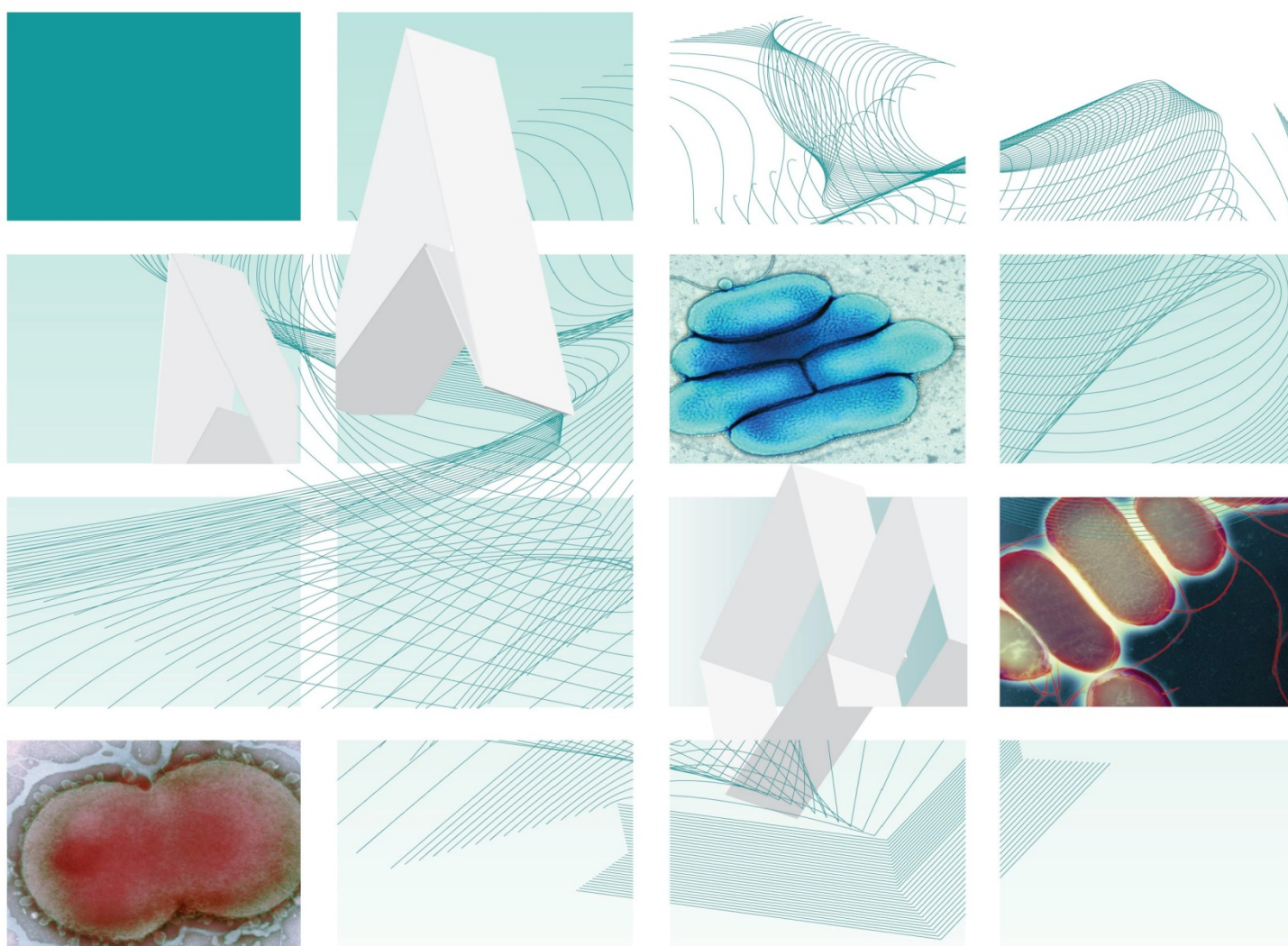




Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Test dell'Ossidasi



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.

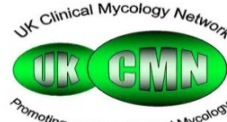
Per ulteriori informazioni contattare:

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 MICRORGANISMI PER CONTROLLO DI QUALITA'	10
4 PROCEDURA E RISULTATI	11
APPENDICE: TEST DELL'OSSIDASI	13
BIBLIOGRAFIA	14



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.	6/06.01.15
Emissione eliminata. no	2.3
Emissione inserita no.	3
Sezione(i) interessate	Modifica
Documento intero .	Collegamenti ipertestuali aggiornati a gov uk.
Pagina 2	Loghi aggiornati e aggiunti.
Introduzione	Questa sezione è stata aggiornata e aggiunta bibliografia.
Informazione Tecnica/Limitazioni	Questa sezione è stata aggiornata e aggiunta bibliografia.
Considerazioni sulla Sicurezza	Informazione e bliografia aggiornate.
Reagenti/Strumentazione	Questa sezione è stata aggiornata e aggiunta bibliografia.
Microrganismi Controllo di Qualità	I microrganismi di controllo sono stati validati dalla NCTC.
Procedure e risultati	Informazione e bibliografia aggiornate.
Diagramma di flusso	Questo diagramma di flusso è stato modificato per facilitare la consultazione.
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 <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. (2015). Oxidase Test. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 26 Emissione 3. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Scopo del Documento

Il test ossidasi è utilizzato per determinare se un microrganismo possiede l'enzima citocromo ossidasi. Il test usato come aiuto per la differenziazione di *Neisseria*, *Moraxella*, specie *Campylobacter* e *Pasteurella* (ossidasi-positiva). E' pure utilizzato per differenziare pseudomonadi da specie affini.

Tutte le specie *Pseudomonas* e *Neisseria* sono ossidasi positive tranne poche specie *Pseudomonas* che sono ossidasi negative. *Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas viridiflava* sono entrambe ossidasi negative¹.

Questa SMI deve essere usata congiuntamente con le altre SMI.

Introduzione

I batteri ossidasi positivi possiedono citocromo ossidasi o indofenolo ossidasi (un'emoproteina contenente ferro)³. Entrambe le molecole catalizzano il trasporto di elettroni da composti donatori (NADH) ad accettori di elettroni (di solito ossigeno).

Il reagente, *N, N, N', N'-tetra-metil-p-fenilendiammina dicloridrato* funge da accettore artificiale di elettroni per l'enzima ossidasi. Il reagente ossidato forma il composto colorato blu indofenolo.

Il sistema citocromo è solitamente presente solo nei microrganismi aerobi capaci di utilizzare l'ossigeno come recettore finale dell'idrogeno. Il prodotto finale di questo metabolismo è o acqua o perossido di idrogeno (scisso dalla catalasi)¹.

Sono disponibili molti metodi per il test ossidasi. Questi includono, ma non sono limitati solo a questi, il test su carta da filtro, metodo diretto in piastra, il metodo con tampone, il test con striscia impregnata di ossidasi e quello in provetta. I tempi e le concentrazioni si avvalgono delle raccomandazioni specifiche originali².

Informazioni Tecniche / Limiti

La prova non deve essere eseguita su colture da terreni contenenti tellurito e carboidrati fermentabili in quanto questi possono impedire la reazione³.

I batteri coltivati su terreni contenenti coloranti possono dare risultati anomali².

Le colture più vecchie hanno un metabolismo meno attivo e i loro risultati non sono affidabili⁴. Utilizzare una coltura recente, cresciuta su una piastra di agar o becco di clarino di agar, preferibilmente da 0 a 24 ore².

Utilizzando anse di nickel, acciaio e di altro tipo si possono ottenere risultati falsi positivi e ciò è dovuto alla formazione di prodotti di ossidazione formati sulla superficie durante la sterilizzazione con la fiamma¹. E' importante utilizzare per il trasferimento solo anse platino o materiali inerti quali bastoncini di legno sterili, anse di plastica sterili, tamponi sterili, ecc².

Alcuni filtri di carta sviluppano colore blu e questi non devono essere utilizzati³.

L'uso di dischi / strisce commerciali impregnati di ossidasi elimina la necessità di utilizzare reagenti di preparazione recente¹.

Tutti i reagenti dovrebbero essere preparati poco prima dell'uso; in soluzione si disattivano rapidamente. Rimangono stabili quando refrigerati e ciò contribuisce a ridurre l'auto ossidazione e prolunga la persistenza della loro attività. Tutti i reagenti e dischi / strisce devono essere conservati

in frigorifero (4 ° C), quando non in uso, e riscaldati prima dell'esecuzione del test¹. Tuttavia, le soluzioni preparate con 0,1% di acido ascorbico possono essere conservate a -20° C e scongelate solo quando necessarie⁴.

1 Considerazioni sulla Sicurezza⁶⁻²²

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

Il reagente ossidasi di Kovac, soluzione acquosa 1% di N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiammina dicloridrato è meno tossico e più sensibile della soluzione al 6% di N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiammina in dimetil solfossido (DMSO), ma più costosa e relativamente instabile¹.

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

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.

Reagenti e Strumentazione

Colonie batteriche isolate cresciute su terreno solido.

Reagente ossidasi di Kovac: 1% di N, N, N', N'-tetra-metil-p-fenilendiammina dicloridrato in acqua distillata (incolore)².

Nota: La soluzione reagente si auto-ossida rapidamente e così pure quella recente; dovrebbe essere utilizzata quella non più vecchia di 1 settimana o si può aggiungere 1% di acido ascorbico per ritardare l'ossidazione. Non utilizzare la soluzione se presenta colorazione blu⁴.

Test ossidasi modificato^{1,22}

Può essere utilizzata una soluzione al 6% di N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiammina in dimetil solfossido (DMSO) per differenziare i micrococchi dalla maggior parte degli stafilococchi tranne *S. caseolyticus* ora assegnato al gruppo *Micrococcus*, *S. fleuretti*, *S. sciuri*, *S. lentus* e *S. vitulinus*. Le specie *Micrococcus* sono ossidasi positive.

Reagenti di Gaby e Hadley: Reagente A -1% naftolo in 95% di alcol etilico (etanolo) e reagente B - Ossalato di p-aminodimetilanilina²³.

Sono disponibili preparazioni commerciali. Queste sono confezioni di dischi/strisce impregnati con ossidasi o flaconi / contagocce pronti all'uso^{1,2}.

Filo batteriologico diritto / ansa (platino) o alternative monouso.

Filtro di carta.

3 Microrganismi per Controllo di Qualità

Controllo positivo

Pseudomonas aeruginosa NCTC 10662

Controllo Negativo

Escherichia coli NCTC 10418.

Questi ceppi sono stati validati dalla NCTC per dare questo risultato.

Nota: Ogni reagente o disco / striscia deve essere saggiato con controlli noti, positivi e negativi, prima di essere inserito nell'uso generale.

4 Procedura e Risultati

4.1 Metodo Carta da Filtro⁴

- Immergere un pezzo di carta da filtro nella soluzione reagente.
- Raccogliere parte di crescita microbica recente dalla piastra di coltura con un ansa o bastoncino monouso e strofinare sulla carta da filtro o toccare una colonia con il bordo della carta da filtro

O

- Toccare una colonia con il bordo della carta da filtro umida trattata
- Esaminare per comparsa di colore blu entro 10s

4.2 Metodo Diretto in Piastra¹

- Aggiungere sulla piastra di agar 2 -3 gocce di reagente alle colonie sospette. Non sommergere la piastra con il reagente
- Esaminare per comparsa di colore blu entro 10s

Nota: Il metodo diretto su piastra deve essere eseguito su piastra di agar non selettiva.

4.3 Metodo Tampone¹

- Immergere il tampone nel reagente e poi toccare la colonia sospetta
- Esaminare per comparsa di colore entro 10s

4.4 Metodo Striscia Imbevuta di Ossidasi^{1,24}

- Raschiare dalla piastra di coltura con ansa o bastoncino monouso parte di una crescita recente e strofinare sulla carta da filtro
- Esaminare per comparsa di colore blu entro 10s

Nota: Se si utilizzano dischi con ossidasi, inumidirli con acqua distillata sterile prima di collocarli sulle colonie sospette e attendere per circa 20-30 minuti prima di verificare eventuali cambiamenti di colore.

4.5 Metodo in Provetta^{2,23}

- Far sviluppare una coltura recente di batteri (18 a 24 ore) in 4.5ml di brodo nutriente (o in un terreno standard che non contiene un'elevata concentrazione di zucchero)
- Aggiungere alla brodocoltura sviluppata di notte 0,2 ml di 1% α -naftolo, e poi 0,3 ml di 1% ossalato di p-aminodimetilanilina (reagenti Gaby e Hadley)
- Agitare vigorosamente per garantire la miscelazione e l'ossigenazione diffusa della coltura
- Esaminare per comparsa di colore blu entro 10s

Interpretazione per tutti i Metodi

Tutti i tempi di reazione indicati sono riferiti a reagenti appena preparati privi di agenti stabilizzanti. Se si utilizzano reagenti preparati commerciali, si deve notare che questi spesso contengono agenti stabilizzanti e quindi devono essere seguite le istruzioni del produttore.

Risultato positivo

Sviluppo di colore viola-blu / blu intenso indica produzione di ossidasi.

Risultato negativo

Nessun colore viola-blu / Nessun cambiamento di colore.

Nota: I microrganismi sono ossidasi positivi quando il viraggio del colore al viola scuro compare entro 5 - 10 secondi. I microrganismi sono ossidasi positivi ritardati quando il colore vira al viola entro 60 - 90 secondi. Sono ossidasi negativi se il colore non cambia o appare dopo più di 2 minuti.

