

Istruzioni per l'uso delle pastiglie Diatabs:

Revisione: DBV0008B
Data di emissione: 12.04.2013
Lingua: Italiano

Diatabs: Per l'identificazione batterica

Produttore

ROSCO Diagnostica A/S, Taastrupgaardsvej 30, DK-2630 Taastrup, Danimarca, www.rosco.dk

Uso previsto

Utilizzare in procedure qualitative per individuare proprietà microbiche *in vitro* per l'identificazione di microrganismi.

I test di identificazione sono disponibili sotto forma di singole pastiglie.

Principi su cui si basa il procedimento

Le pastiglie Diatabs possono essere suddivise in due gruppi: Diatabas da porre sulle piastre di agar e Diatabas da sciogliere nel liquido. La maggior parte delle pastiglie Diatabs forniscono test rapidi utilizzando reazioni enzimatiche cromogeniche e test convenzionali modificati. Le Diatabs poste sulle piastre di agar individuano i modelli di sensibilità naturale o le caratteristiche del fattore di crescita. Dopo l'incubazione, si procede all'esame delle piastre, alla misurazione dei diametri delle zone di inibizione attorno alla pastiglia e al successivo confronto dei dati con le tabelle interpretative delle zone (sensibile/resistente) delle singole pastiglie. Le Diatabs utilizzate nel liquido si basano sulle proprietà enzimatiche dei microrganismi individuati dai vari sistemi indicatori. 1

Per ulteriori informazioni sulle pastiglie Diatabs per l'identificazione batterica, consultare la Guida all'utilizzo delle pastiglie Diatabs all'indirizzo www.rosco.dk.

Istruzioni per la conservazione

1) Al ricevimento del prodotto, controllare il simbolo della temperatura sull'etichetta. Le Diatabs in cui compare il simbolo 2 °C - 8 °C devono essere conservate in un frigorifero, mentre le Diatabs recanti il simbolo di una temperatura pari o superiore a 25 °C devono essere conservate a temperatura ambiente.

2) Se le Diatabs sono conservate in frigorifero, attendere finché i flaconi avranno raggiunto la temperatura ambiente prima di aprirli, ad es. 30 - 60 minuti, per evitare la formazione di condensa sulle pastiglie.

3) Conservare le Diatabs in flaconi ben protetti dalla luce diretta e da condizioni di umidità elevata. Nel flacone tenere l'eventuale materiale assorbente di umidità (capsula dissecante).

La data di scadenza riportata sui flaconi si riferisce solo ai flaconi dotati di coperchio e conservati alla corretta temperatura.

Reagenti

Le Diatabs sono pastiglie di 6 o 9 mm fornite in flaconi contenenti ognuno 15, 25 o 50 pastiglie. Su entrambi i lati delle pastiglie di 9 mm è impresso un codice unico a 5 caratteri. Le pastiglie di 6 mm da utilizzare sull'agar hanno codici di colori e le Diatabs da sciogliere nel liquido non hanno alcun codice. L'utente deve quindi tenere traccia del contenuto della provetta quando utilizza più di una pastiglia Diatabs.

Precauzioni

Seguire le istruzioni per l'uso. Nessuna di queste pastiglie deve essere utilizzata per i test di sensibilità. L'azione delle pastiglie Diatabs dipende non solo dalla Diatabs specifica, ma anche dall'utilizzo dell'inoculo più adatto, dal tempo di incubazione e dall'interpretazione del diametro delle zone o del cambiamento di colore. L'utilizzo è riservato esclusivamente a tecnici opportunamente addestrati. Utilizzare un paio di pinzette per afferrare le Diatabs.

Occorre prendere le opportune precauzioni contro i rischi microbiologici sterilizzando correttamente campioni, recipienti, terreni e provette dopo l'utilizzo. Diatabs, provetta e le piastre di agar contenenti potenziali patogeni debbono essere smaltite come rifiuti microbiologici.

Campione

Il campione deve essere preso e manipolato seguendo le linee guida raccomandate. Il campione deve essere una cultura pura assolutamente tipica della specie da identificare.

Procedura

Materiali forniti: Pastiglie Diatabs come indicato sull'astuccio.

Materiali richiesti ma non forniti: Terreni di cultura, provette, reagenti, organismi di controllo della qualità e attrezzature di laboratorio necessarie all'identificazione, per es. anse di inoculazione, tamponi, pipette e recipienti di raccolta.

I. Diatabs poste sull'agar

La sensibilità di microrganismi isolati da campioni clinici contro antimicrobici e altri agenti può essere utile per l'identificazione. È possibile caratterizzare e distinguere i microrganismi misurando il diametro delle zone dopo la cultura con un inoculo standardizzato applicato ad un terreno di agar specifico.

I.1. Preparazione dell'inoculo

Tenere in sospensione diverse colonie morfologicamente analoghe prelevate da una piastra di agar messa a cultura per 18-24 ore (non selettiva) in 4-5 ml di soluzione NaCl al 0,9% per ottenere una torbidità paragonabile allo standard McFarland 0,5.

I.2. Inoculazione

Nell'arco di 15 minuti, intingere un tampone di cotone sterile nella sospensione adattata e rimuovere l'inoculo dal tampone esercitando una forte pressione all'interno della provetta. Inoculare l'agar specificato nella Tabella 1 mediante i tamponi entro 15 minuti. Inoculare la superficie asciutta della piastra di agar idonea strisciando il tampone su tutta la superficie. Attendere 3-5 minuti affinché la superficie si asciughi o un massimo di 15 minuti prima di applicare le pastiglie Diatabs alla superficie dell'agar.

I.3. Incubazione e lettura delle piastre

Nell'arco di 15 minuti, collocare le piastre con il lato contenente l'agar rivolto verso l'alto ed incubare le piastre a seconda della specie e secondo la Tabella 1 (aerobica, anaerobica, oppure in CO₂ al 5-10%). Esaminare le piastre dopo l'incubazione notturna, salvo diversamente specificato nella Tabella 1. I diametri delle zone di completa inibizione sono misurati a occhio. Le misure delle zone sono arrotondate al millimetro intero più vicino.

RISULTATI:

Confrontare il diametro della zona registrata con quelli indicati nella Tabella 1. I risultati di un campione specifico possono essere Sensibile (S) oppure Resistente (R) a seconda delle zone di interpretazione. Utilizzare la Tabella 1 per l'identificazione preliminare del ceppo batterico.

II. Diatabs utilizzate nel liquido**II.1. Preparazione dell'inoculo**

L'organismo da sottoporre a test deve essere stato per 18-24 ore in cultura pura. Gli isolati a crescita lenta possono essere testati da una cultura di 48 ore.

Preparare una sospensione forte (almeno lo standard McFarland 4) dell'organismo di prova in 0,25 ml di soluzione salina in una provetta. Una batteria di Diatabs può essere inoculata con un solo inoculo.

II.2. Inoculazione

Aggiungere una Diatabs alla provetta. Alcune Diatabs necessitano l'aggiunta di 3 gocce di olio di paraffina sterile nella provetta (come specificato nella Tabella 2).

II.3. Incubazione e lettura delle provette

Chiudere ermeticamente la provetta ed incubare a 35-37 °C per 4 ore, tutta la notte o come specificato nella Tabella 2.

Dopo l'incubazione osservare l'evoluzione del colore. Per alcune Diatabs occorre aggiungere un reagente prima di leggere il colore e alcune Diatabs possono manifestare due reazioni.

Dopo l'interpretazione dell'evoluzione del colore, aggiungere un reagente e leggere il nuovo colore (specificato nella Tabella 2).

RISULTATI:

Le pastiglie Diatabs nel liquido sono valutate a seconda delle reazioni del colore. La Tabella 2 riporta le reazioni di colore per i ceppi negativi e positivi. Registrare il risultato del test in un apposito modulo di registrazione.

III. Diatabs con una procedura diversa**Ossidasi**

Mettere una carta da filtro spessa su una capsula di petri vuota e porci sopra la Diatabs. Aggiungere una goccia di soluzione salina sopra la pastiglia, aspettare 60 secondi ed aggiungere sopra un'altra goccia di soluzione salina. Quando la carta da filtro diventa umida, spalmare la colonia sulla carta da filtro umida per circa 3-8 mm dal bordo della pastiglia utilizzando un'ansa di plastica. Eseguire la lettura dopo 2 minuti. È possibile testare più di un isolato utilizzando la stessa Diatabs e carta da filtro.

Fattore X, V e X+V

Le pastiglie con fattori di crescita, emina (Fattore X) e NAD (Fattore V) o entrambi i fattori, sono utilizzate per la differenziazione di *Haemophilus* spp. Tutte le tre pastiglie vengono poste sull'agar, il fattore X e il Fattore V ad una distanza di 2 cm l'uno dall'altro e il fattore X+V ancora più distanziato da questi. Utilizzare esclusivamente terreni privi di questi due fattori di crescita (per es. agar TSA). Incubare durante la notte a 35-37 °C per 18-24 ore ed osservare la crescita o la mancata crescita in prossimità di una pastiglia. Se l'organismo richiede il solo Fattore X, crescerà solo in prossimità delle pastiglie con fattore X e X + V; se richiede il solo fattore V, crescerà solo in prossimità delle pastiglie con fattore V e X + V; se sono richiesti entrambi i fattori X e V, crescerà solo in prossimità delle pastiglie con fattore X + V.

CONTROLLO DELLA QUALITA' INTERNA

La procedura di controllo della qualità che si avvale dei ceppi ATCC o di ceppi noti positivi o negativi deve essere utilizzata per monitorare la reazione delle pastiglie. Il controllo della qualità deve essere eseguito secondo le procedure di controllo della qualità stabilite nel laboratorio. Le reazioni di colore negative/positive o i ceppi sensibili/resistenti sono riportati nelle Tabelle ed indicano la corretta esecuzione dell'intera procedura. Qualora si notino risultati aberranti di qualità, questi non devono essere registrati.

LIMITI DEL METODO

1. Devono essere utilizzate culture pure di microrganismi in quanto una popolazione microbica mista porterebbe a risultati aberranti.
2. L'utilizzo delle pastiglie Diatabs per l'identificazione di microrganismi e l'interpretazione dei risultati è riservato a tecnici con ottima conoscenza dei metodi microbiologici generali poiché questi devono fare un uso ragionevole di conoscenze, esperienze, informazioni relative ai campioni ed altre procedure attinenti prima di riportare l'identità dell'isolato.
3. I risultati di test aggiuntivi possono influire sul risultato finale di identificazione.
4. Le pastiglie non devono essere utilizzate nelle procedure dei test di sensibilità.
5. La precisione delle pastiglie Diatabs si basa su proprietà microbiche note *in vitro* per specifiche specie batteriche importanti dal punto di vista clinico. Qualora si riscontrino risultati atipici o contrastanti, si consiglia di ripetere il test. Bisogna tenere presente la possibilità che vengano riportati risultati inattesi e in tal caso sarebbe consigliabile inviare gli isolati ai laboratori di riferimento per sottoporli a ulteriori test.

RIFERIMENTI

- 1) Versalovic J et al. : Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. 2011, ASM, Washington DC.
- 2) Diatabs User's Guide 8th ed. 2009. www.rosco.dk