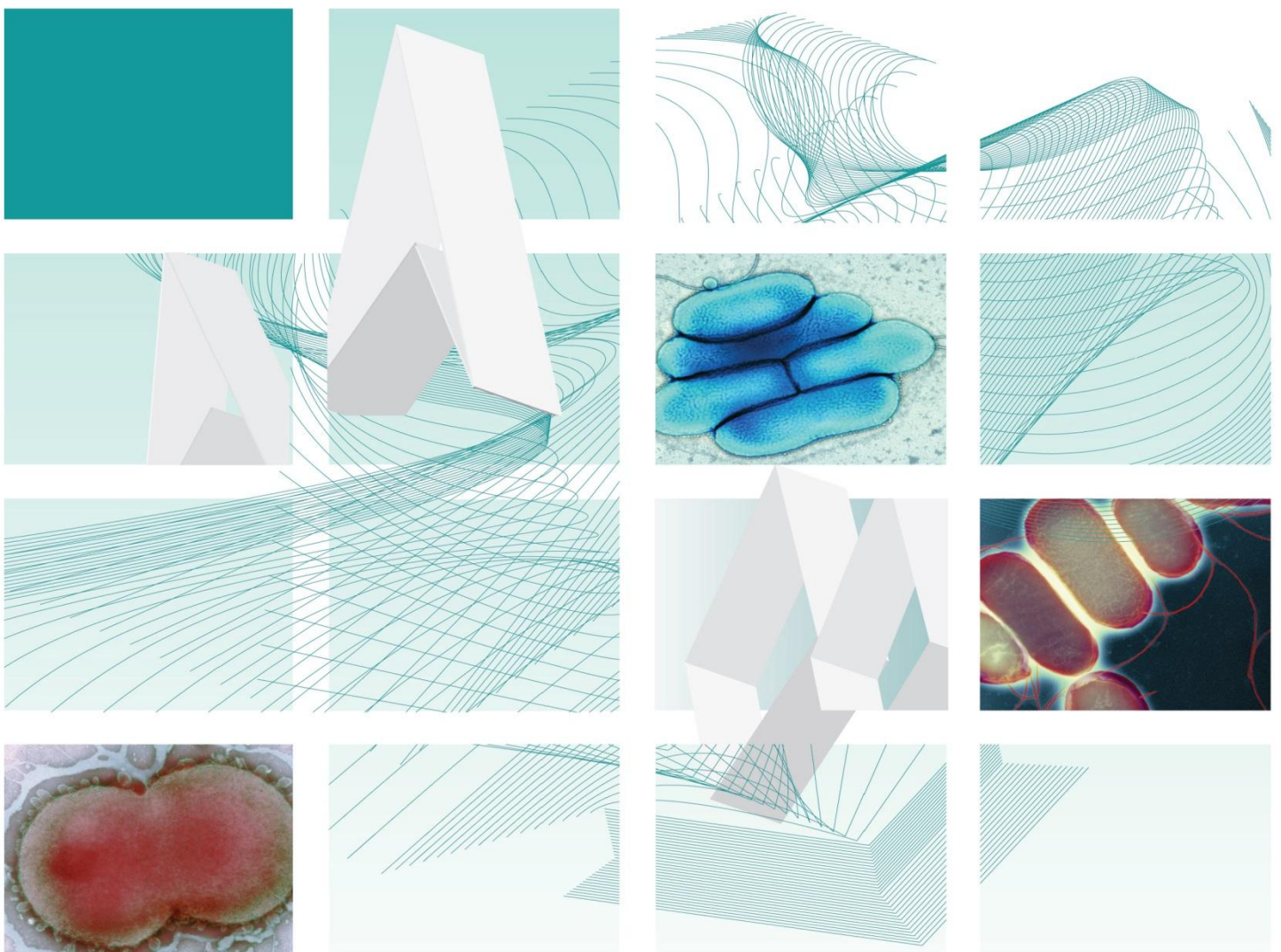




Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Ricerca di pertosse



"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**."

Emesso da Standards Unit, Microbiology Services, PHE

Batteriologia I B 6 | Emissione no: 9 | Data emissione:11.05.18 | Pagina 1 di 24

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
National Infection Service
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> <http://www.hpa.org.uk/SMI>

Numero di accesso alle pubblicazioni PHE: 2017313

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



I loghi sono aggiornati al momento della pubblicazione

Batteriologia | B 6 | Emissione no: 9 | Data emissione: 11.05.18 Pagina: 2 di 24

UK Standards for Microbiology Investigations | Emesso da Standards Unit, Public Health England

Contenuti

Ringraziamenti:	2
Tabella modifiche	4
SMI RU: scopo e obiettivo	5
Scopo del documento.....	8
introduzione	8
Informazione tecnica/limitazione	9
Gestione della salute pubblica	10
1 Considerazione sulla sicurezza	11
2 Prelievo del campione	11
3 Trasporto,conservazione e archiviazione del campione	12
4 Prcesso/procedura sul campione	12
5 Procedura di refertazione/interpretazione	16
6 Notifica alla PHE o equivalente	17
Appendice:ricerca per pertosse	18
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 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.	12/11.05.18
Emissione eliminata numero	8
Emissione inserita numero	9
Data anticipata prossima revisione*	11.05.21
Sezione(i) interessate	Modifica.
Intero documento	Documento presentato in un nuovo formato. Riorganizzazione di parte del testo. Edito per chiarezza. Modifiche minori del testo. Tutti i documenti con collegamenti ipertestuali aggiornati con l'indirizzo corretto. Aggiunta bibliografia alle linee guida PHE ove rilevanti.
Introduzione	Riscritta per maggiore chiarezza aggiungendo una sezione dettagliata sui metodi molecolari.
Informazione tecnica	Aggiunta sezione per PCR e sierologia.
4.1 Selezione del test	Sviluppata questa sezione per includere: 4.1.1 Coltura 4.1.2 PCR 4.1.3 Sierologia
4.5 Coltura e ricerca	Aggiunta sezione relativa alla PCR e sierologia
4.6 Identificazione	Aggiunta sezione relativa all'identificazione con MALDI-TOF
5 Procedura di refertazione	Aggiunta la sezione relativa all'interpretazione e alla segnalazione dei risultati della PCR e di sierologia
Appendice	Algoritmo aggiornato per includere la PCR e la sierologia come metodi diagnostici sottolineando la loro rilevanza in relazione all'insorgenza della tosse.

*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

[#] 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.

rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello 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, da chi sono state apportate e 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 Suggestita per questo Documento

Public Health England. (2018). Investigation of whooping cough. UK Standards for Microbiology Investigations. B 6 Emisione 9. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Scopo del Documento

Tipo di campione

Tampone transnasale, aspirato nasofaringeo, tampone nasofaringeo e siero ematico

La SMI del RU descrive l'indagine e la conferma di *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* per coltura e PCR in tamponi pernasali, aspirati nasofaringei, nasofaringei e con esami sierologici..

Questa SMI deve essere usata congiuntamente alle altre SMI.

Introduzione

La pertosse, comunemente noto nota come ("tosse asinina") è stata associata ad alta morbilità e mortalità, soprattutto nei neonati¹. La pertosse è una malattia molto contagiosa causata dai coccobacilli esigenti Gram negativi *B. pertussis* e *B. parapertussis* che colonizzano il tratto respiratorio². I sintomi principali includono malessere, febbre seguita da prolungati scoppi di tosse e senso di soffocamento che lasciano la persona infetta senza respiro con un caratteristico sibilo a urlo³.

B. pertussis di solito infetta e causa gravi disturbi respiratori negli infanti e quelli con meno di sei mesi sono più a rischio di complicanze gravi³. L'infezione può manifestarsi in adolescenti e adulti che presentano sintomi più lievi di tipo influenzale, seguiti da tosse persistente^{4,5}. Il periodo di incubazione della pertosse è in media tra 7-10 giorni (intervallo di 5-21)².

Nonostante un periodo prolungato di elevata copertura vaccinale, la pertosse continua a presentare picchi ciclici di attività ogni tre o quattro anni⁶. Un aumento dell'attività della pertosse è stata osservata in Inghilterra e Galles a partire dal terzo trimestre del 2011, soprattutto negli adolescenti e negli adulti. Questo aumento è proseguito nel 2012 e si è esteso ai bambini sotto i tre mesi che sono quelli a più alto rischio di gravi complicanze, di ospedalizzazione e di morte. (<https://www.gov.uk/government/collections/pertussis-guidance-data-and-analysis>).

Nel 2012, in risposta a un aumento significativo dei casi di pertosse confermati in laboratorio e agli alti tassi di malattia nei bambini piccoli, l'Health Protection Agency (Public Health England dall'aprile 2013) ha dichiarato un'incidenza di Livello 3 (focolaio nazionale)⁷. Il 28 settembre 2012, il Department of Health ha annunciato l'introduzione di un temporaneo programma per vaccinare le donne gravide contro la pertosse⁸. Questo programma temporaneo, che rappresenta una misura di controllo dell'epidemia, ha lo scopo di proteggere passivamente i bambini dalla nascita prima che raggiungano l'età della vaccinazione di routine e durante il periodo di rischio maggiore di complicazioni e decessi⁹. Dal 1° aprile 2016, la Public Health England suggerisce che il vaccino per la pertosse dovrebbe essere somministrato alle donne in gravidanza a partire dalla 16° settimana di gestazione, idealmente dopo l'ecografia per anomalia fetale (di solito effettuata a circa 20 settimane)¹⁰.

La diagnosi di pertosse è di solito chiara per chiunque, però sono notoriamente presenti forme fruste, che possono causare difficoltà di diagnosi, (malattia abortiva o atipica; malattia risolta prima che abbia concluso il suo corso completo). Si deve prendere in considerazione la valutazione dei casi di pazienti con pertosse nei quali l'infezione da *B. pertussis* o *B. parapertussis* non può essere dimostrata. Oltre al campionamento per la pertosse, si raccomanda che sia preso in considerazione per il paziente l'accertamento per virus respiratori secondo le procedure locali.

La conferma di laboratorio dei casi clinicamente sospetti può essere effettuata con la coltura e l'isolamento dei microrganismi responsabili *B. pertussis* e *B. parapertussis*; il rilevamento del loro DNA (tipicamente da tamponi nasofaringei / tamponi transnasali o aspirati nasofaringei) o test sierologici (i quali, di solito, permettono di ottenere una diagnosi ritardata o retrospettiva)¹¹. (consultare Appendice).

La coltura è normalmente eseguita per confermare l'infezione da *B. pertussis* e *B. parapertussis*. Il metodo è altamente specifico ma presenta scarsa sensibilità compresa fra il 20-40%. E' anche probabile che la coltura non abbia successo per il lungo tempo trascorso dall'inizio della malattia. La sensibilità diagnostica può essere ottimizzata integrando la coltura con metodi supplementari quali la PCR (polymerase chain reaction) e sierologici. La PCR è più sensibile della coltura in quanto non richiede microrganismi vitali. La sierologia è particolarmente utile per diagnosticare l'infezione in pazienti che hanno tossito per quattro settimane, quando si prevede che sia la coltura che la PCR non sarebbero utili^{4,12-22}.

La diagnosi precoce di laboratorio è importante per il controllo e la prevenzione della pertosse. L'isolamento e tipizzazione del microrganismo sono anche importanti per il monitoraggio continuo del programma vaccinale. La vaccinazione fornisce la strategia più efficace per prevenire la trasmissione della pertosse nella popolazione, anche se la protezione offerta da questa o da un'infezione pregressa non dura tutta la vita⁹.

Informazione tecnica/limitazioni

Limitazioni delle SMI

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 quelli in-house siano stati validati e idonei allo scopo

Terreni selettivi²³⁻²⁵

La natura dei terreni selettivi richiede un equilibrio tra le caratteristiche di prestazione e costi dei test. I terreni selettivi potrebbero non favorire la crescita di tutti i ceppi dei microrganismi circolanti. Fare riferimento alle istruzioni del produttore e ai recenti riscontri per le limitazioni di crescita.

I terreni devono consentire la crescita della *B. pertussis*, e *B. parapertussis*, sopprimere la flora nasofaringea ed essere stabili durante la loro conservazione. Sono disponibili diversi tipi di terreno contenenti sangue o carbone o entrambi, con supplemento di antibiotici selettivi quali – penicillina, cefalexina o meticillina.

La meticillina è la meno inibitoria per *B. pertussis*, ma è anche la meno inibitoria verso la flora nasofaringea. La cefalexina è la più inibitoria per la flora nasofaringea. La cefalexina svolge azione maggiormente inibitoria verso la flora nasofaringea ed è più attiva della penicillina. Per questi motivi è l'antibiotico di scelta proposto da questa SMI del RU da utilizzare nel terreno selettivo²⁵.

Le piastre di primo isolamento sono incubate a 35-37°C in atmosfera umida aerobica conservate per 7 giorni²⁴. Per l'incubazione prolungata è richiesta una piastra d'inclusione di spessore consistente per evitare l'essiccamento.

Tipo di campione

Le attuali raccomandazioni per il prelievo dei campioni consigliano l'utilizzo dell'aspirato nasofaringeo o del tampone nasofaringeo/tampone transnasale⁹. Oltre al campionamento per pertosse, si raccomanda che sia presa in considerazione la ricerca nel paziente per virus respiratori secondo le procedure locali.

Il siero da sangue venoso è il campione di scelta per il test sierologico della pertosse.

Le piastre seminate con colpi di tosse non sono raccomandate.

Tamponi transnasali

I tamponi di dacron e rayon sono quelli indicati per la PCR e l'esame colturale. Entrambi i tipi di materiale sintetico hanno fornito buone prestazioni in studi, con risultato per nessuno dei due superiori all'altro²⁶.

PCR e sierologia

Si deve notare che l'implementazione della PCR locale e la diagnosi basata sulla sierologia della pertosse dovrebbero essere validate nella routine clinica prima di essere utilizzate.

Contenitori per campioni

Le SMI usano il termine "marchiatura CE del contenitore impermeabile" 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."

Gestione della salute pubblica

Fare riferimento alle seguenti linee guida:

Inghilterra e Galles:

<https://www.gov.uk/government/collections/pertussis-guidance-data-and-analysis>

Scotia:

<http://www.hps.scot.nhs.uk/immvax/pertussis-whoopingcough.aspx>

Irlanda del Nord:

<http://www.publichealth.hscni.net/whooping-cough>

1 Considerazioni sulla Sicurezza²⁷⁻⁴²

1.1 Prelievo, trasporto e conservazione^{22-32,43}

Usare tecnica asettica

Raccogliere i campioni in appropriato terreno di trasporto in contenitori impermeabile con marchiatura CE a tenuta ermetica e trasportarli in sacchetti di plastica sigillati.

E' essenziale la conformità alle normative postali e dei trasport

1.2 Procedura sul campione²⁷⁻⁴²

Livello di contenimento 2

Le procedure di laboratorio che si ritiene possano generare aerosol infettivi devono essere eseguite in cabina microbiologica di sicurezza³⁵.

Come minimo, si raccomanda che la procedura di qualsiasi coltura che possa comportare la generazione di aerosol debba essere eseguita in una cabina microbiologica di sicurezza in conformità con la valutazione del rischio pertinente, linee guida ACDP e HSE. Le procedure sulle colture dei campioni diagnostici valutati ad alto rischio, volte a contenere i microrganismi di rischio del gruppo 3, devono essere intraprese in condizioni appropriate determinate dalla valutazione del rischio stesso, come richiesto da agenti Biologici: gestione dei rischi nei laboratori e strutture sanitarie³⁵. Questo sarà normalmente in condizioni complete di CL3. Tali microrganismi includono specie *Mycobacterium*, specie *Brucella*, *Bacillus anthracis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, ecc.

Fare riferimento alle attuali linee guida sulla manipolazione sicura dei microrganismi riportati in questa SMI RU:

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

2 Prelievo del campione

2.1 Tipo di campione

Tampone transnasale, aspirato nasofaringeo, tampone nasofaringeo e / o sangue, come appropriato per il test eseguito.

2.2 Tempo ottimale e metodo di prelievo⁴⁴

Per considerazioni sulla sicurezza fare riferimento alla Sezione 1.1

Prelevare i campioni prima della terapia antimicrobica, quando possibil⁴⁴.

I tamponi devono essere prelevati e trasportati in terreno progettato per favorire la crescita di microrganismi.

Tamponi transnasali

Un tampone transnasale (Dacron o rayon con filo di supporto flessibile) è inserito attraverso la narice e fatto penetrare lungo la base del naso fino a raggiungere il nasofaringe. E' stato consigliato di mantenere il tampone contro la parete posteriore del nasofaringe per almeno 30 secondi o fino a quando il paziente tossisce. E' più verosimile, nella pratica, che il paziente sia in grado di tollerare questa condizione per pochi secondi.

Tamponi nasofaringei

La raccolta delle secrezioni nasofaringee nei pazienti con pertosse può fare insorgere un eccesso parossistico di tosse e determinare l'ostruzione delle vie aeree. Se si sospetta un caso di pertosse deve essere disponibile la strumentazione per la rianimazione. Il sanitario che raccoglie il prelievo deve evitare di esporsi direttamente ai colpi di tosse del paziente.

L'essudato nasofaringeo può essere raccolto utilizzando un catetere da suzione (French No. 8) inserito attraverso il naso. L'essudato è raccolto in un contenitore sterile di plastica con il quale il campione è trasportato al laboratorio, oppure in un contenitore sterile di plastica trasparente di tipo comune (da 30 o 60 ml, vedi BS 5213)

Nota: Non sono raccomandate le piastre esposte a colpi di tosse⁴⁵.

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

Salvo diversa indicazione, i tamponi per la coltura batterica e fungina dovrebbero essere inseriti in appropriati terreni di trasporto⁴⁶⁻⁵⁰.

Si noti che la coltura può essere influenzata da diversi fattori, in quanto il microrganismo è delicato, compresi i ritardi nella procedura e la qualità dei campioni⁵¹.

2.3 Quantità adeguata e numero appropriato di campioni⁴⁴

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

3 Trasporto, conservazione e archiviazione del campione^{27,28}

3.1 Tempo ottimale e conservazione del campione

Per considerazioni sulla sicurezza fare riferimento alla Sezione 1.1

I campioni devono essere trasportati e processati il più presto possibile⁴⁴.

I campioni devono essere conservati in conformità con le linee guida del Royal College of Pathologists. Conservazione e archiviazione di documenti e campioni patologici⁵².

4 Procedura sul campione^{27,28}

4.1 Selezione della prova

4.1.1 Coltura

La conferma di laboratorio è solitamente eseguita con la coltura e l'isolamento di *B. pertussis* / *B. parapertussis* da aspirato nasofaringeo o tampone nasofaringeo/tampone transnasale. La coltura ha un'ottima specificità ed è utile per confermare la diagnosi della pertosse quando si sospetta un focolaio.

È meglio ottenere una coltura da campioni rinofaringei raccolti durante le prime 2 settimane di tosse. In questo periodo nel rinofaringe sono ancora presenti batteri vitali. Dopo le prime 2 settimane, la sensibilità diminuisce e aumenta il rischio di falsi negativi.

È importante notare che *B. pertussis* e *B. parapertussis* sono microrganismi delicati e quindi i ritardi nella procedura possono influire sulla probabilità di una coltura positiva. La sensibilità dipende anche in modo particolare dalla qualità del campione ed è influenzata dall'aumento dell'età del paziente, dallo stato di vaccinazione e dalla durata della malattia.

È improbabile che le colture siano positive negli adolescenti e negli adulti con più di 3 settimane di tosse¹⁵.

È ancora più difficile recuperare il microrganismo in vaccinati rispetto ai bambini non vaccinati⁵³. Considerati i limiti dei metodi colturali, è importante sottolineare che una coltura negativa non esclude la pertosse.

4.1.2 PCR

La PCR è solitamente più sensibile della coltura in quanto il microrganismo non richiede di essere vitale; tuttavia, la PCR ha meno probabilità di essere positiva nei pazienti con una durata sintomatica di oltre 4 settimane. Mentre i tamponi nasofaringei sono preferibili per il test della PCR, i tamponi faringei possono essere utilizzati se i tamponi nasofaringei non sono disponibili, specialmente nelle strutture comunitarie.

Gli sviluppi nella PCR hanno permesso di rilevare le coinfezioni e la differenziazione di *B. pertussis* e *B. parapertussis* da altre specie di *Bordetella*⁵⁴⁻⁵⁹.

4.1.3 Sierologia

La rilevazione di anticorpi IgG anti-tossina antipertosse (TP) e anticorpi IgG anti adesina filamentosa dell'emoagglutinina (AFE) nel siero prelevati almeno quattordici giorni dopo l'inizio della tosse con un saggio immunoenzimatico (ELISA) è in grado di fornire la prova di conferma dell'infezione recente con specie *Bordetella*.

La sierologia può essere utile per confermare la diagnosi di pertosse nei pazienti con durata della tosse superiore a 2 o 3 settimane, quando è improbabile che la coltura e la PCR producano risultati positivi.

Il test sierologico IgG anti-PT non può tuttavia essere utilizzato per determinare l'immunità in quanto attualmente non esistono correlazioni concordate con la protezione. Questo test sierologico è rivolto ai bambini più grandi e agli adulti. L'interpretazione dei livelli di IgG anti-PT tra neonati e bambini più piccoli può essere confusa dalla presenza di anticorpi materni o da vaccinazioni primarie e di richiamo recenti o da una risposta atipica. I dati suggeriscono che il periodo di confusione successivo alla vaccinazione può essere estendersi fino a 10 mesi dopo la vaccinazione primaria e fino a 3 anni o più dopo il richiamo della scuola dell'infanzia⁶⁰. Pertanto, i test sierologici devono essere eseguiti solo se è intercorso un minimo di 1 anno dalla dose primaria o di richiamo di vaccino contenente pertosse e i risultati devono essere interpretati con cautela.

4.2 Aspetto

N/D

4.3 Preparazione del campione

Per considerazioni sulla sicurezza fare riferimento alla Sezione 1.2

4.4 Microscopia

N/D

4.5 Ricerca di laboratorio

4.5.1 Tamponi transnasali e nasofaringei

Inoculare ciascuna piastra di agar con il tampone (fare riferimento a [Q 5 – Inoculation of Culture media for bacteriology](#)).

Per la crescita di colonie isolate, diffondere l'inoculo con ansa sterile

Aspirato nasofaringeo

Usando un'ansa sterile inoculare una parte rappresentativa del campione e seminare il contenuto di un'ansa in ogni piastra di agar. (fare riferimento a [Q 5 – Inoculation of Culture Media for Bacteriology](#)).

Per isolamento di singole colonie, diffondere l'inoculo con ansa sterile.

Aspetti clinici/ condizioni	Campione	Terreni Standard	Incubazione			Lettura colture	Microorganismo(i) bersaglio
			Temp °C	Atmos	Tempo		
Pertosse o Tosse asinina	Tampone transnasale, aspirato nasofaringeo tampone nasofaringeo	Agar sangue carbone con cefalexina	35-37	Aria Camera umida	7g	4°g e 7°g	<i>B. pertussis</i> <i>B. paraptussis</i>

4.5.2 PCR e sierologia

Eeguire i test locali validati e approvati PCR, qPCR e sierologia (ELISA o altri).

La seguente tabella descrive un approccio completo ad alcuni target PCR utilizzati per rilevare le co-infezioni e per l'identificazione e la differenziazione delle specie, secondo quanto noto al momento della stesura di questo documento⁶¹.

Specie	IS481 ^a	PtxS1 ^b	hIS1001 ^c	PIS1001 ^d
<i>B. pertussis</i>	+	+	-	-
<i>B. paraptussis</i> ^e	-	+	-	+
<i>B. holmesii</i>	+	-	+	-
<i>B. pertussis</i> and <i>B. paraperussis</i>	+	+	-	+
<i>B. pertussis</i> and <i>B. holmesii</i>	+	+	+	-

(a) Elemento di inserzione comunemente presente in *B. pertussis* e *B. holmesii*

(b) subunità di tossina pertosse S1 trovata in *B. pertussis* e *B. paraptussis*

(c, d) Target presenti in *B. holmesii* e *B. paraptussis*, utilizzati in multiplex PCR con IS481 per rilevare e differenziare *B. pertossis*, *B. paraptussis* e *B. holmesii*.

(e) Un campione positivo per pIS1001 può essere considerato molto probabilmente contenente *B. paraptussis*, ma la possibilità che sia positiva per *B. bronchiseptica* non può essere totalmente esclusa.

4.6 Identificazione

Per l'identificazione dei microrganismi fare riferimento alle singole SMI RU.

Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ha dimostrato di essere uno strumento di identificazione rapido e potente per isolati coltivati a causa della sua riproducibilità, velocità e sensibilità dell'analisi. Il vantaggio di MALDI-TOF rispetto ad altri

metodi di identificazione è dovuto alla disponibilità dei risultati delle analisi ottenuti entro poche ore anziché diversi giorni⁶². Sempre più MALDI-TOF viene utilizzato per identificare i batteri (comprese le specie *Bordetella*) nei laboratori di microbiologia ospedaliera⁶³. Tuttavia, attualmente sono disponibili pochissime informazioni scientifiche sull'uso di MS MALDI-TOF per il rilevamento delle specie *Bordetella*⁶⁴. Fare riferimento alla SMI del RU [TP 40 - MALDI TOF MS test procedure](#).

4.6.1 Livello minimo di identificazione in laboratorio

Bordetella species	Livello "specie"
------------------------------------	------------------

4.7 Prova di sensibilità agli antimicrobici

N/D

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](#).

Per la ricerca di focolai sospetti o epidemie di pertosse, si consiglia di contattare la Respiratory and Vaccine Preventable Bacteria Reference Unit, (RVPBRU) Colindale per l'accertamento più appropriato.

Informazioni riguardanti laboratori specializzati e di riferimento sono disponibile tramite il seguente sito web [PHE - specialist and reference microbiology tests and services](#).

Fare riferimento alle [PHE guidelines per la gestione pubblica della pertosse](#)

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.

Contattare gli appropriati laboratori nazionali specializzati per informazioni sulle prove disponibili, tempi di risposta, procedure di trasporto e altre richieste per l'invio del campione.

Inghilterra e Galles

<https://www.gov.uk/specialist-and-reference-microbiology-laboratory-tests-and-services>

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/interpretazione

5.1 Coltura

Negativi

⁰
Bordetella pertussis NON isolata” o

“*Bordetella parapertussis* NON isolata”

Positiva

Bordetella pertussis isolata” o

“*Bordetella parapertussis* isolata”

5.2 PCR

Segnalazione suggerita per i target menzionati utilizzati nel rilevamento della PCR della pertosse.

IS481 ^a	Ptx S1 ^b	hIS1001 ^c	PIS1001 ^d	Referto
+	+	-	-	DNA di <i>B. pertussis</i> rilevato
-	+	-	+	DNA di <i>B. parapertussis</i> rilevato
+	-	+	-	DNA di <i>B. holmesii</i> rilevato
+	+	-	+	DNA di <i>B. pertussis</i> e <i>B. parapertussis</i> rilevato
+	+	+	-	DNA di <i>B. pertussis</i> and <i>B. holmesii</i> rilevato

5.3 Sierologia

Un caso di pertosse è sierologicamente confermato quando la concentrazione di IgG anti-PT è >70 Unità Internazionali per millilitro (UI/mL) in assenza di vaccinazione recente (nell'ultimo anno)⁶⁵.

Un caso di parapertosse è confermato sierologicamente quando vi è un significativo aumento di IgG anti-FHA senza un aumento degli anticorpi anti-PT IgG, IgM e IgA. Se entrambe le IgG anti-PT e le IgG anti-FHA aumentano significativamente, i risultati sono indicativi di infezione da specie *Bordetella*⁶⁶.

6 Notifica al PHE^{67,68} o Equivalente⁶⁹⁻⁷²

Le Norme di Denuncia del 2010 rendono obbligatorio ai laboratori diagnostici di denunciare alla Public Health England (PHE) i casi nei quali 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 2010 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.

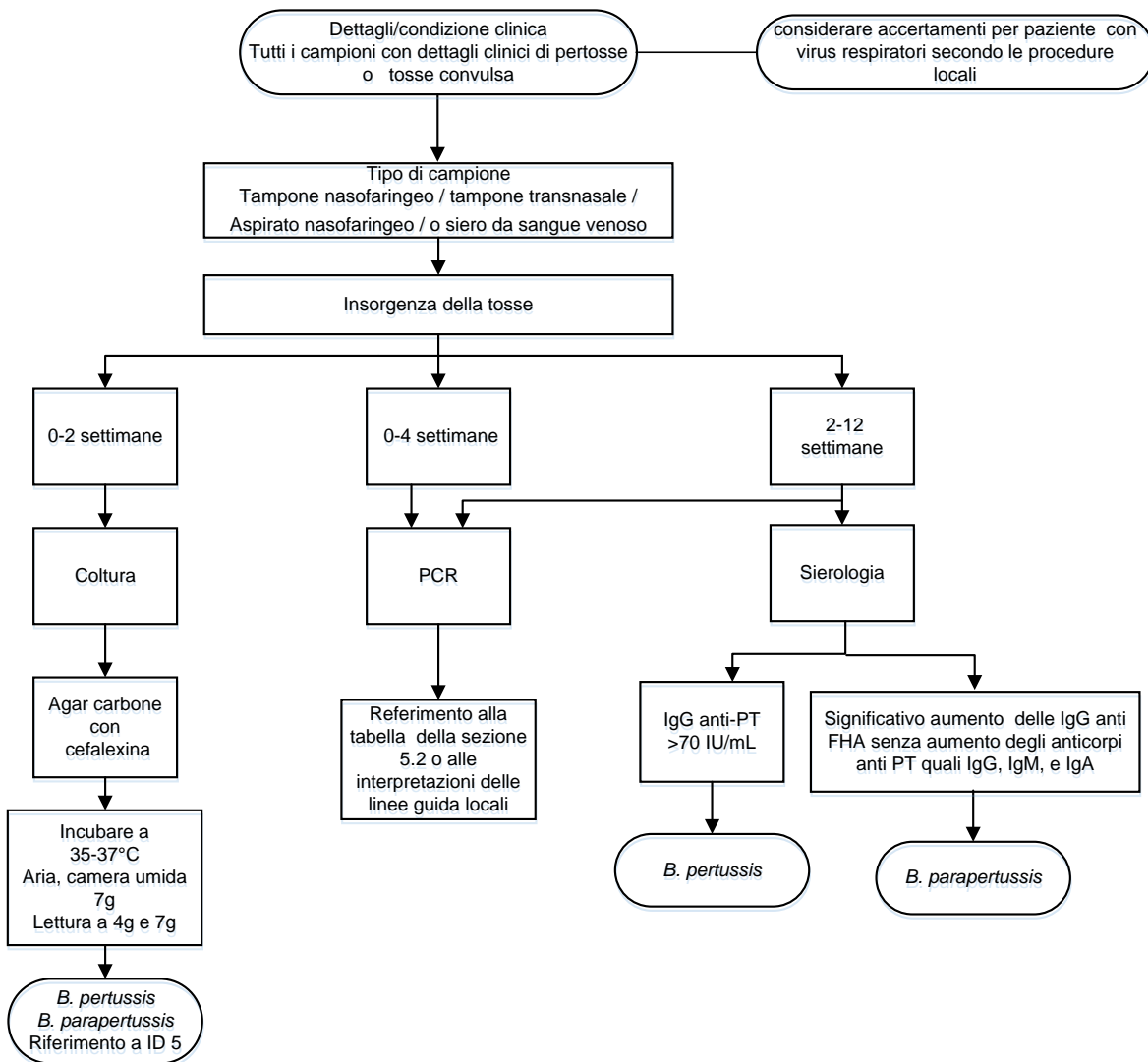
La denuncia secondo la Direttiva dell'Health Protection (Notification) Regulations 2010 non sostituisce l'informazione volontaria alla PHE. La maggior parte dei laboratori del NHS segnala spontaneamente alla PHE gran parte delle diagnosi di laboratorio sostenute da vari agenti eziologici e molte sezioni 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 HCAIs e Creutzfeldt–Jakob disease CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non al 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories'.

<https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/our-governance#health-protection-regulations-2010>

In [Scotland](#)^{69,70}, [Wales](#)⁷¹ e [Northern Ireland](#)⁷² sono vigenti altre disposizioni.

Appendice: Ricerca di pertosse



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. Cherry JD. Pertussis in young infants throughout the world. *Clinical Infectious Diseases* 2016;63:S119-S22. **A, III**

2. Zlomy M. Rediscovering Pertussis. *Front Pediatr* 2016;4:52. **A, III**

3. Cherry JD, Tan T, Wirsing Von Konig CH, Forsyth KD, Thisyakorn U, Greenberg D et al. Clinical definitions of pertussis: Summary of a global pertussis initiative roundtable meeting, february 2011. *Clinical Infectious Diseases* 2012;54:1756-64. **A, III**

4. Miyashita N, Akaike H, Teranishi H, Kawai Y, Ouchi K, Kato T et al. Diagnostic value of symptoms and laboratory data for pertussis in adolescent and adult patients. *BMC Infect Dis* 2013;13:129. **B, I**

5. Teepe J, Broekhuizen BD, Ieven M, Loens K, Huygen K, Kretzschmar M et al. Prevalence, diagnosis, and disease course of pertussis in adults with acute cough: a prospective, observational study in primary care.

British Journal of General Practice 2015;65:e662-7. **A, I**

6. Versteegh FGA. The re-emergence of pertussis. *Pediatric Pulmonology* 2014;49:S13-S4. **B, VI**

7. Public Health England. Pertussis: laboratory confirmed cases reported in England 2017. 2017.

8. Department of Health. Pregnant women to be offered whooping cough vaccination. 2012. **A, V**
9. Public Health England. Guidelines for the Public Health Management of Pertussis. 2016. **A, V**
10. Public Health England. Vaccination against pertussis (Whooping cough) for pregnant women. 2016. **A, V**
11. Nunes MC, Soofie N, Downs S, Tebeila N, Mudau A, De Gouveia L et al. Comparing the yield of nasopharyngeal swabs, nasal aspirates, and induced sputum for detection of bordetella pertussis in hospitalized infants. *Clinical Infectious Diseases* 2016;63:S181-S6. **A, II**
12. Curran T, Coyle PV. Understanding the true burden and infection dynamics of Bordetella pertussis using molecular diagnostics. *Journal of Infection* 2016;72:504-5. **B, VI**
13. Qin X, Zerr DM, Kronman MP, Adler AL, Berry JE, Rich S et al. Comparison of molecular detection methods for pertussis in children during a state-wide outbreak. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2016;15 (1) (no pagination). **A, II**
14. Vaz-de-Lima LRA, Martin MD, Pawloski LC, Leite D, Rocha KCP, De Brito CA et al. Serodiagnosis as adjunct assay for pertussis infection in Sao Paulo, Brazil. *Clinical and Vaccine Immunology* 2014;21:636-40. **B, I**
15. Wirsing Von Konig CH. Pertussis diagnostics: Overview and impact of immunization. *Expert Review of Vaccines* 2014;13:1167-74. **B, III**
16. Bock JM, Burtis CC, Poetker DM, Blumin JH, Frank MO. Serum immunoglobulin G analysis to establish a delayed diagnosis of chronic cough due to Bordetella pertussis. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 2012;146:63-7. **B, III**
17. DeVincenzo JP, Guyton C, Rea H, Elmore E, Patel S, Wynn L et al. Molecular detection and quantification of pertussis and correlation with clinical outcomes in children. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013;76:10-5. **B, II**
18. Qin X. Resurgence of Pertussis and Its Laboratory Diagnosis. *Clinical Microbiology Newsletter* 2015;37:69-76. **A, III**
19. Stone BL, Daly J, Srivastava R. Duration of Bordetella pertussis polymerase chain reaction positivity in confirmed pertussis illness. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* 2014;3:347-9. **A, I**
20. Zouari A, Smaoui H, Kechrid A. The diagnosis of pertussis: Which method to choose? *Critical Reviews in Microbiology* 2012;38:111-21. **A, III**
21. Bahtouee M, Moezzi SH, Nasirbagheban Z, Panahinia P. Evaluation of IgG serum level and PCR of respiratory secretion for Bordetella pertussis among adult suspected patients with whooping cough more than two weeks. *European Respiratory Journal Conference: European Respiratory Society Annual Congress* 2014;44. **B, II**
22. Baier M, Bohnert J, Hermann B, Pfister W. Comparison of three serological tests for pertussis antibody detection with respect to clinical data. *International Journal of Medical Microbiology* 2013;303:10. **B, VI**
23. Ruijs GJ, Groenendijk TW, Biever M. Shelf life of prepared Bordet-Gengou and Regan-Lowe agar plates for isolation of Bordetella pertussis. *EurJ Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:974-8. **B, II**

24. Hoppe JE, Schlagenhaut M. Comparison of three kinds of blood and two incubation atmospheres for cultivation of *Bordetella pertussis* on charcoal agar. *JClinMicrobiol* 1989;27:2115-7. **B, II**
25. Stauffer LR, Brown DR, Sandstrom RE. Cephalixin-supplemented Jones-Kendrick charcoal agar for selective isolation of *Bordetella pertussis*: comparison with previously described media. *JClinMicrobiol* 1983;17:60-2. **B, II**
26. Cloud JL, Hymas W, Carroll KC. Impact of nasopharyngeal swab types on detection of *Bordetella pertussis* by PCR and culture. *JClinMicrobiol* 2002;40:3838-40. **B, II**
27. 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, V**
28. 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, V**
29. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 2009. **A, V**
30. Department for Transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011. **A, V**
31. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2017-2018. 2017. **A, V**
32. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001. **A, V**
33. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive 2013. 1-35. **A, V**
34. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office 2003. **A, V**
35. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive 2005. **A, V**
36. 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, V**
37. 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, IV**
38. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002 (as amended). HSE Books,. 2013. **A, V**
39. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books,. 2002. **A, V**

40. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books 2003. **A, V**
41. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets 2000. **A, V**
42. 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, V**
43. Department of Health. Transport of Infectious Substances. Best Practice Guidance for Microbiology Laboratories. Department of Health. 1-13. 2007. **A, V**
44. 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). *ClinInfectDis* 2013;57:e22-e121. **B, V**
45. Maiya S, Desai M, Baruah A, Weller P, Clarke JR, Gray J. Cough plate versus cough swab in patients with cystic fibrosis; a pilot study. *Arch Dis Child* 2004;89:577-9. **B, II**
46. 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. *JClinMicrobiol* 2007;45:1278-83. **B, II**
47. Barber S, Lawson PJ, Grove DI. Evaluation of bacteriological transport swabs. *Pathology* 1998;30:179-82. **C, II**
48. 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. *JClinMicrobiol* 2008;46:1655-8. **B, II**
49. 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*. *EurJClinMicrobiolInfectDis* 2010;29:453-6. **B, II**
50. 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. **B, II**
51. Crowcroft NS, Booy R, Harrison T, Spicer L, Britto J, Mok Q et al. Severe and unrecognised: pertussis in UK infants. *ArchDisChild* 2003;88:802-6. **B, II**
52. The Royal College of Pathologists. The retention and storage of pathological records and specimens (5th edition). 1-59. 2015. **A, V**
53. Bamberger ES, Srugo I. What is new in pertussis? *Eur J Pediatr* 2008;167:133-9. **B, II**
54. Cox HC, Jacob K, Whiley DM, Bletchly C, Nimmo GR, Nissen MD et al. Further evidence that the IS481 target is suitable for real-time PCR detection of *Bordetella pertussis*. *Pathology* 2013;45:202-3. **B, VI**
55. Gao F, Mahoney JC, Daly ER, Lamothe W, Tullo D, Bean C. Evaluation of a multitarget real-time PCR assay for detection of *Bordetella* species during a pertussis outbreak in New Hampshire in 2011. *Journal of clinical microbiology* 2014;52:302-6. **B, III**

56. Fry NK, Duncan J, Wagner K, Tzivra O, Doshi N, Litt DJ et al. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. *Journal of medical microbiology* 2009;58:1023-9. **B, I**
57. Loeffelholz M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests. *Journal of clinical microbiology* 2012;50:2186-90. **A, II**
58. ECDC. Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *Bordetella parapertussis*. 2012. **A, IV**
59. Tatti KM, Tondella ML. Utilization of multiple real-time PCR assays for the diagnosis of *Bordetella* spp. in clinical specimens. *Methods in Molecular Biology* 2013;943:135-47. **A, IV**
60. Fry NK, Litt DJ, Duncan J, Vaghji L, Warrener L, Samuel D et al. Modelling anti-pertussis toxin IgG antibody decay following primary and preschool vaccination with an acellular pertussis vaccine in UK subjects using a modified oral fluid assay. *Journal of medical microbiology* 2013;62:1281-9. **A, IV**
61. Tatti KM, Sparks KN, Boney KO, Tondella ML. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens. *Journal of clinical microbiology* 2011;49:4059-66. **A, I**
62. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:5402-7. **B, II**
63. ECDC. EQA scheme for *Bordetella* identification and *B.pertussis* typing. Stockholm: ECDC; 2014. **B, III**
64. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:547-603. **B, II**
65. Xing D, Wirsing von Konig CH, Newland P, Riffelmann M, Meade BD, Corbel M et al. Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:303-11. **A, I**
66. Lind-Brandberg L, Welinder-Olsson C, Lagergard T, Taranger J, Trollfors B, Zackrisson G. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. *Journal of clinical microbiology* 1998;36:679-83. **A, I**
67. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. Public Health England 2016. 1-29. **A, V**
68. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 1-112. 2010. **A, V**
69. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008. **A, V**
70. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009. **A, V**
71. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010. **A, V**
72. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967. **A, V**

