately removing all organic residuals?	Yes	No
<input type="radio"/>	Did you dry your hand using personal single use towel/napkin?	Yes	No	<input type="radio"/>	Did you sterilized all the components contaminated by milk?	Yes	No
<input type="radio"/>	Did you wash your breast with run water before the collection?	Yes	No	<input type="radio"/>	Did you use one of the sterilization methods recommend by HMB's staff?	Yes	No
<input type="radio"/>	Did you dry your breast using personal single use towel/napkin?	Yes	No	<input type="radio"/>	Did you collect milk using components immediately after the sterilization?	Yes	No
<input type="radio"/>	Did you avoid the contact of your clean hand with object and surfaces before the collection?	Yes	No	<input type="radio"/>	Did you usually accurately clean your fridge/freezer?	Yes	No
<input type="radio"/>				<input type="radio"/>	Did you disinfect the surfaces prior to collect milk?	Yes	No
Milk collection							
<input type="radio"/>	Did you use sterile single use containers provided by the HMB for the collection of the milk?	Yes	No				
<input type="radio"/>	Did you store collected milk in the fridge (+4°C) during the 24h-collection?	Yes	No				
<input type="radio"/>	Did you freeze milk immediately in the freezer (-20°C) within the 24h?	Yes	No				
<input type="radio"/>	Did you avoid leaving collected milk at room temperature?	Yes	No				
<input type="radio"/>	Did you hermetically close the containers?	Yes	No				
<input type="radio"/>	Did you put the containers inside a plastic bag and store them in a dedicated section of the refrigerator, distant from other food?	Yes	No				
<input type="radio"/>	Did you keep the thermometer, provided by HMB, in your freezer to monitor the temperature?	Yes	No				
						Note. HMB = human milk bank	

Fig. 2 Check list utilizzata nella BLUD per garantire le buone pratiche che garantiscono la sicurezza del latte donato [2]

Relativamente alle tossine che il *B. cereus* è in grado di produrre, la prima è di natura proteica, termosensibile e causa perdita di liquidi dalla mucosa intestinale per attivazione dell'enzima adenilato – ciclasi, similmente a quella prodotta da *Vibrio cholerae*. La seconda è termoresistente e, inoltre, nonostante sia ancora quasi sconosciuto il suo meccanismo di patogenicità, sembra possa essere associata alla produzione della spora.

Nei primi anni 2000 è stata identificata una terza tossina che può causare necrosi della mucosa intestinale e che potrebbe essere coinvolta non solo nei casi di tossinfezione alimentare, ma anche nell'infezione di ferite cutanee (5).

2. CONTAMINAZIONI AMBIENTALI BATTERICHE

Un'infezione umana può essere causata da vari batteri, virus o funghi, e può essere contratta nelle strutture ospedaliere oppure anche in ambienti extra ospedalieri, anche con organismi ambientali e talvolta sporigeni.

In genere, le infezioni possono essere endogene, quindi causate da microrganismi già residenti nell'organismo che possono diventare invasivi quando penetrano in un distretto normalmente sterile come il torrente circolatorio.

Oppure, possono essere esogene, ovvero provenienti dall'esterno dell'organismo localizzandosi su superfici inanimate, attrezzature legate all'assistenza, dispositivi medici, spazi che presentano requisiti metabolici molto ridotti per determinarne la sopravvivenza in forma vegetativa e, nel caso di batteri sporigeni, anche la formazione di spore che possono riattivarsi qualora le condizioni ambientali lo consentano.

Patogeni nosocomiali, come anche altri microrganismi e forme vegetative come le spore sono in grado di resistere per settimane, o mesi, su superfici inanimate asciutte. Alcuni fattori che possono influenzarne la persistenza possono essere: temperature favorevoli, umidità, oltre al tipo di superficie e anche le ridotte esigenze metaboliche dei microrganismi oggetto delle infezioni (6).

Il *B. cereus*, è in grado di resistere in molti ambienti e superfici, come quelle ospedaliere, nonostante la sanificazione giornaliera con prodotti specifici, grazie alla capacità di produrre biofilm e anche alla possibilità di trasformazione in spora.

2.1 Contaminazioni batteriche alimentari: latte materno

Il *Bacillus cereus* può comportarsi come patogeno opportunisto, quindi causare infezioni nosocomiali localizzate o sistemiche, specie in pazienti immunodepressi oppure in bambini di basso peso alla nascita e immaturi.

Come patogeno umano, il *Bacillus* è stato segnalato in varie infezioni di origine alimentare, di solito autolimitanti. È stato segnalato, come causa comune di intossicazione alimentare indotta da tossine, i cui sintomi più comuni sono rappresentati da diarrea e vomito e molto spesso è in grado di contaminare il latte umano donato anche dopo la pastorizzazione nelle banche del latte (7).

Il latte umano donato (**LUD**) è fondamentale per una corretta crescita e un sano sviluppo dei neonati in quanto, a differenza di quello in formula, fornisce un maggior apporto più adeguato e bilanciato, oltre ad essere ricco di sostanze immunomodulanti non riproducibili artificialmente.

Per ridurre il rischio infettivo, il LUD viene trattato con pastorizzazione, effettuata a 62°C per circa 30 minuti (metodo Holder). Tuttavia, questo potrebbe non essere sufficiente per eliminare le spore di *B. cereus*, dal momento che è in grado, anche nel latte dopo la pastorizzazione di riattivarsi attraverso la germinazione sporigena in forma vegetativa e con successiva produzione di tossine (8).

Le tossinfezioni alimentari di cui è responsabile si presentano sotto due forme: diarroica ed emetica. La prima ha un periodo di incubazione più lungo e si manifesta con dolori addominali e profusa diarrea, raramente accompagnata da vomito e la causa principale, generalmente, è legata alla ingestione di alimenti a base di carne, vegetali e salse contaminate da *B. cereus*. La seconda forma causata dalla tossina che da vomito ha un periodo di incubazione minore (6).

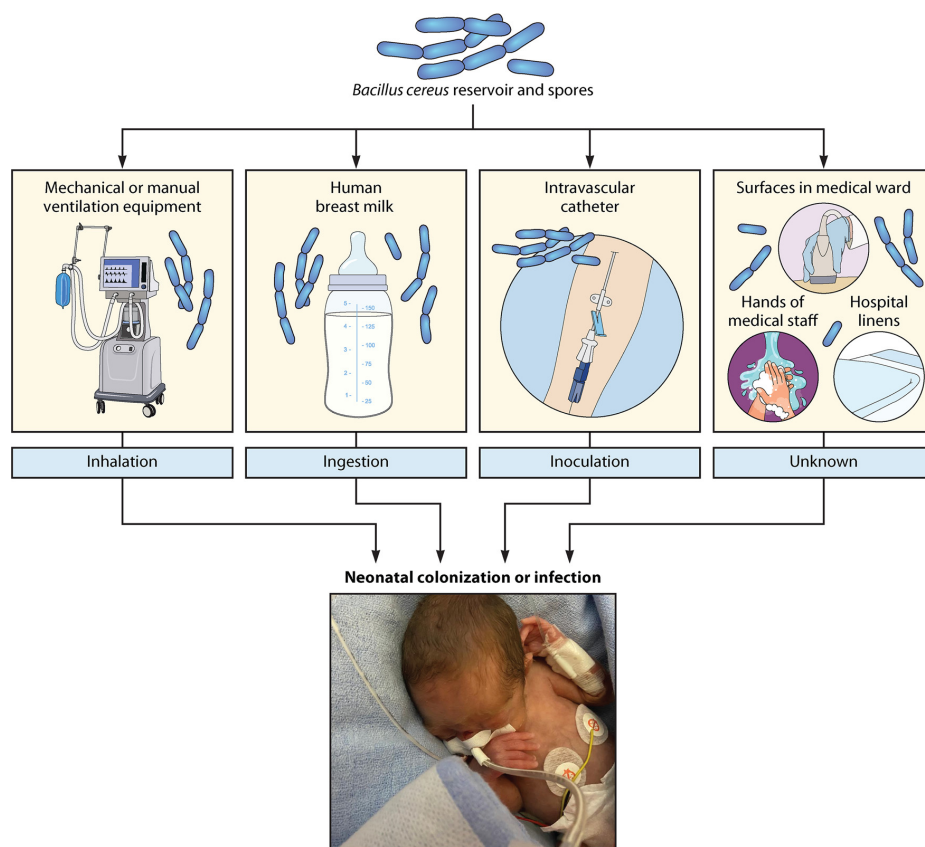


Fig. 3 Rappresentazione schematica delle varie possibili fonti di colonizzazione o infezione da parte di *Bacillus cereus* in bambini nati pretermine [3]

2.2 Focolaio di contaminazione in BLUD

Le contaminazioni sostenute da patogeni nosocomiali, come il *Bacillus cereus* di natura ubiquitaria per l'azione sporigena, rappresentano uno dei più grandi problemi a livello di sicurezza ambientale, essendo tra le prime cause globali di tossinfezione alimentare.

Nel caso in cui i pazienti colpiti siano neonati, questa situazione si aggrava ulteriormente a causa della loro immaturità immunologica che comporta una maggiore sensibilità e vulnerabilità alle infezioni.

Se tale contaminazione è presente nelle Terapie Intensive Neonatali (TIN) o all'interno di preparati alimentari per pretermine e/o neonati, come il latte materno donato (LUD), raccolto nelle "Banche del latte umano donato" (BLUD) (9). Può rappresentare un rischio preoccupante per lo sviluppo di cluster con casi gravi, o mortali, nei reparti di Terapia Intensiva Neonatale.

Nel periodo compreso tra ottobre e dicembre del 2023, presso la TIN dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza, è stata riscontrata una contaminazione di *B. cereus* nel LUD pastorizzato in seguito all'invio di aliquote del latte donato per esami colturali nel laboratorio di Microbiologia.

2.3 Impiego del Latte materno per i bambini fragili o prematuri

Da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) da tempo vengono riconosciuti gli effetti benefici dell'allattamento materno esclusivo, sul corretto sviluppo del bambino e nella prevenzione di numerose malattie. Tanto che OMS lo raccomanda come scelta esclusiva fino al completamento del sesto mese di vita.

L'alimentazione del nascituro tramite latte materno è considerata come ottimale, in quanto è sicura e controllata. Inoltre, contiene anticorpi che aiutano nella protezione dell'organismo contro molte delle comuni malattie infantili (10).

Il latte materno è l'alimento che fornisce al bambino l'energia e i nutrienti necessari nel suo primo semestre di vita, essendo responsabile anche di più della metà delle esigenze nutritive del secondo semestre nel primo anno di vita (11).

3. BANCA DEL LATTE MATERNO DI VICENZA

Nel 2015 presso il Reparto di Terapia Intensiva Neonatale dell'Ospedale S. Bortolo di Vicenza, in accordo con la Direzione Ospedaliera dell'Azienda Ulss 8, la Direzione della Centrale del Latte di Vicenza e la Fondazione San Bortolo Onlus venne attivata una Banca del Latte.

La BLUD si pone come obiettivo quello di garantire a tutti i neonati prematuri il diritto al nutrimento con latte materno, poiché la somministrazione del latte umano favorisce la sopravvivenza, l'accrescimento e lo sviluppo del nascituro. È inoltre preferibile, in quanto fornisce le sostanze nutritive necessarie nelle corrette proporzioni e nella forma più assimilabile.

La Banca del latte, pertanto, lavora selezionando donatrici, e dopo la partecipazione ad un corso di formazione per le mamme donatrici sulle modalità di raccolta a domicilio (LUD) e conservazione del latte raccogliendo, controllando e trattando in condizioni di sicurezza il latte donato, per poi distribuirlo gratuitamente ai bambini che ne necessitano (12).

3.1 Requisiti per l'idoneità alla donazione

Per poter entrare a far parte della lista di donatrici, ogni volontaria viene sottoposta ad uno screening di selezione. Esso prevede la compilazione di un questionario, oltre alla esecuzione di una serie di test di laboratorio ematici, e su un campione di latte della futura donatrice. Attraverso questi controlli viene accertato lo stile di vita ed il rilievo di eventuali impedimenti alla donazione stessa.

Grazie al prelievo di sangue viene esclusa la presenza di malattie infettive contagiose in atto e, sulla base dei parametri riscontrati, il medico responsabile del Servizio certificherà l'idoneità alla donazione della candidata. Se la donazione si protrae oltre i 6 mesi i test sierologici vengono ripetuti.

Oltre a questi controlli, è previsto inoltre un incontro obbligatorio formativo/informativo presso il Reparto di Terapia Intensiva Neonatale dell'Ospedale di Vicenza. Attraverso il colloquio formativo con l'operatore dedicato, sono spiegate le principali norme igieniche e la corretta gestione del latte materno e al termine verrà chiesto alla potenziale donatrice di estrarre un campione di latte fresco, in modo tale che possa essere sottoposto ad analisi microbiologica pre e post pastorizzazione. Il campione destinato alla pastorizzazione viene conservato in freezer a meno 20°C e, non appena possibile, pastorizzato per essere inviato in laboratorio di microbiologia per poi essere analizzato.

Il latte verrà ritenuto come “non idoneo per la donazione” nel caso in cui presenti i seguenti parametri:

- Pre pastorizzazione: crescita di batteri totali maggiore a 10^5 UFC/mL, Enterobatteriacee maggiore a 10^4 UFC/mL, Stafilococco aureo maggiore a 10^4 UFC/mL;
- Post pastorizzazione: crescita di batteri aerobi maggiore o uguale a 10 UFC/mL.

Si considera come “idonea alla donazione” la mamma che soddisfa le seguenti condizioni:

- Sierologia non significativa;
- Anamnesi non significativa;
- Latte crudo negativo per ricerca e sviluppo batterico;
- Latte pastorizzato negativo per ricerca e sviluppo batterico (13).

3.2 Lavorazione e pastorizzazione del latte

Nel processo di lavorazione è fondamentale che, innanzitutto, la raccolta e il trasporto avvengano correttamente, quindi, che ogni mamma inserisca in contenitori sterili i campioni di latte e che essi vengano trasportati alla BLUD con le modalità e temperatura di conservazione corrette, definite da idoneo protocollo.

Una volta ricevuti in consegna tutti i campioni, attraverso la check list compilata a domicilio, viene verificata la correttezza della modalità, seguita nelle istruzioni operative per la raccolta. Questi flaconi, numerati per identificarli, vengono poi puliti in BLUD con panni monouso disinfettanti imbevuti di ipoclorito di sodio ipoclorito (cloro attivo disponibile 0.1%) e subito congelati in un freezer apposito dedicato. Ogni campione di latte materno donato, al momento della lavorazione, viene prima scongelato e, in seguito, si procede alla creazione di un pool di latte dalla riunione delle aliquote della stessa mamma.

Una volta scongelato e preparato il pool, vengono allestite nuove aliquote in contenitori nuovi sterili, questo sulla base del numero di neonati che hanno necessità e delle mamme che hanno donato. In caso di poca disponibilità di latte, le aliquote vengono utilizzate per i bambini considerati “very low”, ovvero di peso inferiore ai 1500 grammi, e si inviano contemporaneamente aliquote in Microbiologia per gli esami colturali dei campioni.

A fine processo i contenitori termosaldati con il latte pastorizzato sono etichettati e congelati in un freezer con temperatura -20°C per essere conservati e utilizzati quando necessario (13).

4. DISINFEZIONE, SANIFICAZIONE E STERILIZZAZIONE

Anche se è stato ampiamente dimostrato che le superfici ambientali sono, di per sé, difficilmente responsabili della trasmissione di infezioni, la presenza di materiale organico richiede comunque una notevole attenzione. Per questo motivo, definire tecniche di sterilizzazione dei materiali, oltre a quelle di disinfezione e sanificazione di ambienti di lavoro, è la pratica di base per definire dei protocolli da impiegare in strutture mediche per garantirne la sicurezza nella gestione dei campioni da utilizzare nei piccoli pazienti (14).

Il processo di sanificazione è un atto volto a ridurre il numero di microrganismi ad un livello di sicurezza, come viene definito da delle linee guida o dai parametri standard di sanità pubblica. È solitamente praticata dopo aver già pulito la superficie o l'oggetto in esame per rimuovere ogni segno visibile di contaminazione o sporco. Allo stesso tempo, può anche ridurre il numero di germi presenti. Deve essere eseguita con una certa frequenza e periodicità, così che ciò che rimane di microrganismi patogeni non possa più rappresentare un rischio (15).

Con il termine “disinfezione”, invece, si intende il processo di completa eliminazione di forme vegetative oppure di microrganismi, da oggetti inanimati (14). In questo caso i disinfettanti sono più efficaci, in quanto mirati per un agente, che può essere un batterio, spora, virus o fungo, al fine di controllare il rischio di infezione per persone o di contaminazione per oggetti e/o ambienti di tipo sanitario.

A differenza di prodotti di sanificazione, i disinfettanti hanno necessità di un periodo di attesa in cui rimangono a contatto con l'oggetto o la superficie da pulire prima che si manifesti l'effetto richiesto.

Il processo di sterilizzazione, a differenza dei due precedenti, è un processo che porta alla completa eliminazione o distruzione di qualsiasi forma microbica. Tramite questi metodi chimici e fisici c'è l'eliminazione di tutte le forme vegetative e, inoltre, anche delle spore, prevenendo così la possibilità di crescita e riproduzione da parte di batteri o altri microrganismi. Questa forma di decontaminazione viene utilizzata, in particolare, per la sterilizzazione degli strumenti chirurgici impiegati in sala operatoria.

Ovviamente, ogni microrganismo o forma vegetativa ha una suscettibilità diversa rispetto alle metodiche di pulizia e sterilizzazione utilizzate, anche in base all'ambiente in cui si trovano (15, 16).

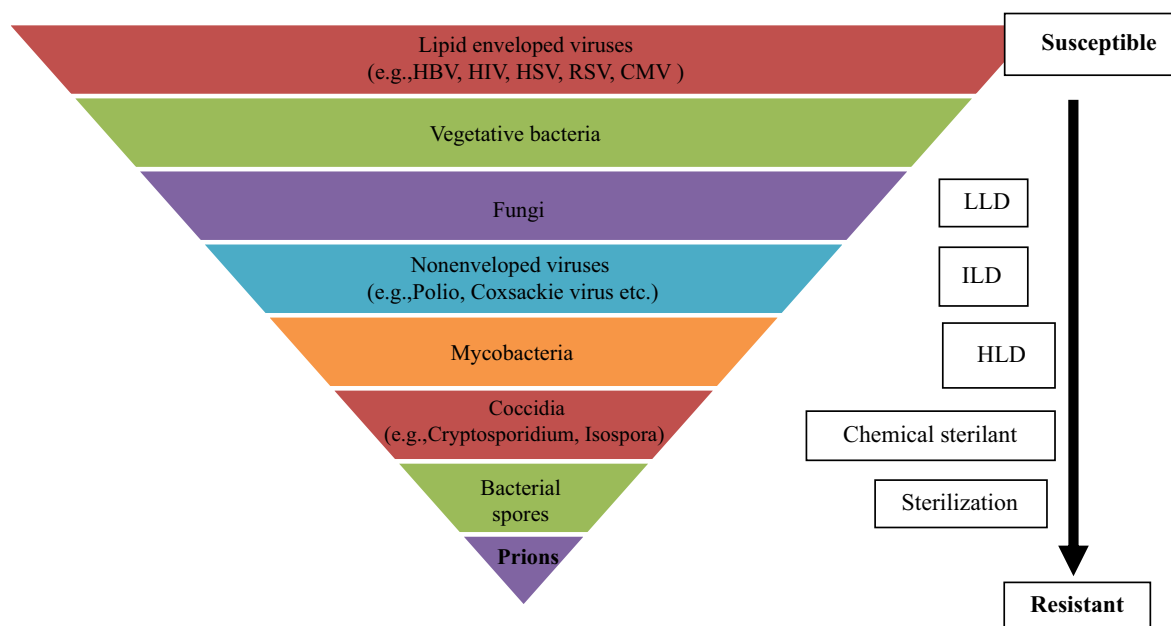


Fig. 4 Livello dell'attività inattivante dei vari microrganismi dal più sensibile al più resistente con l'utilizzo dei metodi di disinfezione e sterilizzazione impiegati in ambito sanitario [4]

4.1 Prodotti monouso e sterilizzazione strumenti utilizzati nella BLUD

I vari prodotti e strumenti che sono stati presi in esame durante questo studio, come i tamponi ed i vari contenitori di trasporto del latte materno indicati come “sterili” oppure “monouso” vengono così classificati.

Con l'etichettatura “monouso” si intende che l'oggetto in questione possa fornire le proprie caratteristiche e funzionalità, sterilità e sicurezza per un solo intervento. Mentre, altri dispositivi medici possono essere riutilizzati, ma richiedono un processo di lavaggio e pulizia che permetta loro di tornare riutilizzabili. Tale processo inizia con una fase di lavaggio per poi essere seguito da disinfezione e sterilizzazione (17).

Come già anticipato, la sterilizzazione consente la completa distruzione di tutte le forme di vita microbica attraverso dei processi fisici e chimici. Fra le tecniche utilizzate in ambito ospedaliero, quella più diffusa comprende l'utilizzo del calore umido.

Il vapore, infatti, non è tossico né costoso, inoltre, possiede un potente effetto sporicida e per questi motivi è un procedimento altamente consigliabile per tutti i materiali che non vengono alterati nella funzione e struttura dalle alte temperature.

4.2 Disinfezione chimica degli ambienti

Il disinfettante ideale dovrebbe possedere varie caratteristiche: un ampio spettro di azione nella sua attività antimicrobica, efficienza nella eliminazione di materia organica e sotto

molteplici condizioni ambientali (ad esempio temperature non adatte oppure pH non neutri). Inoltre, dovrebbe avere un'alta soglia di sicurezza un basso indice di corrosività e costo ridotto e sostenibile.

Nessun disinfettante esistente presenta tutte queste caratteristiche e, proprio per questo motivo, è fondamentale la selezione dei fattori prima citati per ottenere il giusto equilibrio tenendo conto dello scopo per cui dovrebbe essere utilizzato.

I disinfettanti – detergenti utilizzati in questo studio, ovvero il GIOSEPT FOAM e DUOXIL AC (13), vengono routinariamente impiegati nei reparti dell'ospedale San Bortolo di Vicenza e in tutte le strutture ospedaliere della ULSS8 Berica. Possiedono caratteristiche diverse perché sono presenti: detergenti che rimuovono il materiale organico e sospendono i grassi; disinfettanti che rapidamente uccidono o inattivano le particelle infettive e disinfettanti – detergenti, che raggiungono entrambi gli obiettivi.

Per questo studio è stato inoltre testato un altro tipo di disinfettante, PEROSSDO al 6%, il quale comprendeva anche delle proprietà sporicide, in quanto si trattava con un *Bacillus* produttore di spore (18,19).

5. DISPOSITIVI DI RACCOLTA/TRASPORTO DEL LATTE E METODICHE DI DISINFEZIONE

5.1 Metodiche di disinfezione ambienti di lavoro pre e post contaminazione

Avere delle procedure e modalità di trattamento dei prodotti e ambienti è fondamentale per ogni struttura e dipartimento. Esse permettono di controllare la trasmissione di agenti, oltre a contenere e aiutare nella risoluzione di casi di contaminazioni.

Presso la BLUD di Vicenza venivano adottate determinate misure di sicurezza nel ricevimento dei campioni di latte e lavorazione degli stessi. Con quanto è successo a causa della contaminazione da *B. cereus*, c'è stata una rivoluzione di tutti i punti, che sono stati cambiati e aggiornati.

Sono state aumentate le misure di sicurezza da parte dell'operatore, indossando un camice monouso in TNT al ricevimento del latte materno, non eseguito più in TIN ma in BLUD, e tutto ciò riguardava anche l'applicazione delle procedure all'interno della BLUD stessa.

Si intendono le procedure di disinfezione degli ambienti eseguite giornalmente e dei prodotti ricevuti, lo stoccaggio del materiale eliminando le confezioni originali, lavorando non più su un bancone d'acciaio, ma sotto cappa a flusso laminare. Sono state aggiornate anche le

metodiche di scongelamento del latte e la sua pastorizzazione, modificando le temperature e la quantità da inviare in laboratorio di Microbiologia per i controlli.

Con un intervallo bisettimanale viene eseguito, inoltre, un trattamento di sanificazione ambientale con perossido di idrogeno, a concentrazione 6%, da parte del personale dell'Ufficio Ambiente, che registra ogni intervento (13).

6. ANALISI MICROBIOLOGICA DI AMBIENTI E CAMPIONI DI LATTE DONATO

Metodiche di controllo e monitoraggio della pulizia e sterilità di ambienti e campioni sono fondamentali in ogni ambiente ospedaliero. Un esempio, sono servizi come la BLUD, la quale raccoglie e processa materiali che vengono poi assegnati a pazienti particolarmente fragili.

Per questo motivo, vengono utilizzati dei tamponi specifici floccati per i controlli ambientali, in modo tale da aumentare le possibilità di rilevamento di eventuali microrganismi presenti sulle superfici inanimate. Essi consentono di garantire la vitalità batterica per 24/48 ore, e inoltre, vengono inviate periodicamente delle aliquote di campioni di latte non pastorizzato, solo all'inizio della donazione, e pastorizzato, ad ogni nuova costituzione di un pool (13).

6.1 Tamponi ambientali

Per quanto riguarda gli ambienti, nella BLUD dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza, il monitoraggio viene eseguito tramite delle piastre agarizzate fornite dalle Aziende: BD, Biomerieux e Meus. Per le superfici, sono stati utilizzati i tamponi floccati Copan pre e post utilizzo della BLUD, quando era stato segnalato lo sviluppo di *Bacillus cereus* nel latte delle tre mamme donatrici. Attualmente i controlli sono stati aumentati e vengono effettuati in modo regolare semestralmente.

I punti in cui sono stati eseguiti i tamponi nelle fasi "PRE SANIFICAZIONE" e "POST SANIFICAZIONE E PEROSSIDO", comprendono:

1. Bancone preparazione latte materno: superficie superiore di lavoro;
2. Bancone preparazione latte materno: superfici interne mobiletto;
3. Pareti interne pastorizzatrice S90 più vecchia;
4. Pareti interne pastorizzatrice S90;
5. Scatola di guanti in vinile, già in uso, utilizzati per la manipolazione boccette di latte (scatola presente sul carrello vicino al bancone di preparazione del latte materno);
6. Tastiera computer;
7. Pareti interne frigo "WAEKO" trasporto da domicilio alla BLUD;

8. Superfici superiori carrello;
9. Pareti interne frigo “Cool – ice” trasporto da domicilio alla BLUD.

Tali controlli sono attuati per garantire che il latte sia lavorato in ambienti puliti.



Fig. 5 Piantina della BLUD e indicazioni sul luogo di esecuzione di alcuni dei tamponi ambientali pre e post sanitizzazione

6.2 Campioni di latte per analisi microbiologica su coltura

I campioni di latte di una donatrice, nel momento in cui si presenti la necessità, vengono scongelati e uniti per formare un pool. Da quest’ultimo, vengono create delle aliquote di latte pastorizzato e 5ml vengono utilizzati come controllo di sterilità da inviare al laboratorio di Microbiologia.

I controlli sono eseguiti anche dalle aliquote che si ottengono dopo la pastorizzazione e prima della somministrazione ai neonati. Questo processo viene attuato, per garantire che il prodotto sia sicuro per i neonati in Terapia Intensiva.

6.3 Identificazione tramite Maldi – Tof e antibiogrammi Kirby Bauer

Le colonie ottenute nelle colture dei campioni di latte materno positivi sono state identificate impiegando la tecnologia Maldi – Tof, ottenendo una identificazione di specie sicura (score di identificazione superiore a 2.20) come evidenziato da Fig. 7.

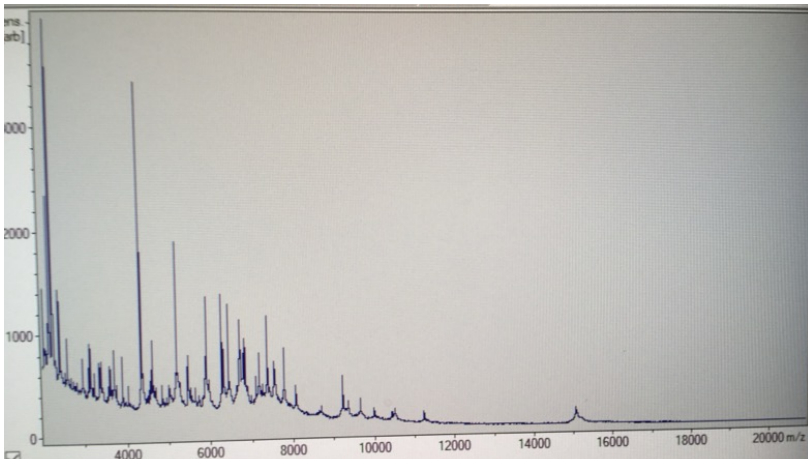


Fig. 6 Esempio di spettro ottenuto con Maldi – Tof per il *Bacillus cereus*

ID CAMPIONE	MICROORGANISMO	SCORE
Campione 1	<i>Bacillus cereus</i>	2.20
Campione 2	<i>Bacillus cereus</i>	2.21
Campione 3	<i>Bacillus cereus</i>	2.26
Campione 4	<i>Bacillus cereus</i>	2.22
Campione 5	<i>Bacillus cereus</i>	2.24

Fig. 7 Score di identificazione dati dal Maldi – Tof per il *Bacillus cereus*

L'ottenimento di uno score maggiore a 2.3 significa "identificazione di specie altamente probabile", mentre fra il 2.2 e 2 indica una "identificazione di genere sicura, identificazione di specie probabile". Nei nostri casi sono stati ottenuti tutti score oltre il 2, quindi si può considerare con alta probabilità che si tratti di *Bacillus cereus* (20).

La metodica grazie alla quale si è riusciti a dimostrare che i vari campioni positivi erano correlati, e quindi appartenenti allo stesso cluster, è stata l'esecuzione di un antibiogramma fenotipico tramite agar diffusione secondo metodo Kirby – Bauer, sulle colonie isolate dai campioni positivi delle aliquote pre e post pastorizzazione e anche sui campioni isolati dal sistema di trasporto. Osservando gli aloni di inibizione ottenuti sulla base degli antibiotici testati, nelle piastre è stato notato come essi fossero gli stessi per tutti i campioni risultati positivi per *B. cereus* in coltura.

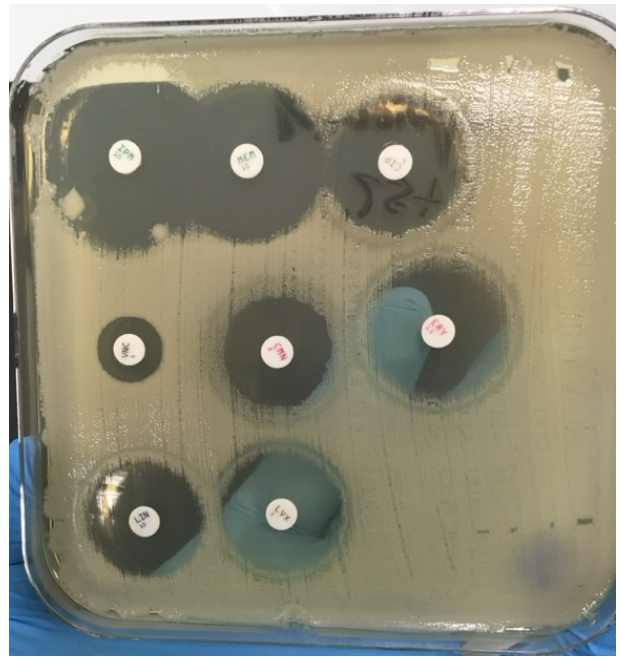


Fig. 8 Antibiogrammi con metodo Kirby – Bauer testando la suscettibilità di ceppi di Bacillus cereus

CAPITOLO 2: SCOPO DELLO STUDIO

In questo studio sono stati testati e introdotti nuovi prodotti e rafforzate e potenziate le procedure di disinfezione degli ambienti, al fine di eliminare non solo il *Bacillus cereus*, ma anche le sue spore, principali responsabili della contaminazione del latte materno donato.

Sono stati eseguiti quindi:

- Semina di 42 tamponi ambientali e 66 aliquote di latte materno donato con l'obiettivo di identificare l'eventuale presenza dell'agente microbico o delle sue spore;
- Identificazione delle colonie cresciute in coltura su piastra;
- Analisi delle procedure di sanificazione e disinfezione degli strumenti e ambienti pre e post contaminazione da parte del *B. cereus* con le sue spore.

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

1. PAZIENTI E CAMPIONI

In questo studio sono stati presi in esame: i materiali forniti per la conservazione e trasporto del latte materno donato, i tamponi ambientali utilizzati per campionare le superfici ed i campioni di LUD, presso il laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza.

Inoltre, sono state prese in considerazione anche le metodiche di raccolta/gestione del latte da parte delle donatrici e delle procedure di lavorazione del materiale.

1.1 Tiralatte materno

Per la raccolta del latte materno da parte delle donatrici, inizialmente, la BLUD forniva in un tiralatte Harmony™ dell'azienda Medela (40012 Calderara di Reno (BO)). Questo prodotto viene destinato alle madri che allattano in ospedale oppure a casa.

Il tiralatte Harmony è un tiralatte manuale per uso personale con coppa per il seno PersonalFit Flex e impugnatura ergonomica a due fasi. Ciò consente di alternare movimenti brevi di volume modesto per stimolare il flusso del latte e movimenti lunghi e profondi per estrarre in maniera ottimale il latte.

Il set utilizzato includeva solo il tiralatte, che si componeva di:

- Coppa per il seno;
- Impugnatura;
- Connettore a due componenti;
- Diaframma/supporto con guarnizione O – ring;
- Testa della valvola;
- Due membrane della valvola;
- Coperchio multifunzione;
- Una bottiglia;
- Un supporto per la bottiglia.

Da ottobre 2023 è stata cambiata la marca di tiralatte fornita, passando al Tiralatte manuale dell'azienda Gima (Gima S.p.A. - 20060 Gessate (MI) Italy). Anche questo prodotto, come il precedente, comprende lo stesso set di componenti ed è destinato allo scopo di prelevare e raccogliere il latte materno delle puerpere. Ogni mamma donatrice ha ricevuto un dispositivo personale per la raccolta a domicilio.



Fig. 9 Tiralatte manuale Gima

1.2 Tamponi ambientali



Fig.10 Tamponi FLOQSwabs® Kit SRK® Enviromental Swab System (Copan, Italia) [5]

Per i campionamenti negli ambienti e superfici lavorativi sono stati utilizzati dei tamponi floccati FLOQSwabs® con 1mL di terreno liquido del Kit SRK® Hygiene Monitoring System (Copan, Italia).

La procedura di utilizzo di tali tamponi è la seguente:

1. Aprire la busta staccabile e tirare fuori tutte le componenti;
2. Step di pre umidificazione: strizzare la spugnetta nella parte terminale del tubo con pollice e indice finché la punta del tampone non è bagnata;
3. Aprire il FLOQSwabs® e scartare il tubo di pre umidificazione con la spugna;
4. Procedere con il campionamento, che per le superfici piatte va eseguito in tre direzioni, mentre per superfici articolate sarebbe meglio campionare tutte le possibili aree nascoste;
5. Prendere il tubo con 1mL di SRK® e inserire al suo interno il tampone utilizzato per il campionamento con il punto di rottura contro il bordo del contenitore. Rompere l'asta del tampone e buttare la parte superiore;
6. Chiudere il tubo con il tappo.

Per questo kit viene consigliata la conservazione in un contenitore refrigerato (tra 1°C e 4°C) per un massimo di 4 ore.

1.3 Analisi microbiologica su piastre di coltura

Per ogni pool di latte prodotto pastorizzato e, solo alla prima donazione anche quello non pastorizzato, vengono create delle aliquote di latte materno donato da inviare al laboratorio di Microbiologia per eseguire dei controlli di crescita batterica.

Queste verifiche di sterilità del campione sono state eseguite inoculando i campioni su quattro tipi di piastre per 24 ore a 37°C in aerobiosi:

- Agar sangue (TSA);
- Agar Columbia (CNA);
- Agar Mac Conkey (MCK);
- Agar Sabouraud (SAB).

Il **Tryptone Soy Agar (TSA)** dell'Azienda BD (Becton Dickinson GmbH, Tullastrasse 8-12, 69126 Heidelberg/Germany). Il terreno solido altamente nutritivo utilizzato per l'isolamento e coltura di vari microrganismi esigenti e non esigenti. Contiene sangue di montone, che permette di rilevare reazioni emolitiche e fornisce il necessario per la crescita di numerose specie patogene.

L'**agar Mac Conkey (MCK)** dell'azienda Meus (Meus s.r.l., Via Leonardo Da Vinci, 24/B, Zona Ind. Tognana, 350128 PIOVE DI SACCO (PD) – Italy). Questo agar è un terreno solido selettivo per i batteri Gram negativi, poiché contiene Sali biliari che inibiscono la crescita dei batteri Gram positivi. Il terreno è composto da agar, peptoni, carboidrati, sali biliari, lattosio,

sali minerali e acqua. L'unica fonte energetica che contiene è il lattosio, che permette un'ulteriore distinzione fra batteri fermentanti e non fermentanti.

L'agar Columbia (CNA) dell'azienda Biomerieux (BioMérieux® SA 69280 Marcy-l'Etoile / France). Questo tipo di agar è un terreno solido selettivo per i batteri Gram positivi, poiché contiene acido nalidixico e colistina che inibiscono la crescita di batteri Gram negativi, oltre ad andare ad evidenziare l'emolisi di *Stafilococchi* e *Streptococchi*.

L'Agar Sabouraud (SAB) della ditta BD. Questo tipo di agar è un terreno solido utilizzato per la coltivazione di funghi. I peptoni presenti nell'agar sono fonti di fattori di crescita azotati e il glucosio costituisce una fonte energetica per la crescita di microrganismi, inoltre, il pH basso è ottimale per i funghi, ma non per molti batteri.

Per inibire i batteri, sono stati aggiunti alcuni agenti selettivi come il cloramfenicolo, che sarebbe un antibiotico ad ampio spettro, il quale inibisce un'ampia gamma di batteri Gram negativi e Gram positivi, ma può avere un effetto inibitorio su diversi funghi patogeni. Sono aggiunti anche antimicrobici come penicillina, gentamicina e streptomina, o una combinazione di questi perché hanno dimostrato di essere efficaci nell'inibire i batteri senza influenzare la crescita dei funghi.

2. METODICHE DI PULIZIA DEI TIRALATTE



Fig.11 Tiralatte manuale Harmony [6]

Entrambi i tiralatte forniti, nel loro foglio illustrativo forniscono le indicazioni sulla corretta procedura di pulizia e disinfezione del prodotto una volta terminato l'utilizzo.

Il tiralatte Harmony™ prevede la seguente procedura prima del primo impiego e dopo ciascun utilizzo:

1. Smontaggio del set e singoli componenti;

2. Risciacquare tutti i componenti con acqua pulita e fredda. Verificare eventuali danni ai singoli componenti e gettare ai primi segni di danneggiamento o usura;
3. Pulire tutti i componenti con abbondante acqua saponata tiepida;
4. Risciacquare tutti i componenti con acqua pulita e fredda per 10 – 15 secondi;
5. Asciugare con panno pulito o lasciare asciugare su un panno pulito;
6. Nel caso i singoli componenti del set vengano lavati in lavastoviglie, posizionarli nel cestello superiore o nello scomparto per le posate.

Precedentemente al primo impiego e una volta al giorno prevede:

1. Smontaggio del set di pompaggio nei singoli componenti;
2. Coprire tutti i componenti con acqua e lasciare bollire per cinque minuti;
3. Asciugare con panno pulito o lasciare asciugare su un panno pulito;
4. Conservare i componenti puliti in una sacca, contenitore, panno o carta puliti e traspiranti, fino all'utilizzo successivo.

La ditta Gima, per il suo tiralatte prevede le seguenti procedure di pulizia.

Antecedente alla pulizia è necessario seguire queste disposizioni:

1. Pulire e sanificare le parti inferiori prima di utilizzare la pompa per la prima volta;
2. Per la pulizia utilizzare solo acqua di rubinetto o acqua in bottiglia;
3. Smontare e lavare tutte le parti che vengono a contatto con il seno e il latte materno immediatamente prima e dopo l'uso per evitare l'essiccazione dei residui di latte e per prevenire la formazione di batteri;
4. Smontare tutte le parti che necessitano di pulizia per garantire una pulizia accurata;
5. Collocare le parti in un ambiente pulito per evitare che vengano contaminate.

Pulizia precedente all'uso:

1. Smontare e lavare/sanificare tutte le parti che vengono a contatto con il seno e il latte materno;
2. Mettere tutte le parti smontate in una pentola. Riempire la pentola con una quantità di acqua di rubinetto o di acqua in bottiglia sufficiente a coprire tutte le parti;
3. Portare ad ebollizione l'acqua. Mettere le parti in acqua bollente per 5 minuti;
4. Lasciar raffreddare l'acqua e togliere le parti dall'acqua con delicatezza. Prestare attenzione a non scottarsi;

Mettere le parti in modo ordinato su un tovagliolo di carta pulito o su uno stendino pulito e lasciarle asciugare all'aria. Evitare di usare asciugamani di stoffa per asciugare le parti perché possono essere portatori di germi e batteri nocivi per il bambino.

Pulizia dopo l'uso:

1. Smontare e lavare tutte le parti che vengono a contatto con il seno e il latte materno;
2. Sciacquare in acqua fredda tutte le singole parti venute a contatto con la mammella e il latte materno per rimuovere i residui di latte;
3. Mettere le parti in modo ordinato su un tovagliolo di carta pulito o su uno stendino pulito e lasciarle asciugare all'aria.

3. METODICA DI LAVORAZIONE DEL LATTE E PREPARAZIONE DEL POOL

La metodica di preparazione del pool di latte materno donato prevede le seguenti fasi:

1. Assegnazione di un codice alla donatrice ed etichettatura del biberon;
2. Accettazione dei biberon dove viene tolto il numero identificativo della donatrice e si presentano la scritta "latte donato", la quantità in ml del biberon e data di scadenza;
3. Viene preparato un recipiente con una frusta da cucina, entrambi sterili, e si inserisce tutto il latte dei contenitori forniti da una unica donatrice;
4. Si miscela lentamente il latte travasato per ottenere un composto omogeneo;
5. Presi contenitori sterili nuovi, con una siringa sterile vengono create le aliquote di LUD in contenitori sterili da 130ml o 240 ml. La quantità di aliquote preparate dipende dal numero di neonati a cui serve e al numero di donatrici. In caso di poca disponibilità di latte, esse sono indirizzate verso i bambini very low e per il controllo microbiologico;
6. Vengono chiusi ermeticamente i contenitori con tappi termosaldabili (verdi). Successivamente i contenitori termo saldati e, in seguito pastorizzati;
7. Al termine della pastorizzazione, viene generata dall'apposito software (Jmilk) una nuova etichetta che riporta la dicitura "latte donato pastorizzato";
8. Viene scritto sopra il tappo il codice donatrice, data di pastorizzazione e, al termine del trattamento, verrà inserita la data di scadenza.

La metodica di pastorizzazione utilizzata è il "metodo Holder" e prevede i seguenti passaggi:

1. Una volta ottenuti le aliquote dal pool, viene preparato il pastorizzatore per il trattamento di 30 minuti in acqua a 62,5°C;

2. Una volta indicata dallo strumento la temperatura corretta, si possono inserire i cestelli con il latte. Insieme ai biberon da consegnare per i neonati, ne viene inserito uno definito “biberon sonda” dove viene inserita la sonda per registrare la temperatura;
3. Al termine del ciclo, tolti dal pastorizzatore, i contenitori sono correttamente etichettati con un’etichetta che riporta la dicitura “latte materno pastorizzato”, la quantità di latte contenuto e la data di scadenza. Attraverso la scansione del codice a barre si potrà risalire a: nome della donatrice, data di costituzione del pool, sede di stoccaggio e trattamenti a cui è stato sottoposto il flacone;
4. A fine pastorizzazione vengono inserite le aliquote nel freezer -20°C , pronte per essere fornite al reparto.

4. METODICA DI COLTURA DEI CAMPIONI DI LATTE

La coltura dei campioni di latte inviati presso il laboratorio di Microbiologia viene eseguita seguendo la procedura definita nel modulo MA BAT0008 – LATTE CRUDO/PASTORIZZATO, indicando come volume minimo 1ml, consentendo fino a 5ml di campione in contenitore sterile.

Il campione viene seminato tramite semina semi quantitativa su quattro piastre di inoculo, composte da: agar sangue (TSA), agar Columbia (CNA), agar Sabouraud (SAB) e agar Mac Conkey (MCK).

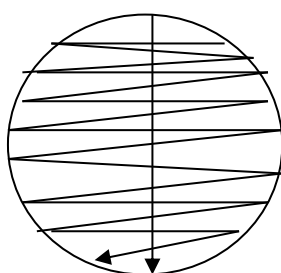


Fig. 12 Modalità di semina semi quantitativa

La semina viene eseguita dal Tecnico Sanitario di Laboratorio secondo la metodica:

- Scongellare il campione se congelato fino a portarlo a temperatura ambiente;
- Togliere i terreni dal frigorifero e porli sul tavolo di lavoro;
- Eseguire il check-in ed il marca piastre, ovvero un’etichetta barcodata di identificazione del campione, con ora di accettazione e reparto di provenienza, dei campioni;
- Etichettare i terreni;

- Inoculare le piastre indicate con ansa da 10µl secondo il metodo quantitativo;
- Incubare in termostato 37°C tutte le piastre per 2 gg.

Il campione originale viene conservato a 4°C fino a completamento della refertazione. Tutte le operazioni relative alla manipolazione del materiale in esame vanno eseguite in condizioni di sicurezza con impiego di sotto cappa a flusso laminare Biohazard.

5. ANTIBIOGRAMMA SECONDO METODO KIRBY – BAUER

In seguito all'identificazione della specie batterica con tecnologia Maldi – Tof, si può procedere con l'esecuzione dell'antibiogramma. È un test che consente di saggiare la sensibilità del batterio verso determinate molecole antibiotiche, una delle tecniche utilizzate è il metodo di Kirby – Bauer.

Questa metodica si basa sul principio di un dischetto di cellulosa imbevuto di antibiotico e poi seccato che, venendo depositato su un terreno inoculato di un ceppo batterico a contatto con la superficie umida dell'agar, assorbe l'acqua e rilascia l'antibiotico che diffonde nel terreno circostante.

Il microorganismo viene inoculato su tutta la superficie di agar in modo uniforme con una concentrazione di 0,5 McFarland e, in seguito, vengono dispensati i dischetti contenenti le diverse molecole antibiotiche.

L'inibizione alla zona di crescita rappresenta la minima concentrazione inibente, ovvero la MIC. Tramite un calibro si effettua una misurazione del diametro dell'alone di inibizione si risale alla MIC attraverso una curva di regressione e il confronto con le indicazioni date da EUCAST, ovvero “*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*”.

Questo test di diffusione fornisce una risposta di tipo qualitativo, indicando solo: sensibile, intermedio e resistente.



Fig.13 Aloni di inibizione mediante agar diffusione ottenute su colonie di Bacillus cereus

6. IDENTIFICAZIONE TRAMITE MALDI – TOF



L'identificazione dei batteri sviluppati nei terreni di coltura è stata effettuata tramite lo strumento MALDI – TOF (Bruker Daltonics). L'acronimo MALDI – TOF, ovvero Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight, è una tecnica analitica di spettrometria di massa che utilizza in processo di ionizzazione e assorbimento tramite matrice. Essa permette di identificare in tempi brevi batteri Gram positivi e negativi, lieviti e funghi, oltre a micobatteri, grazie al loro profilo proteico.

Fig. 14 MALDI Biotyper dell'azienda Bruker [7]

Il principio di base è rappresentato dalla spettrometria di massa, una tecnica analitica utilizzata per l'identificazione di sostanze ignote. Il principio di funzionamento si basa su tre fasi.

La ionizzazione delle molecole in fase gassosa, alla separazione degli ioni prodotti, cioè quest'ultimi vengono discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e infine la rilevazione tramite un detector. Il risultato finale è lo spettro di massa, che è costituito dalla somma di tutti gli ioni con la stessa massa/carica. Questi spettri sono caratteristici per ogni sostanza e quindi costituiscono un'impronta digitale della stessa.

La prima fase del processo di identificazione è la preparazione della piastrina MALDI – TOF. Avviene con metodo "veloce", quindi una volta identificata e prelevata con un'ansa la colonia di interesse, la si stempera direttamente nella piastrina in due pozzetti (identificazione in doppio). A questo punto, si aggiunge 1µl di Acido Formico 70% che ha la finalità di frammentare le proteine batteriche per migliorarne l'identificazione.

Una volta asciutto l'acido, si aggiunge 1µl di matrice, che, caricando elettricamente il campione, permette lo spostamento dei frammenti al polo opposto originando lo spettro di

lettura. Una volta asciutto si introduce la piastrina nello strumento MALDI-TOF e si procederà all'analisi.

La tecnologia MALDI – TOF funziona sottovuoto, perché solo una volta creatosi lo strumento comincia l'analisi. Come già anticipato, il funzionamento si può suddividere in 3 fasi di analisi, dove la prima è relativa alla sorgente nella quale si utilizza la tecnologia MALDI. Il campione, che contiene la matrice, verrà bombardato da un laser di luce pulsata ad alta intensità (in genere un raggio UV con $\lambda=337\text{nm}$).

Il raggio laser viene assorbito dalla matrice che rompe la sua struttura cristallina, ionizza prima le molecole di matrice poiché sono più volatili e, in seguito, quelle del campione.

Questo processo porterà alla formazione di un gas super compresso, li quale si espande e trasporta gli ioni della matrice dalla superficie nella fase gas. La sorgente MALDI possiede una ionizzazione diversa rispetto ad altre tecniche, perché consiste in una ionizzazione impulsiva, ovvero che non fornisce un flusso continuo di ioni, bensì essi vengono generati tutti in una volta sola in un tempo di pochi nanosecondi. Gli ioni prodotti subiscono un'accelerazione, grazie ad un campo elettrico, ed il gas prodotto entrerà nel flight tube (un tubo rettilineo sottovuoto). Alla fine di quest'ultimo si troverà un detector capace di misurare con accuratezza l'arrivo di ogni ione.

Il principio base del TOF si basa sul rapporto massa/carica e, poiché gli ioni sono sottoposti tutti allo stesso campo elettrico, quelli con rapporto maggiore m/z saranno più pesanti e arriveranno con velocità minore rispetto a quelli con rapporto minore che saranno di conseguenza più leggeri.

Dopo che tutti gli ioni vengono riconosciuti dal detector, lo strumento, interfacciato con un pc, crea uno spettro dell'organismo ignoto dove il grafico avrà alle ascisse il rapporto massa/carica e alle ordinate l'intensità di ogni picco. Questo spettro verrà confrontato con un database di circa 3300 specie batteriche (>10000 spettri) e, a seconda dello score, si potrà valutare se l'organismo è stato identificato oppure dovremmo ripetere l'analisi.

Lo score è caratteristico di una probabilità di associazione tra spettro ignoto e spettri certificati, per una corretta identificazione lo score deve essere maggiore di 2, se invece è minore l'identificazione può essere falsa o poco attendibile.

7. DISINFETTANTI IMPIEGATI

I disinfettanti impiegati in questo studio sono: GIOSEPT FOAM, DUOXIL AC e PEROSSIDO al 6%.

GIOSEPT FOAM (Giochemica disinfezione e antisepsi, Via Chiarelle, 35 – 37032, Monteforte d'Alpone (VR) – ITALY) è una soluzione disinfettante e detergente pronta all'uso priva di sostanze CMT (Cancerogene, Mutagene e Teratogene), composta da Didecildimetilammonio cloruro (0,14g), Clorexidina digluconato (0,10g) come principi attivi e un agente detergente, protettivo, schiumogeno e acqua depurata q.b. come eccipienti (100g).

Questo è un prodotto disinfettante a largo spettro d'azione, comprendente sia batteri Gram negativi come *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, che Gram positivi come *Staphylococcus sp.*, *Staphylococcus aureus* meticillina resistente – MRSA ed *Enterococchi*. Si può associare la sua azione anche contro lieviti quindi *Candida*, virus (HIV, HBV, HCV, Adeno virus) e bacilli acido resistenti, quindi *Mycobacterium tuberculosis*.

Il sale d'ammonio quaternario didecildimetilammonio cloruro, già a basse concentrazioni in soluzione acquosa presenta attività battericida nei confronti di *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococchi*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* e *Serratia*. L'attività biocida della clorexidina è diretta soprattutto verso i batteri ambientali produttori di spore.

Attività	Ceppi test	Norma	Condizioni	Tempo di contatto
Battericida	E. hirae ATCC 10541 P. aeruginosa ATCC 15442 S. aureus ATCC 6538	EN 13727 (Fase 2, Step 1)	Pulito e Sporco	5 minuti
Fungicida (Lieviticida)	C. albicans ATCC 10231	EN 13624 (Fase 2, Step 1)	Pulito e Sporco	5 minuti
Tubercolicida	Mycobacterium terrae ATCC 15755	EN 14348 (Fase 2, Step 1)	Pulito e Sporco	15 minuti
Virucida	HIV, HBV, HCV	EN14476 (Fase 2, Step 1)	Pulito e Sporco	5-15 minuti

Fig. 15 Indicazioni di attività biocida indicati con l'impiego di GIOSEPT FOAM [8]

Il prodotto è pronto all'uso, potendo essere utilizzato con due metodiche:

1. Vaporizzazione diretta, ovvero vaporizzare su diversi punti della superficie oppure con l'ausilio della salvietta imbevuta e strofinare, oppure distribuire la soluzione vaporizzata mediante un adeguato panno non tessuto pulito e asciutto;
2. Vaporizzazione indiretta, quindi vaporizzare su un adeguato panno non tessuto pulito e asciutto, applicare sulla superficie e Far asciugare e non risciacquare, salvo che la superficie non sia destinata al contatto diretto con le membrane mucose o gli alimenti (tempo minimo di contatto 5 minuti).



Fig. 16 Istruzioni per l'impiego del disinfettante [8]

DUOXIL AC (Mondial – 35010 Limena (Padova) via don G. Zonta,3) è un disinfettante pronto all'uso per dispositivi medici riutilizzabili e superfici di dispositivi medici esposte al pericolo di contaminazione microbiologica in campo sanitario, attivo contro batteri, batteri acido alcol resistenti, miceti e virus.

Per ogni 100ml di prodotto sono presenti: 0,5 g di didecil-dimetil ammonio cloruro, 0,06 g clorexidina di gluconato, 70 ml alcol etilico DS, coformulanti ed acqua q.b.

Grazie al suo principio attivo, spruzzandolo sulla superficie da trattare, se priva di anfratti e discontinuità, o su panno idoneo con il quale intervenire sulle superfici da disinfettare, nel passaggio finale usare panno pulito e lasciare asciugare. Deve avere un tempo di contatto di 10 minuti per poter avere effetto.

Concentrazione testata di DUOXIL AC -FT17	Normativa applicata	Microrganismo	Tempo di contatto	Attività biocida DUOXIL AC-FT17
tal quale	UNI EN 14561	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10'	Battericida
tal quale	UNI EN 14561	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	10'	Battericida
tal quale	UNI EN 14561	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	10'	Battericida

Concentrazione testata di DUOXIL AC -FT17	Normativa applicata	Microrganismo	Tempo di contatto	Attività biocida DUOXIL AC -FT17
tal quale	UNI EN 14562*	<i>Candida albicans</i> ATCC10231	10'	Fungicida
tal quale	UNI EN 14562	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	10'	Fungicida

Concentrazione testata di DUOXIL AC - FT17	Normativa applicata	Microrganismo	Tempo di contatto	Attività biocida DUOXIL AC -FT17
tal quale	UNI EN 14563	<i>Mycobacterium avium</i> ATCC157691	10'	Micobattericida
tal quale	UNI EN 14563	<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 15755	10'	Micobattericida Tubercolicida

Concentrazione DUOXIL AC -FT17	Normativa applicata	Microrganismo	Tempo di contatto	Attività biocida DUOXIL AC -FT17
tal quale	biblografia	<i>Virus envelope *</i> (HIV- HBV HCV)	5'	Virucida
tal quale	UNI-EN14476	<i>Poliovirus type 1</i> <i>LSc-2ab Eurovir Hygiene Institut</i>	10'	Virucida
tal quale	UNI-EN14476	<i>Adenovirus type 5 strain Adenoid 75 ATCC VR-5</i>	10'	Virucida
tal quale	UNI-EN14476	<i>Murine Norovirus MNV strain 599 Berlin Friedrich Loeffler Institute RVB-0651</i>	10'	Virucida

Fig. 17 Schede di impiego riconosciuti dal Ministero della salute ed effettuati in “dirty conditions” [9]

CAPITOLO 4: RISULTATI

1. COMPARAZIONE CAMPIONI DI LATTE MATERNO DONATO PRE E POST CONTAMINAZIONE

Sono stati processati un totale di 66 campioni di latte materno donato, di cui 33 pre pastorizzazione e 33 aliquote post pastorizzazione di varie donatrici della Banca del Latte Materno Donato di Vicenza (LUD), presso l’Ospedale San Bortolo di Vicenza, nel periodo compreso fra ottobre e dicembre 2023.

Le prime analisi hanno portato a concludere che 5 campioni su 28 risultassero positivi per la presenza dell’agente contaminante *Bacillus cereus*. Si è potuto notare come, già nel periodo di fine novembre dopo l’attivazione delle nuove misure di gestione e controllo del latte: c’è stata una riduzione dei casi con una sola positività per *Peanibacillus simplex* su un totale di 33 campioni inviati.

Inoltre, sono stati eseguiti degli antibiogrammi con metodo Kirby Bauer per identificare e confermare che si trattasse di *B. cereus*.

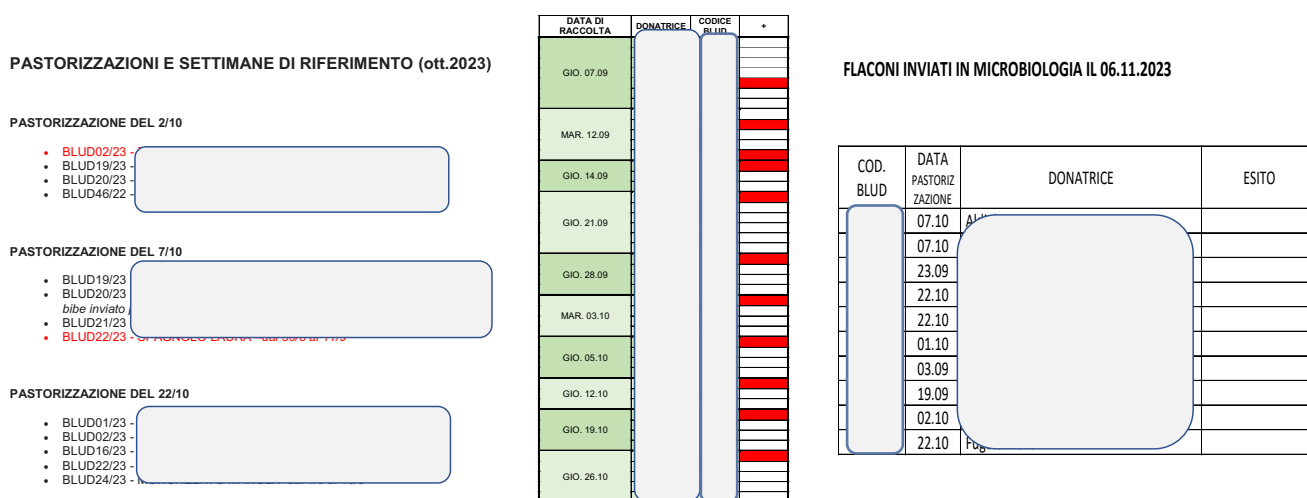


Fig. 18 Campioni di LUD pastorizzato inviati per analisi microbiologiche, in rosso sono indicati i campioni risultati positivi all’esame colturale

2. COMPARAZIONE PRELIEVI AMBIENTALI PRE E POST CONTAMINAZIONE

Sempre nel periodo compreso fra ottobre e dicembre 2023 sono stati eseguiti dei tamponi per verificare l’eventuale presenza nell’ambiente del *Bacillus cereus* o sue forme vegetative.

Sulla base dei prelievi effettuati in data 16/10/2023 risultavano contaminate da *B. cereus* e altri batteri le seguenti superfici:

- Bancone preparazione latte materno: superficie superiore di lavoro;
- Pareti interne pastorizzatrice S90 N1;
- Pareti interne pastorizzatrice S90 N2;
- Scatola di guanti in vinile, già in uso, utilizzati per la manipolazione boccette di latte (scatola presente sul carrello vicino al bancone di preparazione del latte materno);
- Tastiera computer;
- Pareti interne frigo “WAEKO” trasporto da domicilio alla BLUD;
- Interno pareti frigo presente presso la TIN per stoccaggio latte;
- Superfici posteriori carrello.

In seguito al cambio delle disposizioni di accettazione dei campioni e procedure di sanificazione, oltre che dei disinfettanti utilizzati, risultava ancora positiva per *Bacillus cereus* solamente la scatola di guanti in vinile, già in uso, utilizzati per la manipolazione boccette di latte.

3. ANTIBIOGRAMMI: SUSCETTIBILITÀ E RESISTENZE DEL *BACILLUS CEREUS*

Gli antibiogrammi con metodo Kirby – Bauer eseguiti sulle colonie ottenute dalle colture e sono state testate le molecole indicate da EUCAST. Per indicare se sensibili, intermedi o resistenti vengono indicati con “S”, “I” e “R”.

Dei 5 ceppi testati riportavano tutti le seguenti sensibilità:

- Imipenem S;
- Meropenem S;
- Ciprofloxacina I;
- Vancomicina S;
- Clindamicina S;
- Eritromicina S;
- Linezolid S;
- Levofloxacina I.

Bacillus spp.

except *B. anthracis*

Expert Rules and Expected Phenotypes

For abbreviations and explanations of breakpoints, see the Notes sheet

EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 14.0, valid from 2024-01-01

MIC determination (broth microdilution according to ISO standard 20776-1)
Medium: Cation-adjusted Mueller-Hinton broth
Inoculum: 5x10⁸ CFU/mL
Incubation: Sealed panels, air, 35±1°C, 18±2h (for glycopeptides 24h)
Reading: Unless otherwise stated, read MICs at the lowest concentration of the agent that completely inhibits visible growth. See "EUCAST Reading Guide for broth microdilution" for further information.
Quality control: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. For agents not covered by this strain, see EUCAST QC Tables.

Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)
Medium: Mueller-Hinton agar
Inoculum: McFarland 0.5
Incubation: Air, 35±1°C, 18±2h
Reading: Unless otherwise stated, read zone edges as the point showing no growth viewed from the back of the plate against a dark background illuminated with reflected light. See "EUCAST Reading Guide for disk diffusion" for further information.
Quality control: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. For agents not covered by this strain, see EUCAST QC Tables.

This genus includes several species. The most frequent species belong to the *Bacillus cereus* complex (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* and *B. weihenstephanensis*). The breakpoints are not validated for *B. anthracis*. Breakpoints for *B. anthracis* are listed in a separate table.

Carbapenems	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)			Notes
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU	
Imipenem	0.5	0.5		10	30	30		Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. Lettered notes relate to the disk diffusion method.
Meropenem	0.25	0.25		10	25	25		

Fluoroquinolones	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)			Notes
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU	
Ciprofloxacin	0.001	0.5		5	50 ^A	23 ^A		Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. Lettered notes relate to the disk diffusion method. A. The norfloxacin disk diffusion test can be used to screen for fluoroquinolone resistance. See Note B. B. Isolates categorised as screen negative can be reported "susceptible increased exposure" (I) to ciprofloxacin and levofloxacin. Isolates categorised as screen positive can be reported resistant to ciprofloxacin and levofloxacin.
Levofloxacin	0.001	1		5	50 ^A	23 ^A		
Norfloxacin (screen only)	NA	NA		10	21 ^B	21 ^B		

Glycopeptides	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)			Notes
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU	
Vancomycin	2	2		5	10 ^A	10 ^A		A. Non-wild type isolates were not available when developing the disk diffusion method.

Macrolides and lincosamides	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)			Notes
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU	
Erythromycin	0.5	0.5		15	24	24		Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. Lettered notes relate to the disk diffusion method.
Clindamycin	1	1		2	17	17		

Oxazolidinones	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)			Notes
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU	
Linezolid	2	2		10	22	22		Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. Lettered notes relate to the disk diffusion method.

Fig. 19 Tabelle con molecole di riferimento per test di suscettibilità antibiotica, previste per *Bacillus* spp (EUCAST, valide dal giorno 1/01/2024) [10]

CAPITOLO 5: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Un controllo occasionale del latte nella BLUD di Vicenza ha dimostrato la presenza in tre campioni di latte provenienti da tre mamme diverse di colonie di *Bacillus cereus*, identificato utilizzando lo strumento Maldi – Tof. Successivamente, sono stati eseguiti i controlli sulle tre mamme positive presso l'ambulatorio di Microbiologia eseguendo ad ogni mamma: tamponi ascellari, tamponi del capezzolo e nella parte a contatto con il seno dei tiralatte utilizzati per la raccolta a domicilio dalle rispettive mamme, il cui latte era risultato positivo per *B. cereus*.

Una di queste è risultata positiva nel tiralatte, ed alla stessa mamma è stato eseguito un ulteriore controllo, confermando la positività del tiralatte che aveva a casa. Chiedendo notizie sulle modalità di raccolta, lei spiegò che il latte raccolto e congelato era stato aliquotato in un freezer che aveva avuto problemi di interruzione di corrente, portandola così a riporlo vicino a delle verdure crude congelate e in parte scongelate a seguito del malfunzionamento.

Successivamente, è stato controllato il contenitore refrigerato di trasporto del latte, dal domicilio alla BLUD, dimostrando la presenza dello stesso *Bacillus* rilevato nel tiralatte materno attraverso la corrispondenza dei test di sensibilità eseguiti sui campioni di latte della BLUD risultati positivi all'esame colturale. I campioni di latte delle altre due donatrici risultate positive sono stati valutati per capire se i ceppi isolati erano corrispondenti a quelli della prima donatrice positiva. Attraverso gli antibiogrammi, tutti i campioni isolati dalle tre mamme risultavano identici come pattern di sensibilità e di resistenza antibiotica nelle molecole testate. Non sono stati eseguiti test molecolari aggiuntivi perché non disponibili in commercio.

È stata controllata inoltre la BLUD a livello ambientale, dimostrando che tutte le superfici e anche l'aria erano negative per ricerca di *Bacillus*, oltre ai frigoriferi di conservazione del latte e sono state eliminate tutte le aliquote congelate risultate positive. Questo ha determinato l'eliminazione di tutta la riserva presente nei congelatori e pronta per la distribuzione con una perdita di 52 litri di latte donato. Inoltre, il CIO ha chiuso il settore BLUD fino alla negativizzazione di tutti i campioni e materiali.

Anno di riferimento	Numero donatrici	Litri di latte donato eliminato
2023	39	52
2024	37	0

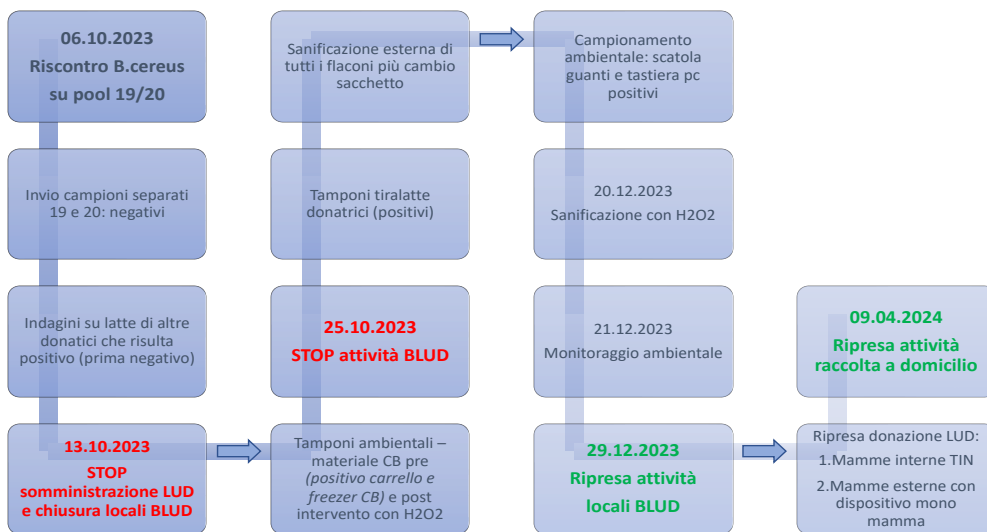


Fig. 20 Descrizione temporale degli eventi in seguito alla segnalazione della presenza di Bacillus cereus nei campioni di latte al CIO con le relative decisioni conseguenti concordate da parte dello stesso

Successivamente si è deciso con il comitato infezioni ospedaliere (CIO) di temporizzare regolarmente i controlli microbiologici e di acquisire una cappa a flusso laminare per proteggere i campioni da possibili contaminazioni durante le manovre di aliquotazione degli stessi.

<i>PRE</i>	<i>POST</i>
Vestizione: cuffia e mascherina	Vestizione: Camice, cuffia, mascherina e cambio calzature
Pulizia standard	Pulizia standard + pulizia straordinaria ogni 15 giorni con Perossido
Ricevimento LUD in TIN	Ricevimento LUD in BLUD
Sacchetti riutilizzati da Croce Bianca per diverse donatrici	Sacchetti monouso per singola donatrice
Raccolta da parte di Croce Bianca di varie donatrici nello stesso sacchetto	Sacchetto singolo per donatrice
No pulizia su contenitori ricevuti	Disinfezione di ogni singolo contenitore con salviette di ipoclorito di sodio
Stoccaggio materiale negli armadi con confezioni originali	Stoccaggio materiale negli armadi eliminando confezioni originali
Impresa di pulizie con ingresso libero sia di orari e senza DPI	Impresa di pulizia con DPI ed ingresso prioritario rispetto agli altri ambulatori
Preparazione pasti e pool donatrici su bancone in acciaio	Preparazione pasti e pool donatrici sotto cappa laminare
Scongelamento contenitori latte a 37 gradi con pastorizzatore	Scongelamento contenitori latte a 25 gradi con pastorizzatore
Campioni latte per analisi microbiologiche e analisi dei macronutrienti (Miris) prelevati successivamente alla pastorizzazione aprendo il contenitore.	Campioni latte per analisi microbiologiche e analisi dei macronutrienti (Miris) preparati prima della pastorizzazione in contenitori separati e termosaldati
Quantità di LUD da inviare in microbiologia circa 20 ml	Quantità di LUD da inviare in microbiologia definita con responsabile microbiologia 5 ml.

Fig. 21 Aggiornamento del protocollo di gestione del latte nella BLUD prima e dopo la contaminazione da Bacillus cereus

Sono stati utilizzati anche nuovi disinfettanti per eseguire la pulizia giornaliera delle superfici dopo la preparazione dei pasti. Viene eseguita un'ulteriore pulizia quotidiana serale delle superfici libere e pavimenti a carico di un'impresa di pulizie esterna. Inoltre, sono anche stati disinfettati gli ambienti tramite una soluzione gassosa.

L'insieme di vari fattori, come l'utilizzo di kit monouso di raccolta del latte, l'attivazione dei controlli regolari, l'aumento della formazione per le mamme donatrici e l'utilizzo della cappa

di manipolazione dei campioni ha permesso di superare questo rischio infettivo potenziale, aumentando la sicurezza nelle donazioni del latte stesso.

Anno di riferimento	Numero donatrici	Litri di LUD eliminato
2023	39	52
2024	37	0

Fig. 22 Confronto fra il numero di donatrici e litri di LUD eliminato nei due periodi presi in esame

Discussione

Il riscontro sui campioni di latte donato di *Bacillus cereus* ha determinato una serie progressiva di interventi, la chiusura della BLUD e soprattutto una serie di indagini finalizzate a capire come il *B. cereus* potesse aver contaminato le aliquote di latte risultate positive ai controlli microbiologici. Una delle prime azioni correttive attuate dopo il riscontro di questo microrganismo in BLUD è stato il cambio nella modalità di raccolta e di conservazione del latte donato a domicilio.

Prima della positività per *Bacillus* il latte estratto a domicilio veniva conservato in freezer all'interno di flaconcini sterili forniti dalla BLUD, riposti in freezer all'interno di sacchetti riutilizzabili e, in seguito, in sacchetti in polietilene monouso. Le nuove procedure utilizzano un solo sacchetto per conservare l'aliquota, riducendo così anche la possibilità di contaminazione durante il trasporto alla BLUD.

Fino ad ottobre 2023 venivano forniti dispositivi "destinati all'utilizzo da parte di una singolo utente", quindi monopaziente, che, al termine della donazione, venivano ritirati e ricondizionati dal personale della BLUD. Tale trattamento, che prevedeva una termo disinfezione a 93°C per 10 minuti, non si è però rivelato efficace contro l'eventuale presenza di spore che non vengono eliminate a quelle temperature.

Una delle mamme era risultata colonizzata sia a livello ascellare e sia al seno ed il latte che aveva raccolto risultava positivo per *Bacillus*, probabilmente perché lo scongelamento del freezer aveva comportato un passaggio del microrganismo dagli alimenti congelati e poi per malfunzionamento scongelati al flaconcino del latte raccolto.

Il *Bacillus* della donatrice positiva è risultato identico a quello presente nel flacone di latte raccolto, nel trasportino per consegna alla BLUD, e anche nel tampone ambientale raccolto sulla parete interna del frigo della BLUD stoccato in attesa di eseguire il pool. Questa

contaminazione si è verificata probabilmente a domicilio perché non sono state rispettate le indicazioni sulla sterilizzazione del dispositivo dopo ogni estrazione di latte.

Nel libretto di istruzione del tiralatte, viene indicato che il contenitore possa essere lavato in lavastoviglie e come metodo di sterilizzazione viene consigliata solo la bollitura. Questo metodo però, non solo non dovrebbe essere consigliato per questo tipo di materiali, ma anche perché eventuali spore presenti potrebbero resistere e riattivarsi rischiando di contaminare anche altri ambienti.

Nei controlli ambientali per capire dove potesse essere localizzata la contaminazione sono state verificate anche le temperature di funzionamento del pastorizzatore risultate poi nella norma.

La chiusura della banca, in attesa dei risultati che garantissero la sicurezza della manipolazione del latte, è stata decisa dalla direzione medica dopo un incontro urgente con il CIO e i bambini sono stati alimentati per un paio di mesi con latte in formula. Sono stati eliminati 52 litri di latte donato complessivi.

La contaminazione è stata causata da un errore di gestione del tiralatte e da uno stoccaggio del campione raccolto, senza rispettare corretti passaggi di lavaggio e sterilizzazione del kit tiralatte. Sono state quindi apportate delle modifiche ai protocolli di gestione del latte in BLUD:

- La modifica nelle modalità di trasporto e ricevimento dei campioni, non più direttamente in reparto ma in BLUD, ha permesso di ridurre considerevolmente il rischio di un'ulteriore espansione della contaminazione da parte delle spore di *Bacillus*.
- Una più accurata pulizia di contenitori e cambio degli stessi al momento dell'accettazione dei campioni di latte donato impedisce la disseminazione di batteri potenzialmente sporigeni;
- L'impiego di nuovi disinfettanti e l'attivazione di procedure di sanificazione con perossido;
- Rinforzo del corso teorico pratico di formazione per le potenziali donatrici;
- L'aumento del numero di controlli microbiologici sul latte pre e post pastorizzazione;
- Un monitoraggio microbiologico periodico ambientale dell'aria e delle superfici della BLUD.

Analizzando il periodo precedente con presenza di *B. cereus* con quello successivo si è riusciti a non eliminare aliquote di latte donato e a sterilizzare l'ambiente utilizzato per la preparazione nella BLUD.

Conclusioni

In questa tesi si evidenzia come di fronte ad un problema di contaminazione del latte donato controllando da un punto di vista microbiologico le aliquote delle singole donatrici prima e dopo la pastorizzazione è possibile eliminare eventuale latte positivo per batteri prima che venga somministrato ai bimbi prematuri.

Per le mamme che possono avere contaminato il latte donato è necessario fare i controlli periodici ematochimici e un corso di formazione sulle modalità di prelievo e raccolta del latte a domicilio.

Le misure attuate in collaborazione con il CIO aziendale hanno permesso di eliminare la pericolosa contaminazione, di evitare infezioni nei prematuri.

Per poter riaprire la BLUD aziendale in sicurezza è stata acquistata una cappa Biohazard che protegge i campioni da contaminazioni per l'allestimento dei pool.

Dopo l'introduzione di tutte le misure di pulizia e controlli microbiologici non è stato più necessario eliminare latte donato, evitando un enorme spreco (52 litri complessivi), oltre a tutto il lavoro di raccolta e conservazione necessario per i flaconi.

Non è stato più necessario ricorrere al latte artificiale per alimentare i bambini prematuri.

È essenziale disporre di un protocollo condiviso in Europa per la gestione del latte nelle BLUD, che attualmente non è disponibile. Nella nostra esperienza è stato seguito un protocollo raccomandato dalla Human milk banking association del nord America e con le best practices descritte da Froh et al.

Sarebbe auspicabile che ci fosse una uniformità di applicazione delle buone pratiche in tutte le Banche del latte.

L'applicazione di tutti questi interventi multisetoriali e la costituzione di un gruppo di lavoro multidisciplinare è in grado di ridurre il rischio di contaminazione del latte da germi sporigeni e quindi di utilizzare il latte donato con il suo prezioso apporto nutritivo per i prematuri. Si sottolinea l'importanza di eseguire oltre ad una attenta disinfezione ambientale controlli periodici controlli microbiologici frequenti e accurati.

ICONOGRAFIA

- [1] <https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/spore-batteriche-e-sporulazione-generalita-e-descrizione-del-processo/>
- [2] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33745375/>
- [3] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35138121/>
- [4] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7158362/>
- [5] <https://diagnostics.biogenetics.it/assets/Uploads/09-catalogo-tamponi-Copan.pdf>
- [6] https://www.medela.com/010-products/010-pumps/030-manual/010-harmony---manual-breast-pump/pdf-downloads/101041806-2021-05-b-harmony_flex_ifu-de_fr_it_nl_el-low.pdf
- [7] <https://www.medicalbuyer.co.in/bruker-launches-maldi-biotyper-sirius/>
- [8] https://www.aulss8.veneto.it/wp-content/uploads/2023/06/11614-GIOSEPT_FOAM_scheda_tecnica.pdf
- [9] https://www.aulss8.veneto.it/wp-content/uploads/2023/06/12968-DUOXIL_AC_scheda_tecnica.pdf
- [10] https://www.eucast.org/clinical_breakpoints

BIBLIOGRAFIA

1. Mallardi D, Piemontese P, Liotto N, Colombo RM, Dodaro A, Schiavello A, Tabasso C, Plevani L, Bezze E, Menis C, Roggero P, Mosca F. *New Operating Approach to Limit Bacillus Cereus Contamination of Donor Human Milk*. J Hum Lact. 2022 Feb;38(1):102-107. doi: 10.1177/08903344211002563. Epub 2021 Mar 21. PMID: 33745375. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33745375/>
2. Larry M. Bush, MD, FACP, Charles E. Schmidt College of Medicine, Florida Atlantic University. *Panoramica sui batteri*. Merck & Co., Inc. Rev. 2022 Aug. https://www.msmanuals.com/it-it/casa/infezioni/infezioni-batteriche-panoramica/panoramica-sui-batteri#Infezioni-batteriche_v38401607_it
3. Murray Patrick R.; Rosenthal Ken S.; Pfaller Michael A. *Microbiologia Medica*. Settima edizione, Murray – Edra Masson; 2013.
4. Ehling-Schulz M. Lereclus D. Koehler TM. 2019. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. Microbiol Spectr 7:10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>
5. Giuseppe Nicoletti. *Dizionario di batteriologia umana, normale e patologica*. Terza edizione, Menarini; 2003.
6. Lotte R, Chevalier A, Boyer L, Ruimy R. *Bacillus cereus Invasive Infections in Preterm Neonates: an Up-to-Date Review of the Literature*. Clin Microbiol Rev. 2022 Apr 20;35(2):e0008821. doi: 10.1128/cmr.00088-21. Epub 2022 Feb 9. PMID: 35138121; PMCID: PMC8826972. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8826972/>
7. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. *How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review*. BMC Infect Dis. 2006 Aug 16;6:130. doi: 10.1186/1471-2334-6-130. PMID: 16914034; PMCID: PMC1564025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16914034/>
8. Outurquin G, Obin O, Petit A, Weiss R, Léké A, Adjidé C, Mullié C. *Bacillus cereus strains from donor human milk and hospital environment: uncovering a putative common origin using comparative analysis of toxin and infra-red spectroscopy profiles*.

AIMS Microbiol. 2023 May 4;9(3):419-430. doi: 10.3934/microbiol.2023022. PMID: 37649803; PMCID: PMC10462457. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37649803/>

9. Santaniello Maria Luisa, Vitale Assunta, Nosari Norberto. *L'importanza della banca del latte umano nell'alimentazione del prematuro. Gli infermieri dei bambini.* GISIP 2012;4(4):130-132.

10.

<https://www.salute.gov.it/portale/allattamento/dettaglioContenutiAllattamento.jsp?lingua=italiano&id=5249&area=allattamento&menu=comefare> ULTIMO ACCESSO 20 MARZO 2024

11. https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab_1

12. <https://allattandovi.it>

13. <https://intra.aulss8.veneto.it/allegati/12655-TABELLA%20MODALITA'%20DECONTAMINAZIONE%20E%20DISINFEZIONE%20DI%20SPOSITIVI%20E%20SUPERFICI.PDF>.

14. Moro M.L., Nascetti Simona, Morsillo F., Giordani S., Resi Davide, Pompa Maria Grazia, Salcuni Pasquale, Greco D., Scassa E., Cauzillo G., Barone R., Pizzuti R., Simon G., Ippolito Giuseppe, Puro V, Vizio M., Pavan Anna, Bernieri F., Maffei C.M., D'Errico Marcello M, Rago S., Patriarchi R., Zotti Carla Maria, Di Pietrantonj Carlo, Prato Rosa, Mura M., Maniaci L., Cantaro SP, Poli A., Privitera Gaetano, Fiorio M., Montedori Alessandro, Sacco R., Spolaore P., Santa P.J, Fabbri L. *Annali di igiene medicina preventiva e di comunita'* Volume 21 Suppl. 1 al N. 1-Gennaio-Febbraio 2009 pubblicazione bimestrale a cura della Sezione di Igiene "vittorio puntoni"; Dip. di Scienze di Sanità pubblica "G. Sanarelli" Sapienza, Università di Roma.

https://www.researchgate.net/profile/Pasquale-Salcuni-2/publication/324909386_ANNALI_DI_IGIENE_MEDICINA_PREVENTIVA_E_DI_COMMUNITA'_Volume_21_Suppl_1_al_N_1-GENNAIO-FEBBRAIO_2009_publicazione_bimestrale_a_cura_della_Sezione_di_Igiene_vittorio_puntoni_Dip_di_Scienze_di_Sanita_pub/links/5aeabfa20f7e9b837d3c4503/ANNALI-DI-IGIENE-MEDICINA-PREVENTIVA-E-DI-COMUNITA'-Volume-21-Suppl-1-al-N-1-GENNAIO-FEBBRAIO-2009-publicazione-bimestrale-a-cura-della-Sezione-di-Igiene-vittorio-puntoni-Dip-di-Scienze-di-Sanita-pubb.pdf

15. Mohapatra S. *Sterilization and Disinfection. Essentials of Neuroanesthesia*. 2017:929–44. doi: 10.1016/B978-0-12-805299-0.00059-2. Epub 2017 Mar 31. PMID: PMC7158362. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7158362/pdf/main.pdf>
16. Carpin Riccardo. *Sistemi per il lavaggio dei dispositivi medici riutilizzabili*. 2014. <https://hdl.handle.net/20.500.12608/16007>
17. Tom Toi. *What's The Difference Between Sanitising, Disinfecting And Sterilising?* MES Australia. 2020 Oct. <https://www.mesaustralia.com.au/blogs/news/whats-difference-between-sanitising-disinfecting-and-sterilising#:~:text=While%20the%20sanitisation%20reduces%20the,preventing%20bacterial%20growth%20and%20reproduction>
18. Kate F. Hurley, Lila Miller, Stephanie Janeczko. *Infectious Disease Management in Animal Shelters*. Seconda edizione, Wiley; 2021. https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=sRc4DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA49&dq=sanitization+and+disinfection&ots=V18vmwZOPg&sig=tw2S6KADoZHo67n3MTg5rdwM-wQ&redir_esc=y#v=onepage&q=sanitization%20and%20disinfection&f=true
19. Rutala WA, Weber DJ. *New disinfection and sterilization methods*. *Emerg Infect Dis*. 2001 Mar-Apr;7(2):348-53. doi: 10.3201/eid0702.010241. PMID: 11294738; PMID: PMC263172 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2631727/pdf/11294738.pdf>
20. Normand AC, Cassagne C, Gautier M, Becker P, Ranque S, Hendrickx M, Piarroux R. *Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases*. *BMC Microbiol*. 2017 Jan 31;17(1):25. doi: 10.1186/s12866-017-0937-2. PMID: 28143403; PMID: PMC5282874. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5282874/#:~:text=A%20score%20%3E%202.3%20indicates%20%20highly,1.7%20indicates%20%20unreliable%20identification>