

api® 20 NE

Sistema di identificazione di bacilli Gram negativi non enterici e non esigenti

INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST

API 20 NE è un sistema standardizzato per l'identificazione di bacilli Gram negativi, non esigenti, non enterici (per es. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, ecc.) che utilizza 8 test convenzionali, 12 test di assimilazione ed una base dei dati. La lista completa dei batteri che possono essere identificati con questo sistema è contenuta nella Tabella di Identificazione alla fine di questa scheda tecnica.

PRINCIPIO

La galleria API 20 NE è composta di 20 microprovette contenenti substrati disidratati. I test convenzionali vengono ricostruiti inoculando una sospensione batterica in soluzione salina. Le reazioni prodotte durante il periodo di incubazione sono evidenziate da un viraggio cromatico spontaneo o successivo all'aggiunta di reagenti. Nei test di assimilazione l'inoculo è costituito da un terreno povero e la crescita dei batteri è strettamente dipendente dalla loro capacità di utilizzare il substrato corrispondente. La lettura delle reazioni si effettua utilizzando la Tabella di Lettura e l'identificazione si ottiene consultando l'Indice Analitico oppure utilizzando un software di identificazione.

CONTENUTO DELLA CONFEZIONE (25 test):

- 25 gallerie API 20 NE
- 25 vaschette di incubazione
- 25 fiale di API AUX Medium
- 25 schede per la registrazione dei risultati
- 1 scheda tecnica

COMPOSIZIONE

Galleria
La composizione della galleria API 20 NE è riportata nella Tabella di Lettura di questa scheda tecnica.

API AUX Medium	2 g
7 ml	1,5 g
Agar	10,5 ml
Soluzione di vitamin	10 ml
Soluzione di oligo-elementi	6,24 g
Fosfato monosodico	1,5 g
Cloruro di potassio	1,5 g
Acqua demineralizzata	qsp 1000 ml
pH finale: 7,0-7,2	

Terreno

REATTIVI E MATERIALE NECESSARI MA NON FORNITI

- Reattivi:
 - API NACI 0,85 % Medium, 2 ml (Cod. 20 070)
 - JAMES (Cod. 70 542)
 - NIT 1 + NIT 2 (Cod. 70 442)
 - Zn (Cod. 70 380)
- Ossidasi (Cod. 55 835)
- prodotto non venduto in alcune nazioni: usare un reattivo equivalente
- Olio di paraffina (Cod. 70 100)
- Standard di McFarland (Cod. 70 900), punto 0,5
- Indice Analitico API 20 NE (Cod. 20 090) o software di identificazione *apiweb*™ (Cod. 40 011) (consultare BioMérieux)

Materiale

- Pipette o Pispette
- Proteggi-fiale
- Porta-fiale
- Equipaggiamento generico per laboratorio di batteriologia.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per diagnostica *in vitro* e per controllo microbiologico.
- Esclusivamente per uso professionale.

Questa confezione contiene dei componenti di origine animale. Poiché i controlli sull'origine e/o sullo stato sanitario degli animali non possono garantire in maniera assoluta che questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile, si raccomanda di manipolarli con le precauzioni d'uso relative ai prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare).

- I prelievi, le colture batteriche ed i prodotti seminati devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere manipolati in maniera appropriata da operatori competenti e preparati. Le tecniche di asepsi e le precauzioni d'uso per il gruppo batterico studiato devono essere rispettate durante tutta la manipolazione: fare riferimento a "CLSI/NCCLS M29-A. Protection of Laboratory Workers from Instrument, Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue. Approved Guideline - Revisione in vigore". Per ulteriori informazioni sulle precauzioni di manipolazione, consultare "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Ultima edizione", oppure fare riferimento alla normativa vigente nel Paese.
- Non utilizzare reattivi dopo la data di scadenza.
- Prima dell'uso verificare l'integrità dell'imballaggio e dei componenti.
- Non usare gallerie che che abbiano subito una alterazione fisica: cupole deformate, ...
- Aprire le fiale delicatamente come segue:

- Inserire la fiala nel proteggi-fiale
- Impugnare la fiala in posizione verticale (cappuccio bianco rivolto verso l'alto)
- Spingere bene in fondo il cappuccio.
- **Modello 1:**
 - Appoggiare la prima falange del pollice sulla parte inclinata del cappuccio.
 - Premere con il pollice sulla base della parte inclinata del cappuccio fino a rompere l'estremità della fiala.
- **Modello 2:**
 - Premere orizzionalmente con il pollice sulla parte striata del cappuccio fino a rompere l'estremità della fiala.
 - Estrarre la fiala dal proteggi-fiale e conservare il proteggi-fiale per una successiva utilizzazione.
 - Togliere delicatamente il cappuccio.

- Le performance riportate di seguito sono state ottenute seguendo il procedimento indicato in questa scheda tecnica. Qualsiasi deviazione dal procedimento indicato può alterare i risultati.
- L'interpretazione dei risultati dei test deve tener conto del contesto clinico o di altra natura, dell'origine del campione, degli aspetti macro e microscopici del ceppo ed, eventualmente, dei risultati di altri esami, in particolare dell'antibiogramma.

CONSERVAZIONE DEI REATTIVI

Le gallerie ed i terreni si conservano a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata sulla confezione.

CAMPIONI (PRELIEVO E PREPARAZIONE)

I campioni clinici o di altra natura non possono essere utilizzati direttamente con l'API 20 NE. I microrganismi da identificare devono essere inizialmente isolati su un terreno di coltura appropriato (per es. agar Trypticase Soli) secondo le normali tecniche batteriologiche.

PROCEDIMENTO

Test dell'Ossidasi

Il test dell'ossidasi deve essere eseguito secondo le istruzioni d'uso del fabbricante. Costituisce l'12° test di identificazione: annotare il risultato sulla scheda dei risultati.

Selezione delle colonie

API 20 NE deve essere utilizzato con bacilli Gram negativi non enterici e non esigenti.

NOTE 1: Alcune specie di bacilli Gram negativi non enterici ed ossidasi negativi (*S. maltophilia*, *Acinetobacter*, ...) possono essere perfettamente identificate con l'API 20 NE. Per utilizzare questa galleria ci si riferirà al contesto clinico o batteriologico.

NOTE 2: I germi fastidiosi ed esigenti che necessitano di particolari precauzioni di manipolazione (per es. *Bruceella* e *Francisella*) non fanno parte della base dati dell'API 20 NE. E' consigliabile utilizzare tecniche alternative per escluderne o confermarne la presenza.

Preparazione della galleria

- Riunire fondo e coperchio di una vaschetta di incubazione e disinquinare circa 5 ml di acqua distillata o demineralizzata [o semplicemente dell'acqua senza additivi o d'errata che potrebbero liberare gas (es. Cl₂, CO₂, ecc.) negli alveoli del fondo per creare un ambiente anidro.
- Annotare il riferimento identificativo del ceppo sulla linguetta laterale della vaschetta (Non annotare il riferimento sul coperchio, in quanto potrebbe essere spostato al momento della manipolazione)
- Estrarre la galleria dalla confezione.
- Mettere la galleria nella vaschetta di incubazione.

Preparazione dell'inoculo

- Aprire una fiala di API NACI 0,85 % Medium (2 ml) come indicato al paragrafo "Avvertenze e Precauzioni" della confezione del prodotto o utilizzare una provetta contenente 2 ml di soluzione fisiologica allo 0,85 % senza additivi.
- Servendosi di una pipetta o Pispette, prelevare da 1 a 4 colonie di identica morfologia, per aspirazione o toccando ripetutamente. Si raccomanda di utilizzare colture giovani (18-24 ore).
- Preparare una sospensione di torbidità uguale al punto 0,5 McFarland. Questa sospensione deve essere inoculata subito dopo la preparazione.

NOTE: Per il buon funzionamento dei test della galleria API 20 NE, è molto importante adattare la densità dell'inoculo al punto 0,5 McFarland (in particolare, una torbidità più bassa causa risultati falsi-negativi. Non toccare le cupole durante le manipolazioni e non lasciare la galleria esposta all'aria per lungo tempo dopo l'inoculazione.

Inoculo della galleria

- Con la sospensione preparata riempire la provetta (ma non la cupola) dei test da NO₁ a PN02 servendosi della pipetta utilizzata per il prelievo. Per evitare la formazione di bolle sul fondo della provetta, inclinare leggermente in avanti la vaschetta di incubazione ed appoggiare la punta della pipetta o della Pispette sul lato interno della cupola.
- Aprire una fiala di API AUX Medium come indicato al paragrafo "Avvertenze e Precauzioni" e trasferire circa 200 µl della sospensione precedente. Omogeneizzare con la pipetta evitando la formazione di bolle.
- Riempire la provetta e le cupole dei test da [GLU] a [PAC] fino ad ottenere un menisco orizzontale o leggermente convesso, ma mai concavo.
- Un riempimento incompleto o eccessivo delle cupole può causare risultati non corretti.
- Riempire con olio di paraffina le cupole dei 3 test sottolincati (GLU, ADH e URE) per formare un menisco convesso.
- Richiudere la vaschetta di incubazione ed incubare a 29°C ± 2°C per 24 ore (± 2 ore).

LETTURA ED INTERPRETAZIONE

Letture della galleria

- Dopo l'incubazione, la lettura della galleria deve essere effettuata servendosi della Tabella di Lettura.
- Trascrivere tutte le reazioni spontanee (GLU, ADH, URE, ESC, GEL e PN02) sulla scheda per la registrazione dei risultati.
- La lettura dei due test NO₁ e TRP dovrebbe essere eseguita proteggendo gli altri test di assimilazione da una contaminazione da parte dell'aria. A tale scopo, coprire questi ultimi con il coperchio della vaschetta di incubazione mentre viene effettuata la lettura dei test NO₁ e TRP.
- **Test NO₁:**
 - Aggiungere una goccia dei reattivi NIT 1 e NIT 2 nella cupola NO₁.
 - Dopo 5 minuti, una colorazione **rossa** indica una reazione **positiva** da annotare sulla scheda per la registrazione dei risultati.
 - Una reazione **negativa** può essere dovuta alla produzione di acido (eventualmente segnalata dalla presenza di microbolle) aggiungere 2,3 mg di reattivo Zn nella cupola NO₁.
 - Dopo 5 minuti, la presenza di una cupola incolore indica una reazione **positiva** da annotare sulla scheda per la registrazione dei dati. Se la cupola assume una colorazione **rosa-rossa**, la reazione è **negativa**, in quanto i nitrati, ancora presenti nella provetta, sono stati ridotti a nitrati dallo zinco.

La reazione utilizzata per l'identificazione dei microrganismi è la riduzione dei nitrati. Questa è positiva se una delle due reazioni precedenti (produzione di NO₁ o N₂) è positiva.

La produzione di N₂ può tuttavia essere utilizzata da sola come test complementare secondo quanto indicato nell'Indice Analitico.

Test TRP:

- Aggiungere 1 goccia di reattivo JAMES. Una colorazione **rossa** tra il diffusore in tutta la cupola indica una reazione **positiva**.

