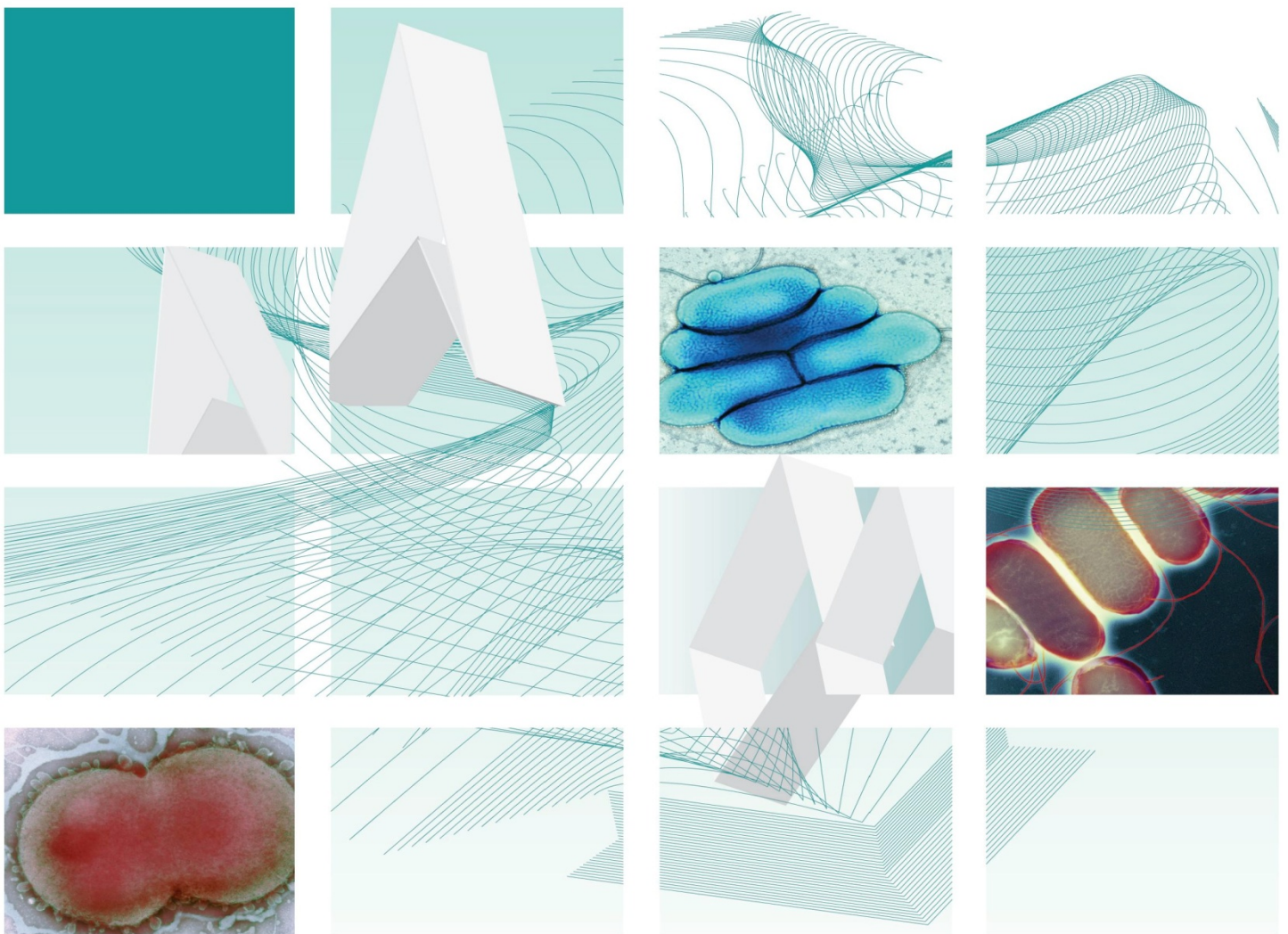




Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Cambiamento di Fase di *Salmonella*



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 Division
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 corretti 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	9
2 REAGENTI E STRUMENTAZIONE	9
3 MICRORGANISMI PER CONTROLLO DI QUALITA'	9
4 PROCEDURA E RISULTATI	10
APPENDICE: CAMBIAMENTO DI FASE DI <i>SALMONELLA</i>	11
BIBLIOGRAFIA	12



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.	5/08.01.15
Emissione eliminata. no	2.2
Emissione inserita no.	3
Sezione(i) interessate/Pagina no.	Modifica.
Documento intero .	Collegamenti ipertestuali aggiornati a gov.uk.
Pagina 2	Loghi aggiornati aggiunti.
Introduzione	Questa sezione è stata aggiornata e aggiunta bibliografia.
Informazione Tecnica/Limitazioni	Sezione aggiornata.
Considerazioni sulla Sicurezza	Informazioni e bibliografia aggiornate.
Reagenti/Strumentazione	Sezione aggiornata e aggiunta bibliografia.
Procedure e Risultati	Informazione e bibliografia aggiornate.
Diagramma di flusso	Questo diagramma di flusso è stato modificato per facilitare la comprensione.
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 test 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.

[#] Gli Standard di Microbiologia del RU erano in precedenza conosciuti come Metodi Nazionali Standard.

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 Suggesta per questo Documento

Public Health England. (2015). Changing the Phase of *Salmonella*. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 32 Emissione 3. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Scopo del Documento

La maggior parte dei sierotipi di *Salmonella* possiede due fasi di antigeni H (flagellare). Se l'agglutinazione è ottenuta con una fase, il microrganismo può essere indotto a cambiare nell'altra fase.

Questa SMI deve essere usata congiuntamente con le altre SMI

Introduzione

La maggior parte degli isolati si presenta in due fasi: la fase 1, fase 2 o possono avere contemporaneamente entrambe le fasi. Le colture che non sono espresse in una fase sulla coltura primaria possono essere commutate nell'altra fase con 2 metodi: con un tubo di Craigie o in piastra con fossa (piastra di Jamieson^{1,3}). Entrambi i metodi implicano l'aggiunta di siero anti-H con cui il battere ha già agglutinato. I microrganismi agglutinati nella fase originale consentono a quelli della fase alternativa di muoversi liberamente nella coltura.

Informazioni Tecniche / Limitazioni

Alcuni batteri, ad esempio *Salmonella Typhi* e *Salmonella Montevideo* hanno solo una fase e pertanto dovrebbero essere inviati al Laboratorio di Riferimento..

Il cambiamento di fase non è sempre ottenuto al primo tentativo. Quando necessario, la procedura dovrebbe essere ripetuta prima di concludere che microrganismo non ha fase alternativa.

In alcuni casi utilizzando un brodo di coltura si possono accelerare i risultati.

La Coltura batterica deve essere effettuata con terreni non selettivi, per esempio agar nutrienti. Se si utilizzano terreni selettivi, la produzione dell'antigene può essere insufficiente o può verificarsi auto-agglutinazione.

È essenziale che la formulazione degli antisieri utilizzati sia controllata e validata prima dell'uso.

1 Considerazioni sulla Sicurezza⁴⁻²⁰

La maggior parte delle specie *Salmonella* appartiene al gruppo di rischio 2, con importanti eccezioni tra cui *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C. Le manipolazioni di questi organismi devono essere eseguite in condizioni di livello di contenimento 3.

S. typhi, *S. Paratyphi* A, B e C causano malattie gravi e talvolta mortali. Sono state segnalate infezioni acquisite in laboratorio²¹. E' disponibile la vaccinazione per *S. Typhi* e le indicazioni sono fornite dal Department of Health immunisation policy²².

Devono essere indossati e rispettati in ogni momento adeguati dispositivi di protezione individuale (DPI) e tecniche finalizzate a ridurre al minimo l'esposizione del personale di laboratorio.

Il metodo più efficace per la prevenzione delle infezioni acquisite in laboratorio è l'adozione di sicure pratiche di lavoro

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

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

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 batteriche isolate che crescono su terreno solido.

Antisieri H *Salmonella*.

Ansa batteriologica con filo metallico diritto/ansa o, in alternativa, ansa monouso.

Metodo con provetta di Craigie (agar semi-solido 0.2 – 0.3%)²

Dispensare quantità di 12 mL di agar semi-solido e aggiungere una provetta di vetro (la provetta deve essere più lunga della profondità del terreno).

Metodo Ditch in piastra¹

Piastra di agar nutriente.

Strisce sterili di carta da filtro.

Pinze sterili

3 Microrganismi per Controllo di Qualità

Controllo Positivo

N/D

Controllo Negativo

N/D

4 Procedura e Risultati

4.1 Metodo di Craige²

- Preparare le provette contenenti agar nutritivo semi-solido e un piccolo tubo interno aperto alle due estremità con l'estremità superiore sporgente ben al di sopra del agar.
- Far sciogliere due provette di agar semi-solido e lasciarle raffreddare a 50°C.
- In una provetta aggiungere 0,5 ml di antisiero H diluito 1:5 (dal quale il battere era stato in precedenza agglutinato) e a una seconda provetta aggiungere 1 ml della stessa diluizione d'antisiero.
- Lasciare raffreddare e solidificare
- Quando il terreno si è solidificato, inoculare la coltura nell'agar all'interno del tubo centrale (sia con un'ansa diritta dalla piastra o introducendo una goccia di una coltura liquida).
- Incubare a 35 – 37°C per il periodo più corto necessario alla diffusione (ad esempio, 8 – 16 ore).
- Eseguire la sottocoltura, partendo dalla superficie esterna al tubo centrale, su agar a becco di clarino o in brodo nutritivo e usare questa coltura per l'identificazione degli antigeni della seconda fase.

4.2 Metodo Ditch in piastra¹

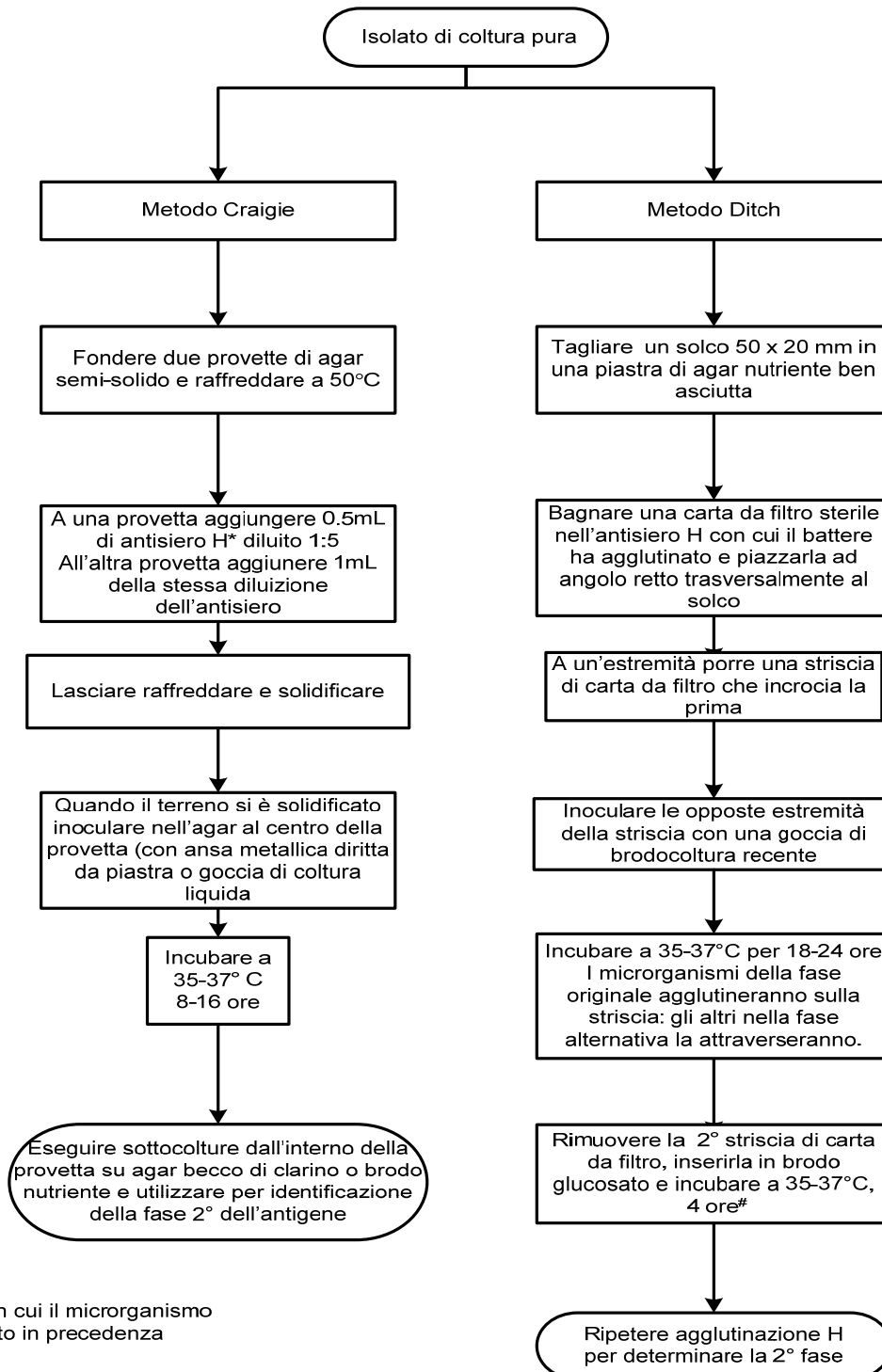
- In una piastra di agar nutritivo ben asciutta, tagliare un solco di 50 x 20 mm
- Bagnare una striscia di carta da filtro sterile nell'antisiero H col quale il microrganismo ha agglutinato e posizionarla ad angolo retto trasversalmente al solco
- A una estremità della striscia deporre una goccia di tioglicollato acido per neutralizzare ogni tipo di conservante presente nel siero
- All'altra estremità, posizionare una seconda carta da filtro per formare una croce con la prima carta da filtro
- Inoculare l'opposta estremità della prima striscia con una goccia di brodo coltura recente e incubare a 35 – 37 °C per 18 – 24 ore. I microrganismi della fase originaria agglutineranno sulla striscia, mentre quelli nell'altra fase la attraverseranno
- Rimuovere la seconda striscia di carta da filtro e seminarla in brodo glucosato, e incubare a 35 – 37°C per 4 ore
- Ripetere l'agglutinazione H per determinare la seconda fase
- La seconda striscia diventa facoltativa. Se un'estremità della prima striscia è inoculata con una colonia ben isolata e incubata, la crescita risultante sull'estremità non seminata della striscia potrà essere usata per l'agglutinazione con gli antisieri

Traduzione a cura di Roberto Rescaldani, già primario del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori – Monza.

Collaboratori: Roberto Rossetti, già Primario del Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Civile di Pistoia ASL 3
Monica Raggi, Dirigente di primo livello del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori di Monza

I testi originali e le traduzioni sono disponibili sul Web APSI – www.apsi.it - Webmaster Sergio Malandrini, Dirigente di primo livello del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori di Monza

Appendice: Cambiamento di Fase di *Salmonella*:



* Siero H con cui il microrganismo ha agglutinato in precedenza

2° striscia opzionale – se una estremità della 1° striscia è inoculata con colonia isolata e incubata sviluppa crescita da un'estremità non seminata può essere investigata con antisiero

Il Diagramma di Flusso è solo indicativo

Bibliografia

1. Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Falkinham JO. *Salmonella* and *Shigella*. In: Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Falkinham JO, editors. *Collins & Lyne's Microbiological Methods*. 8th Edition ed. London: Arnold; 2004. p. 292-300.
2. Old DC. *Salmonella*. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, editors. *Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology*. 14th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996. p. 385-404.
3. Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, et al. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry ML, Warnock EW, III, editors. *Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY*. 10th ed. Vol 1. Washington DC: ASM Press; 2011. p. 603-26.
4. 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".
5. 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.
6. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
7. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
8. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
9. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
10. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
11. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
12. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.

17. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
18. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
19. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
20. 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
21. Blaser MJ, Lofgren JP. Fatal salmonellosis originating in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 1981;13:855-8.
22. Salisbury D, Ramsay M, Noakes K, editors. Immunisation against infectious disease 2006 - The Green Book. Updated 04 November 2013. 3rd ed. Great Britain: The Stationery Office; 2013. p. 1-514