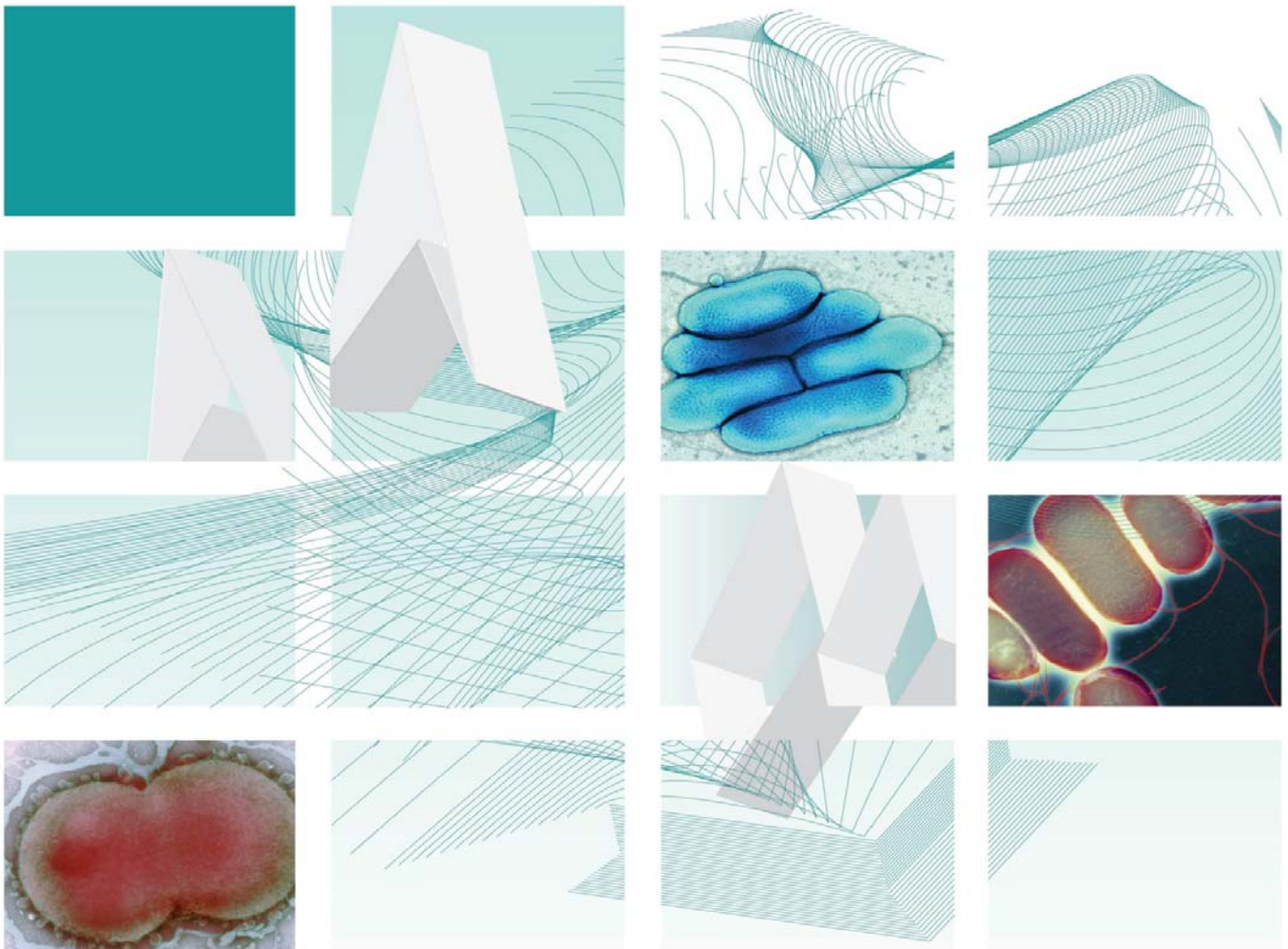




Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

IN REVISIONE

Ricerca di *Helicobacter pylori* in Biopsie Gastriche



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 <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <http://www.hpa.org.uk/SMI/WorkingGroups>).

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: <http://www.hpa.org.uk/SMI>

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche sono sviluppate con la collaborazione di:



The British Society for Antimicrobial Chemotherapy



society for general
Microbiology
www.sgm.ac.uk



SCOTTISH MICROBIOLOGY
ASSOCIATION

BIAM
British Infection Association

Contenuti

RINGRAZIAMENTI	2
TABELLA MODIFICHE	4
SMI RU: SCOPO E OBIETTIVO	6
SCOPO DEL DOCUMENTO	8
SCOPO	8
INTRODUZIONE.....	8
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI.....	10
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA	12
2 PRELIEVO DEL CAMPIONE	12
3 TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE	13
4 PROCESSO/PROCEDURA SUL CAMPIONE	13
5 PROCEDURA DI REFERTAZIONE	16
6 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE	16
6 BIOPSIE GASTRICHE PER HELICOBACTER PILORI	16
BIBLIOGRAFIA	19



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 E-mail: 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.	8/02.06.14
Emissione eliminata. no	5.1
Emissione inserita no.	5.2
Sezione(i) interessate/Pagina no.	Modifica.
Documento intero .	<p>Il documento è stato inserito in un nuovo formato che evidenzia il passaggio della Health Protection Agency alla Public Health England.</p> <p>Prima pagina ridisegnata.</p> <p>Rinominata la pagina di "Stato come Scopo" e Obiettivo ed aggiornata in modo appropriato.</p> <p>I loghi delle organizzazioni professionali sono stati revisionati ed aggiornati.</p> <p>La bibliografia degli standard di sicurezza e notifica è stata revisionata ed aggiornata.</p> <p>Il contenuto scientifico rimane invariato.</p>

Modifica No/Data.	7/02.08.12
Emissione eliminata. no	5
Emissione inserita no.	5.1
Sezione(i) interessate.	Modifica.
Documento intero.	<p>Documento presentato in nuovo formato.</p> <p>Il termine " contenitore a tenuta ermetica con marchiatura CE si riferisce al testo specifico nell'ambito della Direttiva UE per Dispositivi Medico-Diagnostici in vitro (98/79/CE allegato 1 B 2.1) e alla direttiva stessa EC^{1,2}.</p> <p>Edito per chiarezza</p> <p>Riorganizzazione di parte del testo.</p> <p>Piccole modifiche. .</p>
Sezione su prelievo, trasporto, conservazione e procedura sul	Riorganizzate con numerazione cambiata

campione	
Bibliografia	Bibliografia in parte aggiornata

IN REVISIONE

SMI del RU#: 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. 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 garanzia della qualità, la definizione dell'incertezza della determinazione.

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. Nel Regno Unito le SMI rappresentano strategie omogenee per le prove diagnostiche e la programmazione degli interventi di sanità pubblica

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 <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnershipshhttp>. 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.

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

[#] 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.

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 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. Queste stesse devono essere utilizzate in associazione con altre SMI. 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 http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317133470313. 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. (2014). Investigation of Gastric Biopsies for *Helicobacter pylori*. UK Standards for Microbiology Investigations. B 55 Issue 5.2. <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>

Scopo del Documento

Tipo di campione

Biopsia gastrica

Scopo

Questa SMI descrive la diagnosi primaria, processando ed investigando batteriologicamente le biopsie gastriche per la ricerca di *Helicobacter pylori*

Questa SMI deve essere usata congiuntamente con le altre SMI.

Introduzione

L'infezione da *Helicobacter pylori* è associata all'ulcera peptica e rappresenta un fattore di rischio per il cancro dello stomaco. Appare sempre più evidente che esso svolge un ruolo importante nella dispepsia non ulcerativa. Si possono manifestare in modo occasionale sintomi acuti di gastrite e di dolore epigastrico, nausea e vomito, che di solito regrediscono, ma l'ipercloridria può persistere più a lungo³.

La ricerca e la diagnosi di *H. pylori* ha assunto un grande interesse. Inizialmente sono state utilizzate tecniche invasive (ad esempio biopsie tissutali). Con il progresso in campo diagnostico, (specialmente della biologia molecolare) sono state proposte anche tecniche non invasive. La letteratura più recente per la diagnosi di infezioni da *H. pylori* ha focalizzato l'attenzione sui metodi non invasivi⁴. Ciononostante il metodo ideale non è ancora stato proposto⁵.

Biopsie Gastriche

La biopsia gastrica rappresenta il campione elettivo per l'esame colturale di *H. pylori*. I tentativi di colture con altri materiali hanno riscosso scarso successo⁶.

Le tecniche invasive per l'esame delle biopsie gastriche prelevate in endoscopia includono^{5,7,8}:

- Esame colturale
- Istologia
- Prova dell'ureasi sulla biopsia
- Microscopia
- Polymerase chain reaction (PCR)

Coltura

La coltura del microrganismo rappresenta il metodo più specifico e consente la possibilità di eseguire le prove convenzionali di sensibilità agli antimicrobici, qualora richiesti. Questa è importante per predire e valutare l'efficacia del trattamento ed identificare le re-infezioni.

Esame istologico

L'esame istologico esprime una sensibilità simile a quella dell'esame colturale per la ricerca di *H. pylori*, ma ha un maggior grado di specificità⁹.

L'esame colturale e quello istologico non sono in grado di fornire una diagnosi rapida.

Prova dell'ureasi sulla biopsia

La prova dell'ureasi è un metodo rapido, sensibile e di basso costo. I risultati positivi sono spesso disponibili in pochi minuti, ma l'esito negativo può richiedere un tempo notevolmente superiore, secondo le istruzioni del produttore. Si raccomanda il suo utilizzo associato all'esame colturale o istologico, in funzione delle disponibilità locali. Questa prova è spesso condotta nella sezione di endoscopia. Sono disponibili confezioni commerciali con elevato grado di accuratezza, ma queste sono anche costose.

Microscopia

I microrganismi possono essere colorati con Giemsa o Gram secondo le proprie preferenze. La sensibilità è stata segnalata superiore al 90% se sono esaminate due biopsie, ma questo metodo richiede una preparazione tecnica accurata. La biopsia rappresenta l'unico altro metodo rapido alternativo alla prova dell'ureasi.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR è stata utilizzata per la ricerca di *H. pylori* in numerosi campioni, sebbene il suo ruolo nella diagnosi di routine debba essere ancora stabilito.

Tecniche non Invasive

Le tecniche non invasive non necessitano di tecnica endoscopia invasiva e costosa e includono:

- Sierologia
- Urea breath test (UBT)
- Ricerche per antigeni fecali

Sierologia

In questi ultimi anni le prove che si avvalgono del metodo ELISA sono divenute più accurate. Sono disponibili un grande numero di confezioni commerciali¹⁰. Il rilievo delle IgG specifiche è utilizzato diffusamente ed ha la maggior evidenza in bibliografia, ma è disponibile anche il rilievo delle IgA, talvolta associato a marcatori di infezione. Sono disponibili alcune prove ambulatoriali che utilizzano sangue intero.

E' stato dimostrato che i risultati falsi positivi aumentano con l'età dei pazienti¹¹. L'utilizzo di questo tipo di prova per confermare l'eradicazione è limitata dalla variabile ma prolungata presenza di immunoglobuline dopo la guarigione da *H pylori*.

Urea breath test (UBT)

Gli UBT sono considerati lo standard diagnostico di riferimento¹². La molecola di urea utilizzata è marcata con ¹⁴C o ¹³C. La prima utilizza strumentazione semplice, ma la natura radioattiva della prova rende difficoltoso il suo utilizzo. La seconda molecola utilizza un isotopo stabile, ma richiede una strumentazione complessa. Diverse confezioni che utilizzano ¹³C marcato sono commercialmente disponibili con servizio postale o si avvalgono di strumentazione dedicata in loco. Possono essere approntati metodi in loco se il laboratorio dispone della spettrometria di massa.

Le prove UBT consentono una rapida verifica dell'eradicazione ma la raccolta del campione richiede tempo e sono necessarie conoscenze tecniche.

Prove per antigeni fecali

La prova per antigeni fecali di *H. pylori* (HpAF) è la più recente acquisizione nell'ambito delle diverse opzioni diagnostiche¹³. Queste prove possono essere eseguite lontano dal domicilio del paziente consentendo l'esecuzione contemporanea di numerosi campioni.

L'HpAF è una prova Immuno-enzimatica (EIA) non invasiva, dotata di elevata sensibilità e specificità¹³⁻¹⁵ ed è in grado di confermare l'eradicazione. La prova più utilizzata si avvale di anticorpi policlonali anti *H. pylori* a cattura assorbiti su pozzetti; è stato comunque sviluppata una prova con anticorpo monoclonale che è in corso di valutazione¹⁰.

Informazione Tecnica/Limitazioni

Limitazioni delle SMI del RU

Le raccomandazioni formulate nelle SMI del RU sono basate su prove (ad esempio sensibilità e specificità), se disponibili, opinioni degli esperti e pragmatismo, tenendo in considerazione anche le risorse disponibili. I laboratori dovranno tenere in considerazione le esigenze locali e intraprendere ricerche aggiuntive, se appropriato. Prima del loro uso, i laboratori devono assicurare che tutti i saggi commerciali e in-house sono stati validati e sono idonei allo scopo

Contenitori per campioni^{1,2}

Le SMI usano il termine " contenitore a chiusura ermetica con marchiatura CE " per descrivere quelli contrassegnati con la marchiatura CE per la raccolta e il trasporto dei campioni clinici. I requisiti per i contenitori dei campioni sono riportati nella Direttiva UE per i Dispositivi Sanitari Diagnostici in vitro (98/79/CE allegato 1 B 2.1) in cui si stabilisce: " La progettazione deve consentire un'agevole manipolazione e, se necessario, ridurre per quanto possibile la contaminazione dei, e perdite dal dispositivo durante l'uso e, nel caso di recipienti per campioni, il rischio di contaminazione degli stessi. Le procedure di fabbricazione devono essere adatte a questi scopi".

Condizioni Ottimali di Crescita

Le condizioni ottimali di crescita per l'isolamento di *H. pylori* sono rappresentate dall'umidità, atmosfera microaerofila di O₂ 5-7% e CO₂ 5 –10% a 35-37°C^{6,16}. Sono disponibili commercialmente confezioni che generano gas per creare condizioni microaerofile.

Attualmente non si dispone di un solo terreno ottimale per l'isolamento di *H. pylori*, sebbene si preferiscano i terreni contenenti sangue. Sono stati descritti alcuni terreni.¹⁶⁻¹⁹ I terreni privi di sangue, contenenti supplementi alternativi, possono non essere idonei per l'isolamento primario¹⁸.

Per inibire la sovracrescita di batteri contaminanti e funghi possono essere aggiunti antimicrobici ai terreni ²⁰.

H. pylori è sensibile a clindamicina, cefalosporine e sodio desossicolato, nessuno di questi composti deve essere utilizzato nei terreni selettivi¹⁸. Possono essere utilizzati i terreni selettivi per *Neisseria gonorrhoeae* sebbene circa il 5% degli isolati di *H. pylori* può essere inibito dalla colistina o dalla polimixina B in essi contenuti.

La contaminazione da muffe può essere ridotta aggiungendo un agente antifungino nel terreno quale la cicloesamide (100 mg/l) e con la pulizia della strumentazione prima e dopo l'utilizzo⁶. Si raccomanda di autoclavare i contenitori precedentemente risultati contaminanti con muffe.

I migliori risultati possono essere ottenuti utilizzando terreni selettivi e non selettivi²¹.

Le colture devono essere incubate fino a 7 giorni, sebbene le colonie siano di solito rilevabili in 3° – 5° giornata¹⁶

La colorazione di Gram che utilizza carbol fuxina di contrasto diluita migliora l'osservazione della morfologia

La conferma del riconoscimento del microrganismo si avvale della sua caratteristica morfologia a "gabbiano" negli strisci colorati al Gram, della prova dell'ossidasi e del test rapido dell'ureasi.

L'omogeneizzazione può essere approntata, ma richiede tempo e l'utilizzo della macina di Griffith o una sua alternativa infrangibile. Le biopsie possono essere tagliate in frammenti sottili utilizzando un bisturi sterile.

IN REVISIONE

1 Considerazioni sulla Sicurezza^{1,2,22-36}

1.1 Prelievo, Trasporto e Conservazione del Campione^{1,2,22-25}

Usare tecnica asettica

Raccogliere i campioni in appropriati contenitori impermeabili con marchiatura CE inserirli in sacchetti di plastica sigillati.

E' essenziale la conformità alle normative postali e dei trasporti.

1.2 Procedura sul Campione^{1,2,22-36}

Livello di Contenimento 2,

Le procedure di laboratorio che possono produrre aerosol devono essere condotte in cabina microbiologica di sicurezza²⁸.

Fare riferimento alle attuali linee guida per la manipolazione dei microrganismi descritti in questa SMI

Le linee guida precedentemente esplicitate devono essere supplementate con la COSHH locale e con la valutazione del rischio.

Prelievo del Campione

2.1 Tipo di campione

Biopsia gastrica

2.2 Tempo Ottimale e Metodo di Prelievo³⁷

Prelevare i campioni prima della terapia antibiotica

Prelevare i campioni prima della terapia antibiotica, se possibile³⁷.

I campioni devono essere trasportati e processati il più presto possibile (preferibilmente entro 6 ore)¹⁶.

Durante il trasporto è importante conservare l'atmosfera umida

Quando i tempi di consegna sono > 6 ore¹⁶.

La biopsia deve essere posta in un piccolo contenitore piccolo, sterile, quale una piccola provetta contenente una scarsa quantità (approssimativamente 100µl) di soluzione fisiologica sterile per conservare l'umidità. Può essere utilizzato il terreno di trasporto di Dent²⁰. Questo è disponibile presso il Gastrointestinal Bacteria Reference Unit (GBRU), Colindale.

Nota: La sensibilità della microscopia può essere ridotta se la biopsia è immersa in fisiologica, si formano infatti globuli di muco e diviene difficile la preparazione di uno striscio soddisfacente.

Quando l'esame colturale è eseguito entro 6 ore^{16,21}

La biopsia deve essere ricoperta con circa 1 ml di infuso di brodo di cuore e cervello in un piccolo contenitore sterile, quale una piccola provetta, e conservata a 4°C fino a 48 ore. Può essere utilizzato il terreno di trasporto di Dent. I microrganismi rimangono vitali nel terreno di trasporto, ma in caso di suo utilizzo, deve essere fare attenzione ad assicurare che la mucosa non si stacchi dal resto del materiale biotico²⁰.

Le biopsie possono essere conservate per più di 6 mesi a -70°C in brodo contenente glicerolo al 20-25%, sebbene la vitalità dei microrganismi risulti poi ridotta.

Se non altrimenti definito, i tamponi per l'esame colturale batterico e fungino devono essere inseriti nel terreno di trasporto³⁸⁻⁴².

Raccogliere i campioni diversi dai tamponi in contenitori impermeabili con marchiatura CE e inserirli in sacchetti di plastica sigillati.

I campioni della biopsie gastriche sono di solito prelevati dall'antro gastrico in endoscopia, talvolta dal corpo gastrico in funzione della localizzazione dell'infezione.

2.3 Quantità Adeguata e Numero Sppropriato di Campioni³⁷

Numero e frequenza della raccolta del campione dipendono dalle condizioni cliniche del paziente.

A discrezione dell'endoscopista in quanto dipende dal singolo paziente

3 Trasporto e Conservazione del Campione^{1,2}

3.1 Condizioni Ottimali di Trasporto e Conservazione

Per considerazioni sulla sicurezza fare riferimento alla Sessione 1.1

I campioni dovrebbero essere trasportati e processati il più presto possibile³⁷.

Se la procedura è ritardata, la refrigerazione è preferita alla conservazione a temperatura ambiente³⁷

4: Processo /Procedura sul Campione^{1,2}

4.1 Selezione della Prova

La prova dell'ureasi sulla biopsia è spesso eseguita nella sezione di endoscopia e pertanto al laboratorio si possono richiedere solo l'esame colturale e microscopico.

L'ordine con la quale qualcuna/tutte queste prove sono eseguite dovrà essere in accordo con il protocollo locale.

4.2 Aspetto

N/D

4.3 Preparazione del Campione

Per considerazioni sulla sicurezza fare riferimento alla Sessione 1.2.

4.4 Microscopia

Fare riferimento a [TP 39 – Staining procedures](#).

Microscopia eseguita usando la colorazione carbol fucsina di Sandiford

4.4.1 Standard

Raccogliere la biopsia con un tampone sterile e strisciare energicamente su un vetrino da microscopio pulito (è richiesto un vetrino sterile se l'esame microscopico è eseguito prima dell'esame colturale)

La colorazione e l'esame del preparato colorato sono richieste solo se il risultato dell'esame colturale è negativo e la prova dell'ureasi sulla biopsia è positiva. Sono idonee la colorazione di Gram o di Giemsa.

4.5 Coltura e ricerca

4.5.1 Pre-trattamento

N/D

4.5.2 Procedura sul campione

Coltura

Utilizzare lo stesso tampone contenente la biopsia per l'esame microscopico (se eseguito), inoculare ciascuna piastra di agar (consultare [Q 5 – Inoculation of culture media for Bacteriology](#))

Per l'isolamento di colonie isolate, diffondere l'inoculo utilizzando un'ansa sterile.

Nota: Si raccomanda di eseguire contemporaneamente la sottocultura di un ceppo di controllo noto di *H. pylori*, in modo particolare se deve essere eseguita la prova di sensibilità

Ceppi sensibili al metronidazolo – NCTC 12822.

Ceppi resistenti al metronidazolo – NCTC 12823.

Prova dell'ureasi sulla biopsia

Per la prova dell'ureasi spremere nel brodo la biopsia posta sull'estremità del tampone.

Il tampone dovrebbe essere rotto all'esterno del brodo e lasciato *in situ* durante la prova.

Incubare il brodo contenente ureasi a temperatura ambiente fino a 24 ore.

2.5.3 Terreni di coltura, condizione e microrganismi

Aspetti clinici/ condizioni	Terreni standard	Incubazione			Lettura colture	Microrganismo(i) ricercati
		Temp C°	Atmosfera	Tempo		
Gastrite Biopsia gastrica	Agar selettivo per <i>H. pylori</i> *	35 -37	microaerobica camera umida	7 giorni	a 4-5 giorni e 7 giorni	<i>H. pylori</i>
	Agar sangue	35 -37	microaerobica camera umida	7 giorni	a 4-5 giorni ed a 7 giorni	
Per queste situazioni aggiungere:						
Aspetti clinici/ condizioni	Terreni supplementari	Incubazione			Lettura colture	Microrganismo(i) ricercati
		Temp C°	Atmosfera	Tempo		
Prova dell'ureasi sulla biopsia se non prima eseguita nella sezione di endoscopia	Brodo ureasi per biopsia	ambiente	aria	24 ore	oraria fino alla 6° ora ed ancora a 24 ore	<i>H. pylori</i>
*Può essere usato il terreno selettivo GC se non si dispone del terreno per <i>H pylori</i>						

4.6 Identificazione

Per l'identificazione fare riferimento alle singole SMI

4.6.1. Livello minimo di identificazione in laboratorio

[H.pilory](#) livello specie

4.7 Prova di sensibilità agli Antimicrobici

Fare riferimento alle linee guida della [British Society for Antimicrobial Chemotherapy \(BSAC\)](#) e/o [EUCAST](#)

4.8 Invio per Ricerche su Focolaio Epidemico

N/D

4.9 Invio ai Laboratori di Riferimento

Per informazioni sulle prove disponibili, tempi di risposta, procedure per il trasporto e altre richieste del laboratorio di riferimento, [click here for user manuals and request forms](#).

Microrganismi con resistenze insolite o inattese, o qualora sussista un problema clinico o di laboratorio, o anomalie che richiedano approfondimenti devono essere inviati agli appropriati laboratori di riferimento.

Contattare l'appropriato laboratorio nazionale di riferimento per informazioni sulle prove disponibili, tempi di consegna, procedure di trasporto ed eventuali altri richieste per 'invio del campione:

Inghilterra e Galles

<http://www.hpa.org.uk/webw/HPAweb&Page&HPAwebAutoListName/Page/1158313434370?p=1158313434370>

Scozia

<http://www.hps.scot.nhs.uk/reflab/index.aspx>

Irlanda del Nord

<http://www.publichealth.hscni.net/directorate-public-health/health-protection>

5 Procedura di Refertazione

5.1 Microscopia

Colorazione di Gram (se eseguita)

Refertare presenza o assenza di microrganismi simili a *H. pylori*

5.1.1 Tempo per referto microscopico

N/D

3.2 Coltura

Quanto di seguito come appropriato:

Referto positivo:

Isolato *H. pylori*. ”

Referto negativo

“Non isolato *H. pylori*.

Prova dell'ureasi sulla biopsia:

Refertare la prova dell'ureasi sulla biopsia come positiva o negativa.

5.2.1 Tempo di refertazione della coltura

Risultati di colture clinicamente urgenti possono essere trasmessi per via telefonica o informatica.

Referto scritto: 24 ore per la prova dell'ureasi sulla biopsia (se non precedentemente eseguita nella sezione di endoscopia), indicando che per la coltura sarà inviato un altro referto.

Risultati della coltura entro sette giorni.

Prove supplementari: fino a sette giorni per la microscopia.

5.3 Prova di sensibilità agli antibiotici

N/D

6 Notifica al PH^{43,44} o Equivalente⁴⁵⁻⁴⁸⁻

Le Norme di Denuncia del 2010 rendono obbligatorio ai laboratori diagnostici di denunciare alla Public Health England (PHE) tutti i casi nei quali s'identificano gli agenti causali elencati nella Scheda 2 della Direttiva, Le denunce devono pervenire per scritto, su carta o per via elettronica,

entro sette giorni. I casi urgenti devono essere notificati il più presto possibile verbalmente: si raccomanda entro le 24 ore. Questi stessi devono essere in seguito denunciati in forma scritta entro sette giorni.

Secondo la Notification Regulations il laboratorio ricevente la notifica è l'ufficio locale della PHE. Se il caso è già stato notificato da un professionista medico abilitato, al laboratorio diagnostico è ancora richiesta la denuncia del caso qualora si riscontrino evidenze d'infezione imputabili ad agenti causali soggetti a tale disposizione.

La denuncia secondo la Direttiva dell'Health Protection (Notification) Regulations 2010 non sostituisce l'informazione volontaria alla PHE. La maggior parte dei laboratori del NHS segnala spontaneamente al PHE gran parte delle diagnosi di laboratorio sostenute da vari agenti eziologici e molte sezioni della PHE hanno definito accordi con i laboratori locali per segnalazioni urgenti di alcuni tipi d'infezione. Queste iniziative devono continuare.

Nota: La linea guida dell'Health Protection Legislation Guidance (2010) include la segnalazione per Human Immunodeficiency Virus HIV & Sexually Transmitted Infections STIs, Healthcare Associated Infections e HCAs e Creutzfeldt–Jakob disease CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non al 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories'.

<http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/HealthProtectionRegulations/>

Esistono accordi diversi in Scozia^{45,46}, Galles⁴⁷ e Irlanda del Nord⁴⁸.

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

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

Bibliografia

1. 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".
2. 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.
3. Parsonnet J. *Helicobacter*. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, editors. Infectious Diseases. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. p. 1952-61.
4. Cirak MY, Akyon Y, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2007;12 Suppl 1:4-9.
5. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:280-322.
6. Tompkins D. Microbiological tests. In: Northfield TC, Mendall M, Goggin PM, editors. *Helicobacter pylori* infection. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1993. p. 116-26.
7. Thillainayagam AV, Arvind AS, Cook RS, Harrison IG, Tabaqchali S, Farthing MJ. Diagnostic efficiency of an ultrarapid endoscopy room test for *Helicobacter pylori*. *GUT* 1991;32:467-9.
8. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:1-13.
9. McNulty CA, Wise R. Rapid diagnosis of *Campylobacter*-associated gastritis. *Lancet* 1985;1:1443-4.
10. Vaira D, Vakil N. Blood, urine, stool, breath, money, and *Helicobacter pylori*. *GUT* 2001;48:287-9.
11. Schembri MA, Lin SK, Lambert JR. Comparison of commercial diagnostic tests for *Helicobacter pylori* antibodies. *J Clin Microbiol* 1993;31:2621-4.
12. Logan RP. Urea breath tests in the management of *Helicobacter pylori* infection. *GUT* 1998;43 Suppl 1:S47-S50.
13. Ishihara S, Kaji T, Kawamura A, Rumi MA, Sato H, Okuyama T, et al. Diagnostic accuracy of a new non-invasive enzyme immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* in stools after eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:611-4.
14. Vaira D, Vakil N, Menegatti M, van't Hoff B, Ricci C, Gatta L, et al. The stool antigen test for detection of *Helicobacter pylori* after eradication therapy. *Ann Intern Med* 2002;136:280-7.
15. Manes G, Balzano A, Iaquinto G, Ricci C, Piccirillo MM, Giardullo N, et al. Accuracy of the stool antigen test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection before treatment and in patients on omeprazole therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:73-9.
16. Glupczynski Y. The diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a microbiologist's perspective. *Rev Med Microbiol* 1994;5:199-208.
17. Hachem CY, Clarridge JE, Evans DG, Graham DY. Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1995;48:714-6.

18. Tompkins DS. Isolation and characteristics of *Helicobacter pylori*. In: Rathbone B, Heatley RV, editors. *Helicobacter pylori* and infectious disease. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1992. p. 19-28.
19. Henriksen TH, Brorson O, Schoyen R, Thoresen T, Setegn D, Madebo T. Rapid growth of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:1008-11.
20. Dent JC, McNulty CA. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:555-8.
21. Tompkins D. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *PHLS Microbiol Dig* 1997;14:34-6.
22. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
23. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
24. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
25. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
26. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
27. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
28. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
33. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
34. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
35. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
36. 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

37. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB, Jr., et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis* 2013;57:e22-e121.
38. Rishmawi N, Ghneim R, Kattan R, Ghneim R, Zoughbi M, Abu-Diab A, et al. Survival of fastidious and nonfastidious aerobic bacteria in three bacterial transport swab systems. *J Clin Microbiol* 2007;45:1278-83.
39. Barber S, Lawson PJ, Grove DI. Evaluation of bacteriological transport swabs. *Pathology* 1998;30:179-82.
40. Van Horn KG, Audette CD, Sebeck D, Tucker KA. Comparison of the Copan ESwab system with two Amies agar swab transport systems for maintenance of microorganism viability. *J Clin Microbiol* 2008;46:1655-8.
41. Nys S, Vijgen S, Magerman K, Cartuyvels R. Comparison of Copan eSwab with the Copan Venturi Transystem for the quantitative survival of *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* and *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:453-6.
42. Tano E, Melhus A. Evaluation of three swab transport systems for the maintenance of clinically important bacteria in simulated mono- and polymicrobial samples. *APMIS* 2011;119:198-203.
43. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.
44. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
45. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
46. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
47. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
48. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).