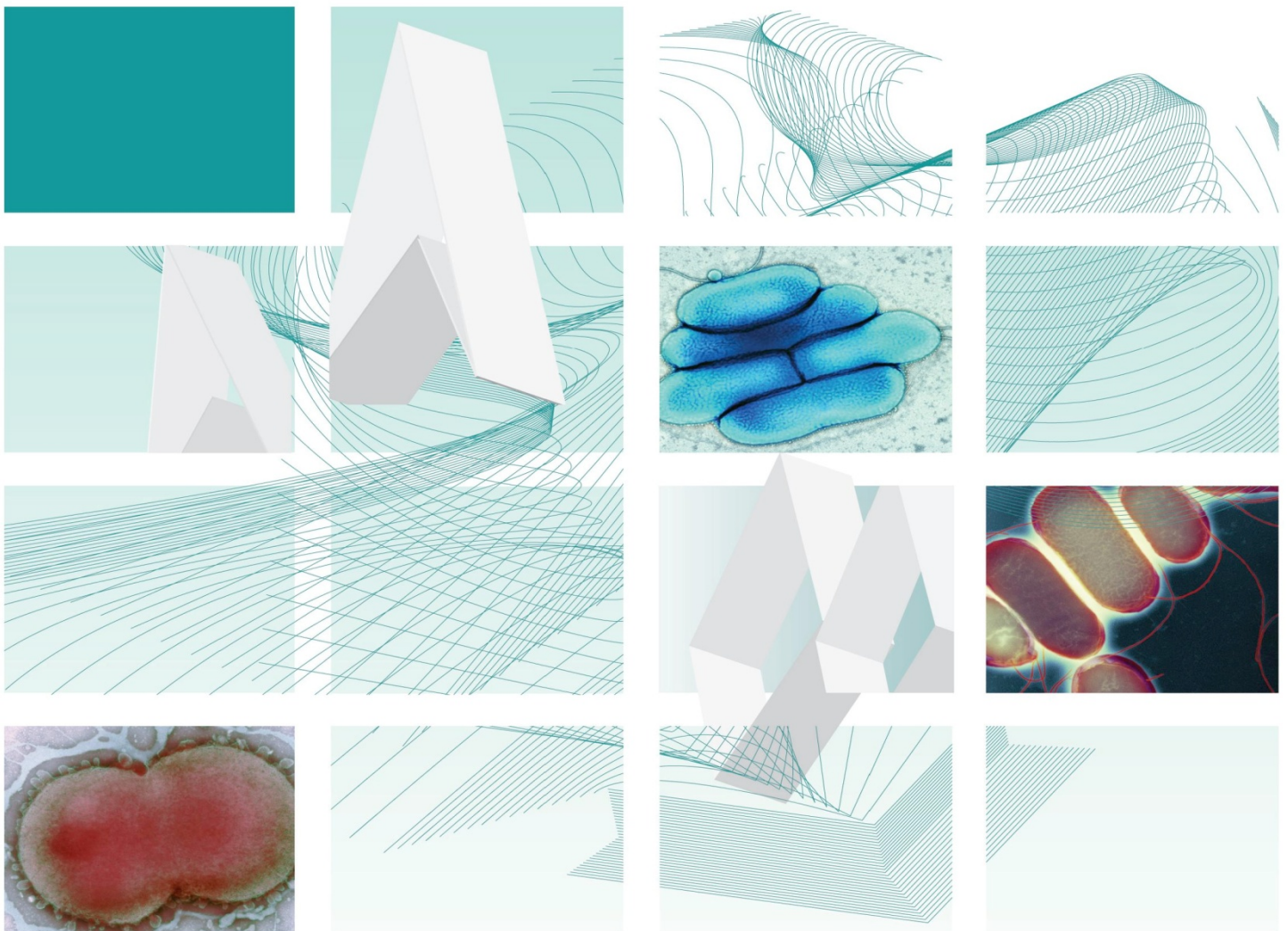




Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Test per l'Indolo



Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Public Health England (PHE) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <https://www.gov.uk/government/groups/standards-for-microbiology-investigations-steering-committee>).

Si ringraziano per contributi forniti i numerosi operatori dei laboratori clinici, gli specialisti e i laboratori di riferimento che hanno fornito informazioni e commenti durante lo sviluppo di questo documento. Si ringraziano i Revisori Medici per le modifiche apportate ai contenuti clinici.

Per ulteriori informazioni contattare:

Standards Unit
Microbiology Services
Public Health England
61 Colindale Avenue
London NW9 5EQ

E-mail: standards@phe.gov.uk

Website: <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche sono sviluppate con la collaborazione di:



I loghi sono aggiornati al momento della pubblicazione

Contenuti

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| RINGRAZIAMENTI..... | 2 |
| CONTENUTI | 3 |
| TABELLA MODIFICHE | 4 |
| RICERCHE MICROBIOLOGICHE STANDARD DEL REGNO UNITO: SCOPO E OBIETTIVO..... | 5 |
| SCOPO DEL DOCUMENTO | 8 |
| INTRODUZIONE..... | 8 |
| INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI..... | 8 |
| 1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA | 10 |
| 2 REAGENTI E STRUMENTAZIONE | 10 |
| 3 MICORGANISMI PER CONTROLLO DI QUALITA' | 10 |
| 4 PROCEDURA E RISULTATI | 11 |
| APPENDICE: TEST PER INDOLO | 12 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 13 |



NICE ha accreditato la procedura usata dalla Public Health England per elaborare gli Standards for Microbiology Investigations. L'accreditamento è valido per 5 anni dal Luglio 2011. Informazioni più dettagliate sull'accreditamento possono essere consultate: www.nice.org.uk/accreditation.

Per ulteriori informazioni sul nostro accreditamento consultare: : www.nice.org.uk/accreditation

Tabella delle Modifiche

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso la standards@phe.gov.uk.

I documenti nuovi o revisionati devono essere controllati in ciascun laboratorio in accordo con il sistema locale di gestione della qualità.

| | |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Modifica No/Data. | 6/21.11.14 |
| Emissione eliminata. no | 2.3 |
| Emissione inserita no. | 3 |
| Sezione(i) interessate | Modifica |
| Documento intero . | Collegamenti ipertestuali aggiornati al gov.uk. |
| Pagina 2 | Loghi aggiunti aggiornati. |
| Introduzione | Aggiornata per includere il diagramma della degradazione dell'aminoacido triptofano con bibliografia. |
| Informazione Tecnica/Limitazioni | Questa sezione è stata aggiornata e bibliografia aggiunta. |
| Considerazioni sulla sicurezza | Sezione aggiornata. |
| Reagenti/Strumentazione | Aggiornato con bibliografia. |
| Procedure e Risultati | Questi sono stati aggiornati con bibliografia. |
| Diagramma di flusso | Questo è stato modificato per facilitare l'orientamento |
| Bibliografia | Bibliografia in parte aggiornata |

Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito[#]: Scopo e Obiettivo

Utilizzatori delle SMI

- Nel Regno Unito le SMI sono principalmente destinate come risorsa generale ai professionisti che operano nel campo della medicina di laboratorio e delle malattie infettive.
- Le SMI forniscono ai clinici informazioni in merito allo standard dei servizi di laboratorio riferibili alle ricerche per la diagnosi delle infezioni nei loro pazienti e le documentazioni forniscono indicazioni che facilitano la prenotazione elettronica di tests appropriati.
- Le SMI forniscono gli standard per le ricerche microbiologiche anche ai responsabili della sanità pubblica che devono considerarle come parte delle procedure da adottare per la salute (sia clinica che pubblica) per la propria popolazione.

Informazioni di Base per le SMI

Le SMI comprendono algoritmi e procedure raccomandate che riguardano tutte le componenti del processo diagnostico dalla fase pre-analitica (sindrome clinica) alle diverse fasi analitiche (prove di laboratorio) e post-analitiche (interpretazione e comunicazione dei risultati).

Gli algoritmi delle sindromi sono corredati da informazioni più dettagliate contenenti consigli sulle indagini per specifiche malattie e infezioni. Note orientative riguardano il contesto clinico, la diagnosi differenziale e indagini appropriate per particolari condizioni cliniche. Le note orientative descrivono metodologie di laboratorio essenziali che sono alla base della qualità, ad esempio la validazione della prova.

La Standardizzazione del processo diagnostico conseguente all'adozione delle SMI consente di garantire in tutto il Regno Unito strategie d'indagine equivalenti nei diversi laboratori ed è una condizione essenziale per interventi nel campo della sanità pubblica, della sorveglianza, e per le attività di ricerca e di sviluppo.

Collaborazione Paritaria

La preparazione e stesura delle SMI è effettuata mediante collaborazione paritaria fra PHE, NHS, Royal College of Pathologists e le organizzazioni professionali.

L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito at <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>.

L'inclusione del logo di una organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del comitato direttivo e dei Gruppi di Lavoro che sviluppano le SMI. Le opinioni dei rappresentanti possono non essere rigorosamente conformi a quelle dei membri delle organizzazioni a cui appartengono né a quelle delle loro organizzazioni. I rappresentanti prescelti rappresentano uno strumento bidirezionale per la consultazione e dialogo. Le opinioni espresse sono ricercate con un processo di consultazione.

Le SMI sono sviluppate, revisionate ed aggiornate con un ampio processo di consultazione

[#] Microbiologia è usato come termine generico per includere le due specialità di Microbiologia Medica riconosciute dal GMC (General Medical Council), (che comprende Batteriologia, Micologia e Parassitologia) e la Virologia Medica.

Assicurazione di Qualità

Il NICE (National Institute for Health and Care Excellence) ha accreditato la procedura utilizzata dai Gruppi di Lavoro per produrre le SMI. L'accREDITamento è applicabile a tutte le linee guida prodotte dall'Ottobre del 2009. La procedura per lo sviluppo delle SMI è certificata dalla ISO 9001:2008.

Le SMI rappresentano una procedura standard di buona qualità pratica alla quale si devono attenere per la propria attività tutti i laboratori di microbiologia clinica e di sanità pubblica del Regno Unito. Le SMI sono accreditate dal NICE e non rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio disponibili nel Regno Unito. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche addizionali qualora opportune. Le SMI aiutano i laboratori a soddisfare i requisiti dell'accREDITamento con la promozione di procedure d'elevata qualità che possono essere verificate. Le SMI forniscono inoltre un punto di riferimento per lo sviluppo del metodo.

Le prestazioni della SMI dipendono dal personale ben addestrato e dalla qualità dei reagenti e delle attrezzature utilizzate. I laboratori dovrebbero assicurare che tutti i reagenti di tipo commerciale e quelli messi a punto in laboratorio siano stati validati e risultati idonei allo scopo. I laboratori devono partecipare a programmi di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

Coinvolgimento del Paziente e della Comunità

Nello sviluppo delle SMI i rispettivi Gruppi di Lavoro sono impegnati per favorire il coinvolgimento dei pazienti e dell'opinione pubblica. Grazie al coinvolgimento pubblico, di operatori sanitari, ricercatori e organizzazioni di volontariato la SMI risultante sarà strutturalmente valida e atta a soddisfare le esigenze dell'utente. L'opportunità di partecipazione per contribuire alla consultazione è estesa al pubblico con l'accesso libero al nostro sito web

Informazione della Gestione e dei Dati Sensibili

La PHE è un'organizzazione che condivide le direttive Caldicott. Ciò significa prendere ogni possibile precauzione per prevenire la diffusione non autorizzata di informazioni sui pazienti e di garantire che le informazioni relative agli stessi siano mantenute in condizioni di sicurezza.

Lo sviluppo di metodi SMI è soggetto agli obiettivi PHE di Uguaglianza.

<https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/equality-and-diversity>.

I Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità di consultazione efficace con gli appartenenti al pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialistici coinvolti.

Dichiarazione Legale

Mentre ogni cura è stata intrapresa per la preparazione delle SMI, PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, deve, per quanto possibile in base a qualunque legge vigente, escludere la responsabilità per tutte le perdite, costi, reclami, danni o spese derivanti da o connessi all'uso di una SMI o con qualsiasi informazione ivi contenuta. Se si apportano modifiche a una SMI, si deve porre in evidenza dove e da chi sono state effettuate tali modifiche.

Le conoscenze di base e la tassonomia microbica per la SMI sono le più complete possibili, al momento della pubblicazione. Eventuali omissioni e nuove informazioni saranno considerate nel corso della prossima revisione. Queste procedure standard (SMI) possono essere sostituite solo da revisioni dello standard, azione legislativa, o in seguito ad indicazioni da parte dell'ente accreditato NICE.

I diritti d'autore delle SMI sono della "Crown" e questi dovrebbero essere riconosciuti quando appropriato.

Citazione Suggestita per questo Documento

Public Health England. (2014). Indole Test. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 19 Emissione 3. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

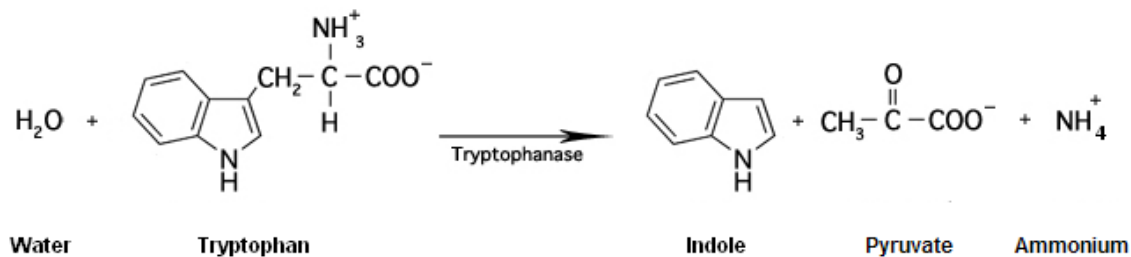
Scopo del Documento

Il test dell'indolo rileva produzione di triptofanasi e contribuisce alla differenziazione delle Enterobacteriaceae e di altri generi.

Questa SMI deve essere usata congiuntamente alle altre SMI

Introduzione

Il test dell'indolo determina la capacità di un microrganismo di produrre indolo degradando l'aminoacido triptofano. Questo composto è idrolizzato dalla triptofanasi determinando la formazione di tre possibili prodotti finali - uno dei quali è indolo, gli altri sono piruvato e ammonio¹.



L'indolo produce un composto colorato quando si combina con alcune aldeidi².

Sono descritti due metodi per la rilevazione d'indolo: uno spot test, che rileva microrganismi a rapida produzione e un test in provetta convenzionale, che richiede una notte d'incubazione e identifica microrganismi a lenta produzione.

Informazioni Tecniche / Limitazioni

Se si utilizza brodo peptone e non brodo triptofano, controllare il lotto con ceppo batterico positivo per verificare l'idoneità per la produzione d'indolo dal brodo peptone. Il motivo del controllo è dovuto al fatto che commercialmente sono disponibili diversi terreni contenenti peptone, e alcuni di loro non sono adatti per la produzione d'indolo per contenuto insufficiente di triptofano

I microrganismi da saggiare per l'indolo con il metodo dello spot devono essere cresciuti su terreno contenente triptofano (ad esempio agar sangue) e mai in agar MacConkey perché contiene indicatori di pH e lattosio per la pigmentazione delle colonie positive che rendono difficile l'interpretazione cromatica della reazione¹. Il test può essere effettuato anche su alcuni agar cromogeni³.

Non devono essere utilizzati terreni contenenti peptone e glucosio perché la produzione di acido può inibire la produzione di indolo per cambiamento di pH⁴.

Gli anaerobi, in particolare specie *Clostridium*, formano indolo, ma questo prodotto può essere rapidamente catabolizzato; pertanto possono verificarsi reazioni falsamente negative.

Le colture che devono essere saggiate per l'indolo devono essere incubate in condizioni aerobiche perché una diminuzione della tensione di ossigeno diminuisce la sua produzione¹.

L'indolo è un prodotto diffusibile. Per evitare questa possibilità, selezionare per il test una colonia ben isolata.

Il reattivo di Ehrlich, alternativa a quello di Kovács, contiene Dimetilamino-benzaldeide (DMAB), che reagisce con l'indolo per produrre un composto di colore rosso. La formulazione di Ehrlich è più sensibile, ma contiene solventi supplementari tossici o infiammabili; quest'ultima è raccomandata per i test su gruppi batterici che producono poco indolo, quali i bacilli fermentanti o anaerobi. Il reagente di Kovács è più stabile e l'assenza di estrazione organica addizionale (richiesta dal reattivo di Ehrlich) rende la sua formulazione più adatta per i laboratori⁵.

1 Considerazioni sulla Sicurezza⁶⁻²²

Fare riferimento alle attuali linee guida sulla manipolazione sicura di tutti i microrganismi e reagenti descritti in questa SMI.

Tutte le procedure che possono generare aerosol devono essere eseguite in cabina microbiologica di sicurezza.

Quando il reagente di Kovac deve essere preparato prima dell'uso, il personale deve prestare la massima attenzione perché uno dei principali ingredienti utilizzati è l'acido cloridrico concentrato, un prodotto molto corrosivo.

Il reattivo di Kovac per l'idolo è una sostanza irritante

Le linee guida precedentemente esplicitate devono essere supplementate con la COSHH locale e con la valutazione del rischio.

E' essenziale la conformità alle normative postali e dei trasporti.

2 Reagenti e Strumentazione

Colonie isolate su terreno solido

Metodo in provetta

Brodo triptofano 1% o brodo peptone.

Reagente di Kovac (per l'uso con colture in brodo).

Ansa batteriologica a filo diritto/ansa (preferibilmente di nichelcromo) o, in alternativa, monouso

Spot test per indolo

Carta da filtro Whatman no. 1

Utilizzare confezione commerciale e seguire le istruzioni del produttore.

Ansa batteriologica con filo metallico diritto/ansa (preferibilmente nichelcromo) o, in alternativa, ansa monouso

Piastra di petri

3 Microrganismi per Controllo di Qualità

Controllo positivo

Escherichia coli NCTC 10418

Controllo negativo

Proteus mirabilis NTCT 10975

Nota: I ceppi di riferimento sono stati validati dalla NCTC per questa prova.

4 Procedura e Risultati

4.1 Colture in brodo^{1,23}

- Inoculare il brodo triptofano (o peptone) con il microrganismo di prova e incubare a 37° C per ore 24-48.
- Aggiungere 0.5 ml di reagente di Kovac e agitare delicatamente.
- Esaminare lo strato superiore de liquido.

Risultato positivo

Colore rosa o rosso (si manifesta di pochi secondi).

Risultato negativo

Nessun cambiamento di colore, il reagente rimane giallo o lievemente torbido.

4.2 Spot test²⁴

- Posizionare un pezzo di carta da filtro (Whatman n.1) in una piastra di Petri sterile e inumidire con il reagente per l'indolo o, se si utilizza carta da filtro commerciale pre-preparata contenente il reagente indolo, lasciare adattare alla temperatura ambiente prima dell'uso
- Strisciare con un'ansa sterile una colonia pura isolata (da coltura di 18 -24 ore) sulla superficie satura della carta da filtro
- Esaminare immediatamente

Risultato positivo

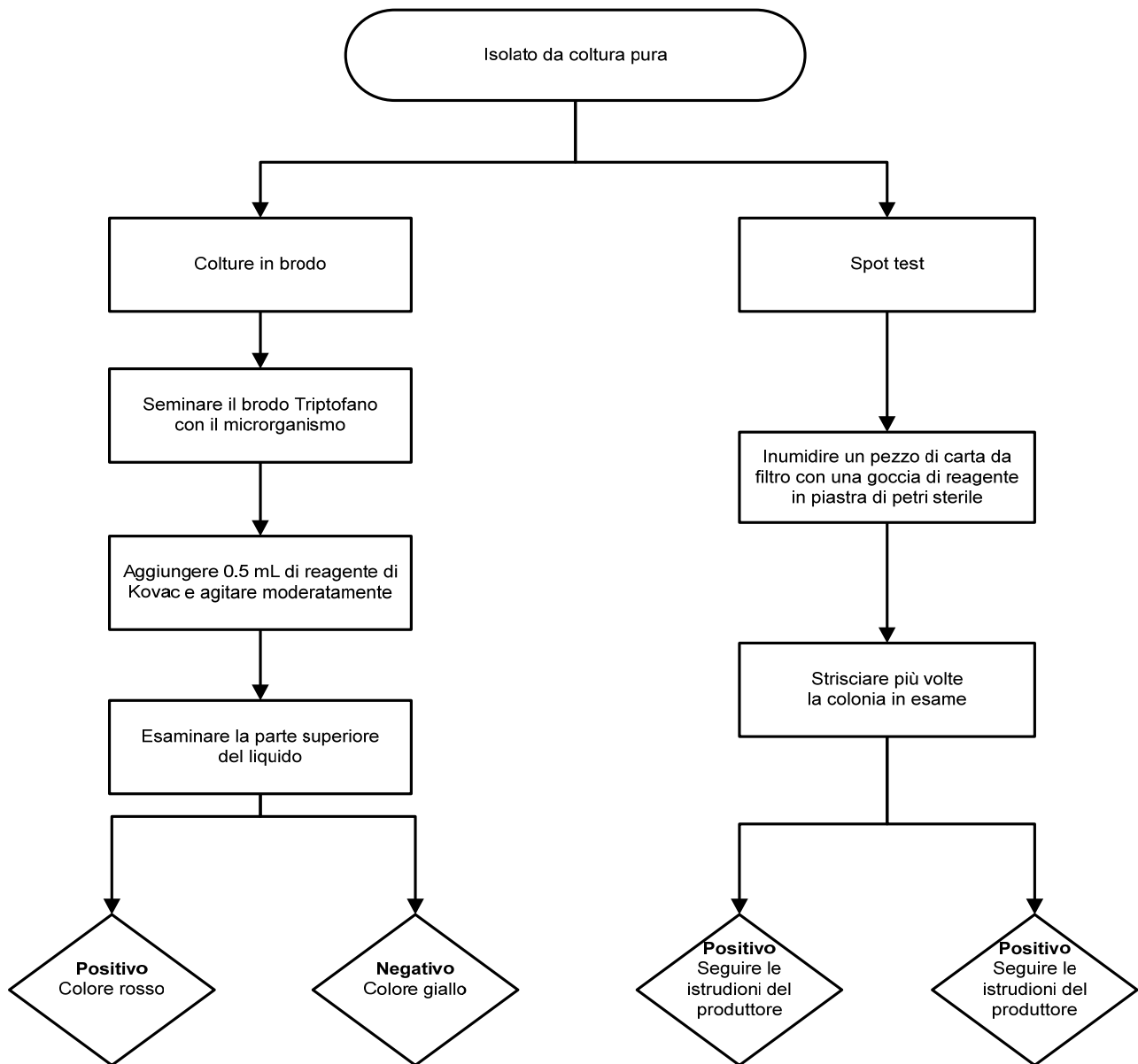
Seguire le istruzioni e le interpretazioni del produttore.

Risultato negativo

Seguire le istruzioni e le interpretazioni del produttore.

Nota: Possono essere anche utilizzate le confezioni commerciali API per determinare se un microrganismo è indolo positivo o negativo.

Appendice: Test per l'Indolo



Controllo positivo: *Escherichia coli* NCTC 10418

Controllo negativo: *Proteus mirabilis* NCTC 10975

Il Diagramma di Flusso è solo indicativo

Bibliografia

1. MacFaddin JF. Indole Test. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p. 221-32.
2. Bailey and Scott's. Diagnostic Microbiology. In: Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, editors. 11th ed. St Louis: Mosby Inc; 2002. p. 152-3.
3. Perry JD, Butterworth LA, Nicholson A, Appleby MR, Orr KE. Evaluation of a new chromogenic medium, Uriselect 4, for the isolation and identification of urinary tract pathogens. J Clin Pathol 2003;56:528-31.
4. Epps HM, Gale EF. The influence of the presence of glucose during growth on the enzymic activities of *Escherichia coli*: comparison of the effect with that produced by fermentation acids. Biochem J 1942;36:619-23.
5. MacWilliams, M. Indole Test Protocol. American Society for Microbiology Peer-reviewed. 2013.
6. European Parliament. UK Standards for Microbiology Investigations (SMIs) use the term "CE marked leak proof container" to describe containers bearing the CE marking used for the collection and transport of clinical specimens. The requirements for specimen containers are given in the EU in vitro Diagnostic Medical Devices Directive (98/79/EC Annex 1 B 2.1) which states: "The design must allow easy handling and, where necessary, reduce as far as possible contamination of, and leakage from, the device during use and, in the case of specimen receptacles, the risk of contamination of the specimen. The manufacturing processes must be appropriate for these purposes".
7. Official Journal of the European Communities. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. 7-12-1998. p. 1-37.
8. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
9. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
10. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
11. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
12. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
13. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
14. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
15. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological Agents: Managing the Risks in Laboratories and Healthcare Premises. Appendix 1.2 Transport of Infectious Substances - Revision. Health and Safety Executive. 2008.
16. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. MMWR Surveill Summ 2012;61:1-102.

17. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed. HSE Books; 2002.
18. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
19. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
20. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
21. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
22. British Standards Institution (BSI). BS 5726:2005 - Microbiological safety cabinets. Information to be supplied by the purchaser and to the vendor and to the installer, and siting and use of cabinets. Recommendations and guidance. 24-3-2005. p. 1-14
23. Feltham RKA, Barrow GI. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2003. p. 219-30- 231.
24. Miller JM, Wright JW. Spot indole test: evaluation of four reagents. J Clin Microbiol 1982;15:589-92.