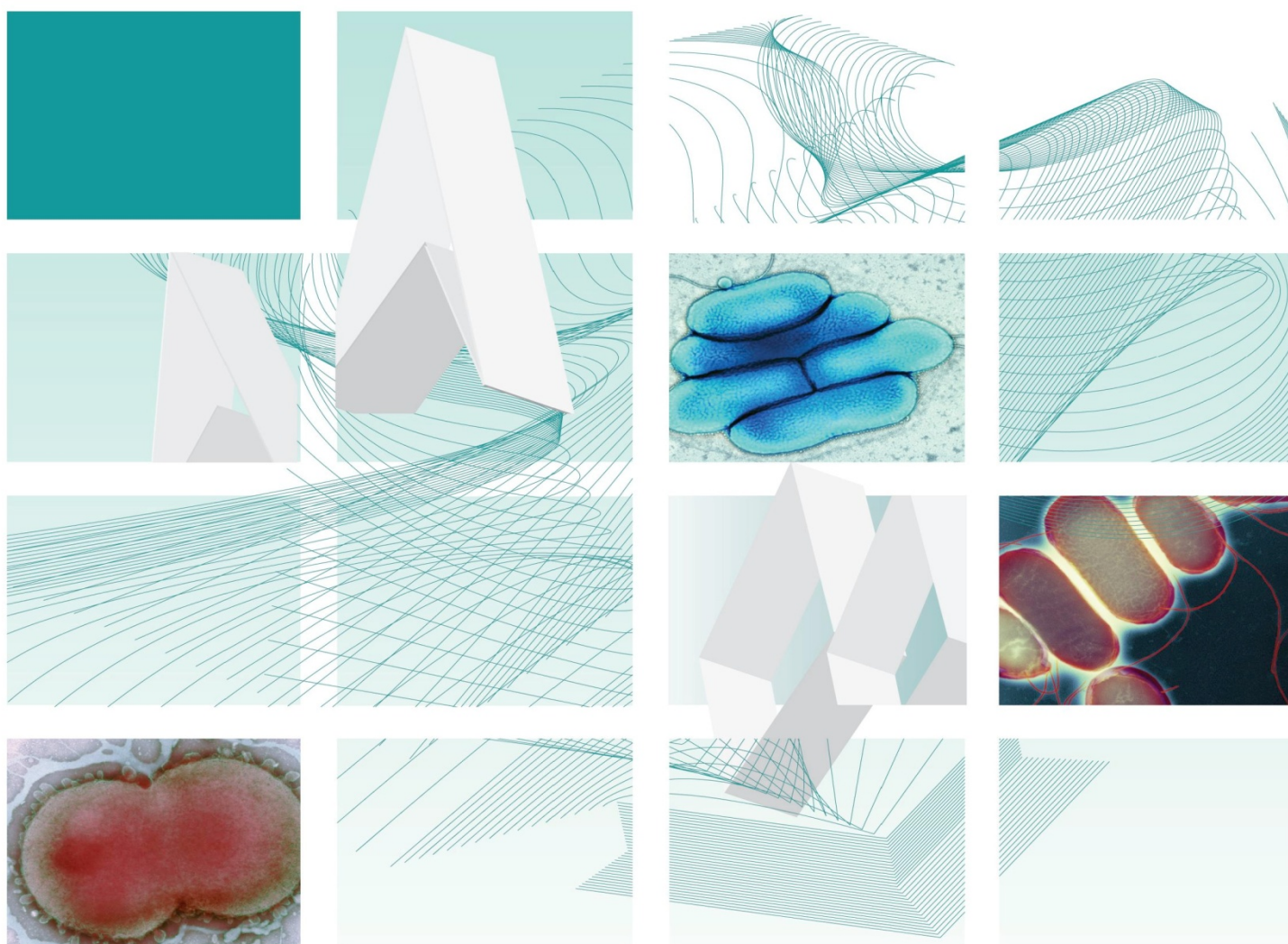


Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Test per l'Indolo



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
SMI RU: scopo e obiettivo	5
Scopo del documento.....	7
Introduzione	7
Informazione tecnica/limitazioni	7
1 Considerazione sulla sicurezza	9
2 Reagenti e strumentazione.....	9
3 Microrganismi controllo qualità.....	9
4 Procedura e risultati	10
Appendice: Test dell'indolo.....	11
Bibliografia	12



"NICE has renewed accreditation of the process used by **Public Health England (PHE)** to produce **UK Standards for Microbiology Investigations**. The renewed accreditation is valid until **30 June 2021** and applies to guidance produced using the processes described in **UK standards for microbiology investigations (UKSMIs) Development process, S9365', 2016**. The original accreditation term began in **July 2011**."

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 numero/data.	7/03.12.18
Emissione eliminata numero	3
Emissione inserita numero	4
Data anticipata prossima revisione*	03.12.21
Sezione(i) interessate	Modifica.
Intero documento	Documento e diagramma di flusso aggiornati. Limitazioni tecniche aggiornate con note a piè pagina. Bibliografia aggiornata con valutazione.
Microrganismi controllo qualità,	Ceppo NCTC batterico positivo alternativo testato e convalidato per questo test.

*Le revisioni possono essere protratte fino a cinque anni in funzione delle risorse disponibili

SMI RU[#]: scopo e obiettivo

Utilizzatori delle SMI del RU

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. I documenti 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 che è una condizione essenziale per interventi di sorveglianza della salute pubblica, e per le attività di ricerca e di sviluppo.

Coinvolgimento delle organizzazioni professionali

Lo sviluppo delle SMI è condotto in condizione paritaria da PHE, NHS, Royal College of Pathologists e 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 un'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 partecipanti non sono necessariamente quelle espresse da tutta l'organizzazione che essi rappresentano. I rappresentanti agiscono da tramite con funzione di collegamento bi-direzionale per informazione e dialogo. Le attività di rappresentanza sono ricercate tramite un processo di consultazione. Le SMI sono sviluppate, revisionate e aggiornate tramite un ampio processo di consultazione.

Assicurazione di qualità

La NHS Evidence ha accreditato la procedura usata dai SMI Working Groups per produrre le SMI. L'accREDITAMENTO è applicabile a tutte le linee guida emesse dall'Ottobre 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 rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello

[#] 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.

di complesse indagini di laboratorio. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche aggiuntive 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 da 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 che i risultati siano 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 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 assoggettato agli obiettivi PHE di Uguaglianza <https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/equality-and-diversity>.

I Gruppi di Lavoro SMI del RU 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, la 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 ad una SMI del RU da un utente finale per uso locale, deve essere chiaro dove nel documento queste sono state apportate e da chi e riconosciuto che la PHE e le organizzazioni partner non devono essere coinvolte da responsabilità per tali modifiche. Per maggiore chiarezza, dal momento che le SMI del Regno Unito sono state sviluppate per l'applicazione nel Regno Unito, qualsiasi applicazione al di fuori del Regno Unito è a rischio dell'utente.

Le conoscenze di base e la tassonomia microbica per la SMI del RU sono le più complete possibili, al momento della pubblicazione. Eventuali omissioni e nuove informazioni saranno considerate nel corso della revisione successiva. 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.

Le SMI sono assoggettate a diritti d'autore che dovrebbero essere riconosciuti ove appropriato

Citazione suggerita per questo documento

Public Health England. (2018). Indole test. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 19 Emissione 4. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

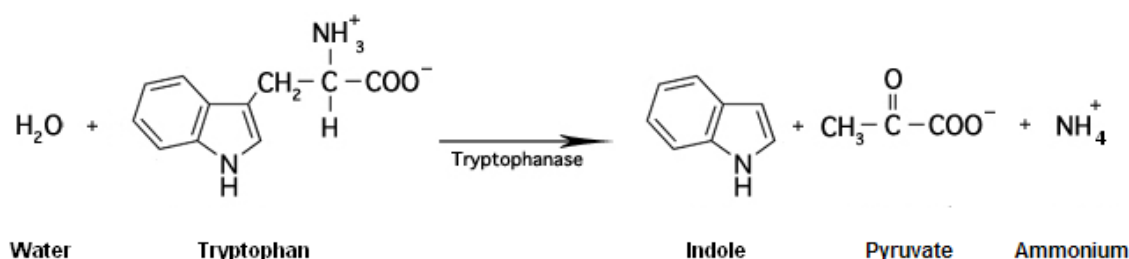
Scopo del documento

Questo documento descrive la procedura per il test dell'indolo. Il test dell'indolo rileva la 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 ammonio secondo la seguente reazione¹.



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

Varietà di brodo peptone

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.

Spot indole

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 cromogeni^{3,4}.

L'indole è un prodotto diffusibile. Per facilitare la diffusione dell'indolo, selezionare una colonia ben isolata per il test dell'indolo spot.

Inibizione della produzione dell'indolo

I terreni con peptone contenenti glucosio non deve essere usati perché la produzione di acido può inibire la produzione di indolo a causa di un cambiamento del pH^{1,5}.

False reazioni

Gli anaerobi, in particolare le specie di *Clostridium*, formano l'indolo, ma possono scomporlo rapidamente mentre viene prodotto; pertanto, possono verificarsi reazioni falsamente negative¹.

Si possono verificare false reazioni positive con il test dello spot dell'indolo se l'inoculo è una coltura mista di organismi indolo positivi e indolo negativi^{1,4,6}.

Incubazione aerobica

Le colture da testare per l'indolo devono essere incubate in aerobiosi perché una diminuzione della tensione dell'ossigeno diminuisce la produzione di indolo¹.

Reagente alternativo

Il reagente di Ehrlich, un'alternativa al reagente Kovács, contiene anche il dimetilammino-benzaldeide (DMAB), che reagisce con l'indolo per produrre un prodotto rosso. La formulazione Ehrlich è più sensibile ma contiene ulteriori solventi tossici o infiammabili; è raccomandato quando si saggiano gruppi batterici che producono poco indolo come bacilli non fermentativi o anaerobi. Il reagente Kovács è più stabile e l'assenza dell'estrazione organica aggiuntiva (richiesta da Ehrlich) rende la formulazione di Kovács più adatta per i laboratori⁷.

1 Considerazioni sulla Sicurezza⁸⁻²⁵

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, 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 o NCTC 12241

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^{1,26}

- 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 test^{4,27}

- 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.

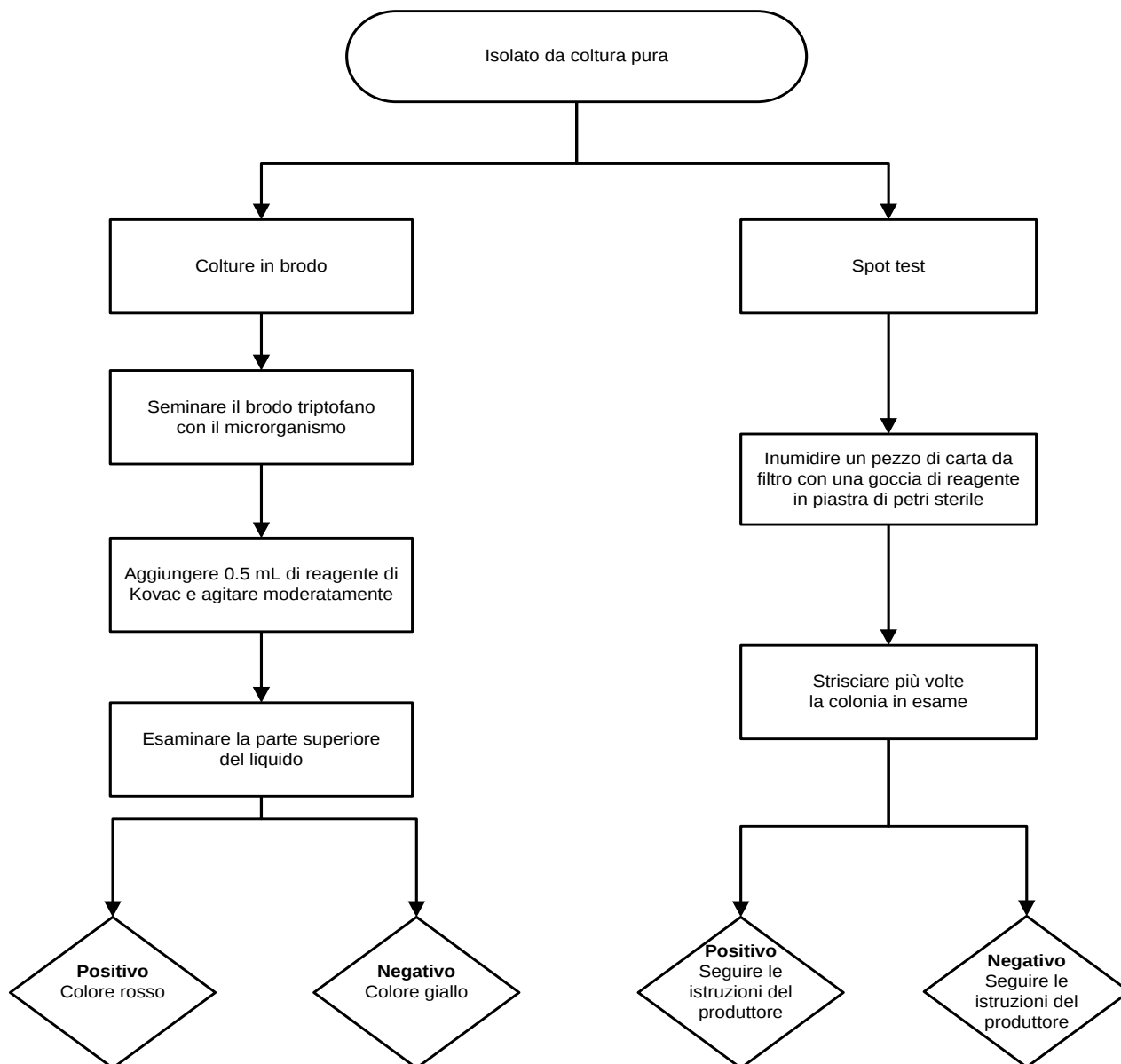
Risultato negativo

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.

1. Anche i kit commerciali API possono essere utilizzati per determinare se un microrganismo è indolo positivo o negativo.
2. In funzione del reagente utilizzato per il test spot dell'indolo, i colori risultanti differiscono. Se si usa p-metilamminobenzaldeide, la presenza di indolo è indicata da un colore rosso e se si usa la p-dimetilamminocinnamaldeide si osserva un colore bluastro-verde.

Appendice: Test per indolo

**Note:**

Controlli positivi:
Controlli negativi:

Escherichia coli NCTC 10418 or NCTC 12241
Proteus mirabilis NCTC 10975

Bibliografia

Tabella di GRADE (Grading of Recommendations, Assessment, Development, and Evaluation) modificata, utilizzata dalle SMI UK nella valutazione della bibliografia

Il GRADE (Grading of Recommendations, Assessment, Development, and Evaluation) è un approccio sistematico alla valutazione della bibliografia. Per le UK SMI si utilizza un metodo GRADE modificato per valutare l'inclusione dei riferimenti bibliografici. Ogni riferimento bibliografico è valutato e assegnato a un grado di consistenza delle raccomandazione (A-D) e alla qualità delle prove soggettive (I-VI). Di seguito è presentata una tabella riassuntiva che definisce il grade e deve essere utilizzata in congiunzione con l'elenco delle voci bibliografiche.

Consistenza della raccomandazione	Evidenza della qualità
A Fortemente raccomandata	I Dimostrazione da studi controllati, randomizzati, meta-analisi, e revisioni sistematicamente
B Raccomandata ma possono essere accettabili altre alternative	II Dimostrazione da studi non randomizzati
C Debolmente raccomandata: ricercare alternative	III Studi non-analitici, es. casi riportati, recensioni, serie di casi
D Mai consigliate	IV Opinione degli esperti e ampia accettazione come buona pratica, ma con nessuna prova di studio
	V Richiesto dalla normativa, codice di buona pratica o norma nazionale
	VI Lettera o altro

1. MacFaddin JF. Indole Test. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p. 221-32. **B, III**
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. **B, III**
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. **B, III**
4. Peterson WC, Hale DC, Matsen JM. An evaluation of the practicality of the spot-indole test for the identification of Escherichia coli in the clinical microbiology laboratory. Am J Clin Pathol 1982;78:755-8. **B, III**

5. 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. *BiochemJ* 1942;36:619-23. **B, II**
6. Bale MJ, McLaws SM, Matsen JM. The spot indole test for identification of swarming *Proteus*. *Am J Clin Pathol* 1985;83:87-90. **B, III**
7. MacWilliams M. Indole Test Protocol. American Society for Microbiology Peer-reviewed. 2013. **B, VIII**
8. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office 2003. **A, VI**
9. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive 2005. **A, VI**
10. 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. **A, VI**
11. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive 2013. 1-35. **A, VI**
12. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets 2000. **A, VI**
13. 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. 2005. 1-14. **A, VI**
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. **B, V**
15. Department for Transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011. **A, VI**
16. Department of Health. Transport of Infectious Substances. Best Practice Guidance for Microbiology Laboratories. Department of Health. 1-13. 2007. **A, VI**
17. European Parliament. UK Standards for Microbiology Investigations (UK 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". 1998. **A, VI**
18. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books,. 2002. **A, VI**
19. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books,. 2002. **A, VI**
20. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 2009. **A, VI**

21. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002 (as amended). Approved Code of Practice and guidance L5 (sixth edition). HSE Books,. 2013. **A, VI**
22. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books 2003. **A, VI**
23. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001. **A, VI**
24. 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 1998. 1-37. **A, VI**
25. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2017-2018. 2017. **A, VI**
26. 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- 31. **B, III**
27. Miller JM, Wright JW. Spot indole test: evaluation of four reagents. JClinMicrobiol 1982;15:589-92. **B, III**