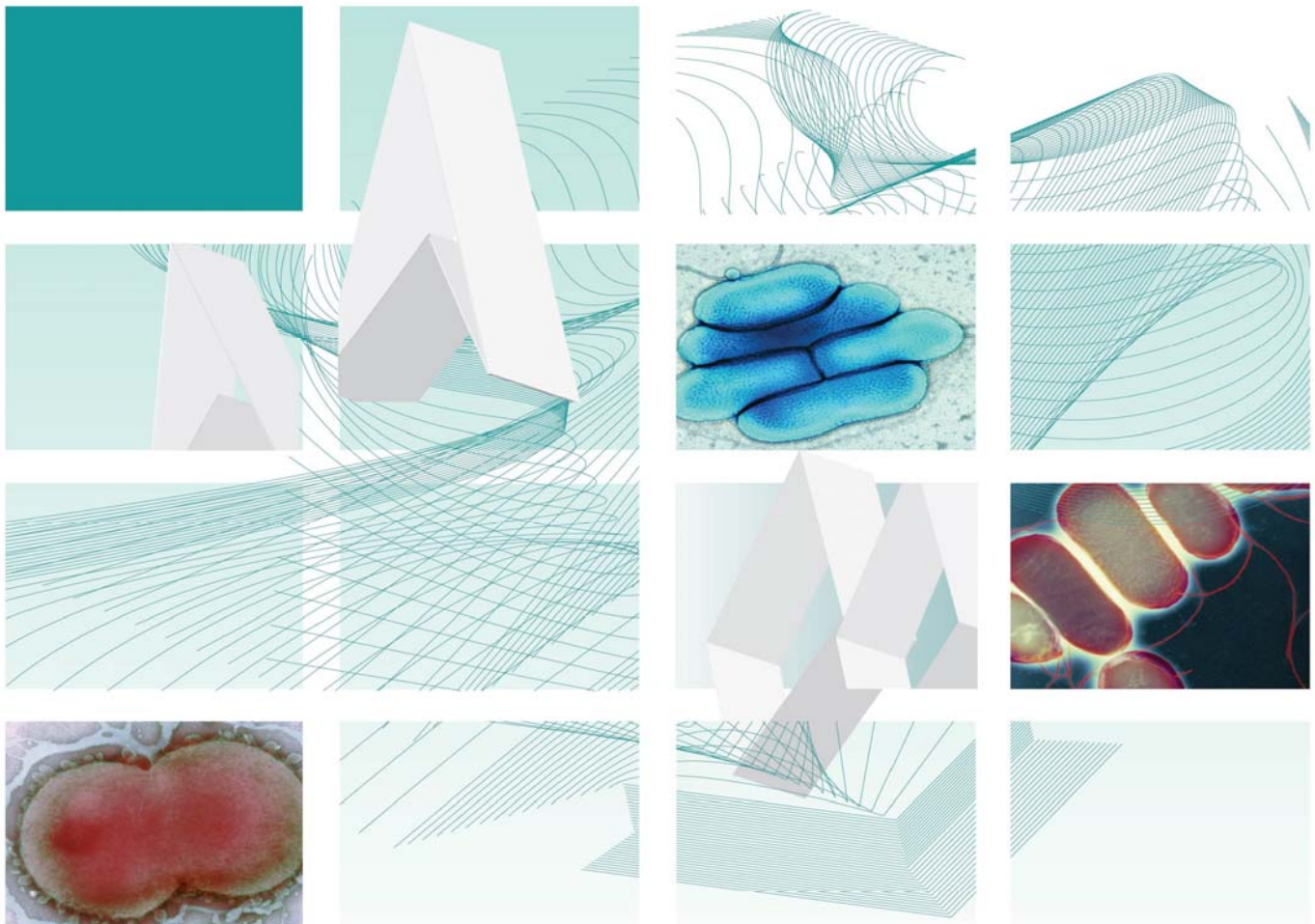




Protezione e miglioramento della salute pubblica nazionale

Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito

Identificazione di specie *Campylobacter*



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
Microbiology Services
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>

Numero pubblicazioni della PHE 2015013

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



I loghi sono aggiornati al momento della pubblicazione

Contenuti

RINGRAZIAMENTI.....	2
TABELLA MODIFICHE	4
RICERCHE MICROBIOLOGICHE STANDARD DEL REGNO UNITO: SCOPO E OBIETTIVO.....	6
SCOPO DEL DOCUMENTO	9
INTRODUZIONE.....	9
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI.....	10
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA	12
2 MICRORGANISMI BERSAGLIO.....	12
3 IDENTIFICAZIONE	12
4 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE <i>CAMPYLOBACTER</i>	17
5 REFERTAZIONE	18
6 INVII	19
7 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE.....	19
BIBLIOGRAFIA.....	21



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@pphe.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.	5/17.06.15
Emissione eliminata. no	2.2
Emissione inserita no.	3
Sezione(i) interessate	Modifica
Intero documento	Collegamenti ipertestuali aggiornati al gov.uk.
Pagina 2.	Loghi aggiunti aggiornati.
Introduzione	<p>Aggiornamento della tassonomia di <i>Campylobacter species</i> .</p> <p>Ulteriori informazioni aggiunte alla sezione Caratteristiche. Menzionate le specie clinicamente rilevanti di <i>Campylobacter</i>.</p> <p>Aggiornata la Sezione relativa ai Principi d'Identificazione per includere il MALDI-TOF-MS.</p>
Informazione Tecnica/limitazioni	Aggiunte informazioni riguardanti sierologia , test dell'ossidasi, colorazione Gram, terreni agar, temperatura d'incubazione, controllo qualità, sistemi d'identificazione commerciale e MALDI-TOF-MS
Considerazioni sulla sicurezza	Aggiornata la sezione sulle modalità di manipolazione delle specie <i>Campylobacter</i> così come le infezioni acquisite in laboratorio.
Microrganismi Bersaglio	La sezione sui microrganismi bersaglio è stata aggiornata e presentata in modo più chiaro.
Identificazione.	<p>Aggiornamenti eseguiti in 3.2, 3.3 e 3.4 in relazione agli standard di procedura.</p> <p>Sezione 3.4 aggiornata per includere i Sistemi Commerciali d'Identificazione, MALDI -TOF MS e NAAT con bibliografia.</p> <p>Sottosezione 3.5 aggiornata per includere i Metodi Molecolari Rapidi.</p>
Diagramma di flusso per identificazione	Modifica del diagramma di flusso per identificazione delle specie di <i>Campylobacter</i> per facilitarne

	l'utilizzo.
Refertazione .	Sottosezione 5.3 aggiornata in conformità alle informazioni richieste nella procedura di refertazione.
Invio.	Aggiornati gli indirizzi dei laboratori di riferimento.
Bibliografia	Bibliografia in parte aggiornata.

Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito[#]: 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 tests appropriati.
- Le SMI 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 ed è una condizione essenziale per interventi nel campo della sanità pubblica, della sorveglianza, e per le attività di ricerca e di sviluppo.

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 <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>.

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.

Le SMI sono sviluppate, revisionate ed aggiornate con un ampio processo di consultazione

[#] 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.

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 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 addizionali 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 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 estione 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 assoggetto agli obiettivi PHE di Uguaglianza <https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/equality-and-diversity>. 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 suggerita per questo documento

Public Health England. (2015). Identification of *Campylobacter* species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 23 Emissione 3. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Scopo del Documento

Questa SMI descrive l'identificazione di *Campylobacter* a livello di specie.

Questa SMI deve essere usata con le altre SMI.

Introduzione

Tassonomia

La famiglia delle Campylobacteraceae (proposta nel 1991) comprende quattro generi strettamente correlati; *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Dehalospirillum* e *Sulfurospirillum*. Al genere *Campylobacter* appartengono attualmente 26 specie delle quali 19 sono state isolate da esseri umani. Sono note anche 10 sottospecie, nove delle quali isolate dall'uomo¹.

Sebbene *C. jejuni* e *C. coli* continuino ad essere in tutto il mondo la principale causa di gastroenterite batterica negli esseri umani, i progressi della biologia molecolare e lo sviluppo di metodologie di cultura innovative hanno portato alla rilevazione e all'isolamento di una vasta gamma di specie non note e nutrizionalmente esigenti di *Campylobacter*, comprendenti *C. concisus*, *C. upsaliensis* e *C. ureolyticus*. Queste specie *Campylobacter* emergenti sono state associate a una serie di malattie gastrointestinali, in particolare gastroenterite, sindrome dell'intestino irritabile e periodontite. In alcuni casi, l'infezione del tratto gastrointestinale da questi batteri può progredire fino a patologie extra gastrointestinali pericolose per la vita².

Caratteristiche

Le specie *Campylobacter* sono costituite da bastoncini Gram negativi, larghezza 0.2 - 0.5µm, lunghezza 0.5 - 8µm con curvatura caratteristica, a spirale, o cellule a forma di S; forme coccoidi possono essere osservate in condizioni sub-ottimali. Generalmente hanno un solo flagello polare privo di guaina a una o entrambe le estremità. La motilità dei batteri è caratteristicamente rapida e guizzante a cavatappi, caratteristica per cui la loro presenza tra altri batteri può essere rilevata con il microscopio a contrasto di fase^{3,4}.

Sono nutrizionalmente esigenti e crescono in condizioni di stretta anaerobiosi o microaerofilia (atmosfera contenente circa il 5-10% di O₂ e 5-10% di CO₂ per la crescita), ma un certo numero di specie *Campylobacter* - tra cui *C. concisus*, *C. curvus*, *C. gracilis*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae* e alcuni ceppi di *C. hyointestinalis* richiedono atmosfera arricchita di idrogeno (è richiesto H₂ al 3-7%) per la crescita, condizione non utilizzata di routine nei laboratori diagnostici². La loro temperatura ottimale di crescita è 37-42 ° C. Su agar selettivo, Carbone cefoperazione desossicolato, le colonie sono di colore grigio/bianco o grigio paglierino e umide. Possono assumere l'aspetto di uno strato di crescita sulla superficie dell'agar. Le colonie non sono di solito pigmentate.

Su agar sangue si sviluppano colonie traslucide. Appaiono inoltre lievemente rosate, rotonde, convesse con bordo regolare. L'erosione dell'agar dipende dal terreno utilizzato, ma la maggior parte dei ceppi presenta questa caratteristica dopo un paio di giorni di crescita anaerobica su agar sangue³.

Hanno un metabolismo respiratorio strettamente obbligato. Le specie *Campylobacter* non fermentano e non ossidano i carboidrati. Tutte le specie sono ossidasi positive e negative per produzione di indolo e test di Voges-Proskauer. La maggior parte delle specie riduce i nitrati e non idrolizza l'ippurato⁵.

Un problema ben noto associato all'identificazione delle specie *Campylobacter* è la mancanza di efficaci test di differenziazione.

Le specie più frequentemente associate a diarrea nell'uomo sono termofile, cioè crescono a 42-43°C e a 37°C, ma non a 25°C.

Campylobacter è stato isolato dal sangue, feci, liquido cefalorachidiano, tratto intestinale, cistifellea, ascesso cerebrale, urina, ferite, cavità orale, ecc².

La specie tipo è *Campylobacter fetus*.

Specie clinicamente importanti di *Campylobacter* comunemente isolate nelle infezioni umane;

Campylobacter coli

Le cellule sono costituite da bastoncini spiraliformi mobili con spessore di 0.2-0.9µm e lunghezza di 0.5-5µm, mobili con movimento simile a cavatappi. Non formano spore e crescono in condizioni microaerofile. *C. coli* crescono lentamente in coltura e hanno una temperatura ottimale di 42°C. Non crescono a 25°C. Le cellule delle colture vecchie o esposte all'aria per lunghi periodi tendono ad assumere forma sferica o coccoide⁶.

Sono ossidasi e catalasi positivi, ma negativi per la riduzione dei nitrati e l'idrolisi dell'ippurato.

Campylobacter jejuni

Sono note 2 sottospecie di *C. jejuni* - *C. jejuni* sottospecie *doylei* e *C. jejuni* sottospecie *jejuni*¹.

Le cellule sono a forma di bastoncino Gram negativo, con presenza di bastoncini a forma a S e di spirale, occasionalmente dritti. E' frequente il pleomorfismo che spesso aumenta con l'invecchiamento delle colture. Possono crescere a 37°C e a 42°C, ma non a 25°C. Su agar sangue, le colonie non sono emolitiche, grigie, lisce, scintillanti, e convesse con bordi continui. Su agar umido le colonie si fondono e non mostrano crescita sciamante.

Entrambe sono catalasi e ossidasi positive. Sono anche capaci d'idrolizzare l'ippurato.

Le sottospecie *C. jejuni doylei* si differenziano facilmente da *C. jejuni* sottospecie *jejuni* per la loro incapacità di ridurre i nitrati.

Queste sono state isolate da campioni di feci, sangue e campioni animali⁶.

Principi di identificazione

Nei terreni di coltura primari l'identificazione preliminare delle specie *Campylobacter* è ottenuta con l'aspetto della coltura, colorazione Gram, sviluppo in presenza di ossigeno e prova dell'ossidasi. La non disponibilità di prove discriminanti rende difficile la differenziazione in specie nella maggior parte dei laboratori di microbiologia di routine.

Informazione Tecnica/Limitazioni

MALDI-TOF MS

Questa tecnica ha dimostrato che i batteri cresciuti su agar modificato carbone-cefoperazione-desossicolato generano un risultato spettrale ridotto, e che, poiché questo agar è solitamente usato per l'identificazione delle specie *Campylobacter*, può essere necessaria una coltura aggiuntiva su agar supplementare prima dell'identificazione definitiva con MALDI-TOF⁷.

Colorazione di Gram

Specie *Campylobacter* non sono facilmente visualizzate con il contrasto di safranina normalmente utilizzato nella procedura di colorazione Gram; pertanto, possono essere utilizzati come coloranti di contrasto carbol fucsina o 0,1% di fucsina base acquosa, oppure aumentando il tempo di colorazione della safranina fino a 10 minuti si può migliorare l'intensità della colorazione⁶.

Terreni contenuti agar

I metodi di coltura sono indirizzati verso il rilievo di *C. jejuni* e *C. coli*. Un certo numero di agenti antimicrobici incorporati nel terreno selettivo comunemente utilizzato (ad esempio Preston agar, Skirrow agar, etc.) possono inibire la crescita di alcune specie di *Campylobacter*. Cefalotina, colistina, e polimixina B possono inibire alcuni ceppi di *C. jejuni* e *C. coli* e anche molte delle altre specie *Campylobacter* meno comunemente riscontrate, quali *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, e *C. fetus*⁸. Pertanto, i campioni diversi dalle feci coltivati su terreni selettivi dovrebbero pure essere seminati su terreni non selettivi per ottenere informazioni aggiuntive e per contribuire a garantire il riscontro dei potenziali patogeni.

Test ossidasi

Possono verificarsi alcune deboli reazioni dell'ossidasi se la prova è eseguita su colonie che crescono su un terreno contenente destrosio o glucosio. Pertanto, la prova deve essere eseguita su una crescita proveniente da terreni privi di destrosio/glucosio, quale ad esempio l'agar sangue⁹.

Se si utilizza un confezione di ossidasi disponibile in commercio, seguire le istruzioni del produttore.

Temperatura di incubazione

La temperatura di incubazione di 42°C usata abitualmente è inibitoria per le specie *Campylobacter* non termofile che possono anche essere associate a gastroenterite⁸. Un certo numero di specie di *Campylobacter*, quali ad esempio *C. concisus*, *C. rectus*, *C. curvus*, *C. gracile*, e *C. showae* richiedono incubazione microaerofila in atmosfera arricchita di idrogeno per la crescita^{2,10}.

Controllo qualità

Ogni nuovo lotto o spedizione di antisieri/sistemi di identificazione commerciale deve essere saggiato e validato per la reattività positiva e negativa utilizzando ceppi di controllo noti assicurando che è adatto allo scopo. Quando si utilizzano questi prodotti i laboratori devono seguire le istruzioni del produttore.

Sistemi commerciali di identificazione

I sistemi commerciali per l'identificazione delle specie *Campylobacter* non sono stati riscontrati più precisi di test convenzionali¹¹. Inoltre, non tutte le specie clinicamente rilevanti di *Campylobacter* (quali ad esempio, la maggior parte delle specie identificate recentemente) sono incluse in queste confezioni commerciali, limitando in tal modo il loro utilizzo.

Test sierologici

Sono state segnalate reazioni sierologiche crociate tra *L. pneumophila* e *Campylobacter*. I pazienti con infezione da *Campylobacter* possono fornire risultati anticorpali falsi positivi per *Legionella*^{6,12}.

1 Considerazioni sulla Sicurezza¹³⁻²⁹

Le specie *Campylobacter* appartengono al Gruppo di microrganismi di Rischio 2 e la loro dose infettante per ingestione è di 500 microrganismi⁴.

Sono note alcune segnalazioni di casi di infezione acquisita in laboratorio³⁰.

Fare riferimento alle linee guida sulla Sicurezza nella manipolazione di tutti i microrganismi presentati in questa SMI.

Devono essere indossati e rispettati in ogni momento appropriati dispositivi di protezione individuale (DPI) e tecniche finalizzate a ridurre al minimo l'esposizione dei dipendenti del laboratorio.

Il metodo più efficace per la prevenzione delle infezioni acquisite in laboratorio è quello dell'adozione di pratiche di lavoro sicuro.

Le procedure di laboratorio che possono generare aerosol infettivi devono essere condotte in cabina di sicurezza microbiologica.

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

E' essenziale il rispetto delle regolamentazioni di spedizione postale e di trasporto.

2 Microrganismi Bersaglio^{2,6,11,31-36}

Specie *Campylobacter* segnalate come causa di infezione gastrointestinale nell'uomo

C. jejuni[#], *C. coli*[#], *C. lari*, *C. helveticus*, *C. upsaliensis*, *C. hominis*, *C. gracilis*, *C. lanienae*, *C. peloridis*, *C. concisus*^{*}, *C. mucosalis*, *C. fetus*[#], *C. hyointestinalis*[#], *C. sputorum*[#], *C. insulaenigrae*

Specie *Campylobacter* segnalate come causa di infezione dentale

C. concisus^{*}, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. urealyticus*

* Rilevato anche in campioni di feci di pazienti sani e sintomatici.

Queste specie sono segnalate per aver causato infezione extra-intestinale umana.

3 Identificazione

3.1 Aspetto microscopico

Colorazione Gram ([TP 39 –Staining Procedures](#))

Le specie *Campylobacter* sono gram-negative, tipicamente ricurve a forma di "S" ("ali di gabbiano"), sebbene il loro aspetto possa variare.

Nota: utilizzare il 10% carbol fucsina come contro colorante.

3.2 Terreno di primo isolamento

Carbone cefoperazione desossicolato agar (CCDA) o qualsiasi altro terreno validato incubato in microaerofilia a 42°C per 40-48 ore.

Le culture possono essere incubate per altre 24 ore, se necessario.

Agar sangue (AS) o agar per anaerobi esigenti (AAE) incubati in microaerofilia o in anaerobiosi a 42°C per 40-48 ore.

Le emocolture possono essere incubate a 37°C in quanto è improbabile la presenza di flora concorrente in questi campioni..

Nota: Alcune specie *Campylobacter* possono essere inibite dagli antibiotici presenti nel terreno.

3.3 Aspetto delle colonie

Su agar CCDA le colonie di *Campylobacter* appaiono di colore grigio/bianco o grigio crema e di aspetto umido. Possono presentarsi con aspetto di crescita a strato sulla superficie dell'agar.

Su agar sangue (AS) e agar per anaerobi esigenti (AAE) le colonie di *Campylobacter* appaiono traslucide ed umide.

3.4 Procedure di prova

Ossidasi (TP 26 - Oxidase Test)

Le specie *Campylobacter* sono ossidasi positive. Se una colonia presenta aspetto fenotipico somigliante alla specie *Campylobacter* ed è ossidasi negativa, eseguire la sottocultura in agar sangue e ripetere la prova dopo 24 ore di incubazione.

Prove biochimiche e/o sierologiche aggiuntive

Per una completa identificazione i test biochimici e/o sierologici devono essere eseguiti su colonie cresciute in coltura pura.

I test sierologici sono molto utili per le indagini epidemiologiche e non sono raccomandati per le diagnosi di routine³⁷.

Sistemi di identificazione commerciali

I laboratori devono seguire le istruzioni del produttore e i test rapidi e le confezioni devono essere validati ed aver dimostrato di essere idonei allo scopo prima dell'uso.

Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry

Il Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), che può essere utilizzato per analizzare la composizione proteica di una cellula batterica, è emerso come nuova tecnologia per l'identificazione di specie. Questo strumento ha dimostrato di essere potente e rapido per la sua riproducibilità, velocità e sensibilità analitica. Il vantaggio di MALDI-TOF rispetto ad altri metodi d'identificazione è la capacità di fornire risultati entro poche ore anziché diversi giorni. La velocità, la semplicità di preparazione del campione e l'acquisizione del risultato associato a costi minimi di consumo rendono questo metodo adatto per l'uso in routine e in centri ad alta produttività³⁸

Questo metodo è stato in grado di fornire livelli d'identificazione di specie rapidi e precisi - per i componenti del genere, *Campylobacter* - *C. jejuni* e *C. coli*; così come per le specie emergenti di *Campylobacter* - *C. lari*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. upsaliensis*, *C. sputorum*, ecc. Il vantaggio aggiuntivo di questa tecnica è che possono essere più facilmente identificate diverse specie di *Campylobacter* nelle culture miste con MS che con i metodi convenzionali^{39,40}.

Usando questo metodo, si è riscontrato che la corretta identificazione potrebbe essere ottenuta anche se i *Campylobacter* sono stati conservati a temperatura ambiente a 4°C fino a nove giorni prima del saggio. Inoltre, la scelta del terreno utilizzato per la coltura di *Campylobacter* è fondamentale in quanto è stato dimostrato il condizionamento dell'integrità spettrale MS. Questa tecnica ha dimostrato che i batteri cresciuti su agar modificato charcoal-cefoperazione-deoxycholate generano un'immagine spettrale scarsa e, poiché tale agar è solitamente usato di routine per l'identificazione delle specie *Campylobacter*, può essere necessaria una coltura aggiuntiva su agar supplementare prima dell'identificazione definitiva con MALDI-TOF⁷.

Test di amplificazione dell'acido nucleico (NAAT)

La PCR è generalmente considerata un buon metodo di rilevazione batterica in quanto semplice, rapida, sensibile e specifica. La base per le applicazioni diagnostiche della PCR in microbiologia è la rivelazione di agenti infettivi e la differenziazione dei ceppi non patogeni da quelli patogeni in virtù di geni specifici. Tuttavia ha dei limiti. Sebbene il gene 16S rRNA sia generalmente usato per la progettazione di primer PCR specie-specifici per l'identificazione, la progettazione dei primer è difficile quando le sequenze dei geni omologhi hanno elevata affinità.

Questo metodo rapido è stato utilizzato per differenziare le specie di ceppi di *Campylobacter* - *C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus* utilizzando il gene della cytolethal distending toxin (*cdt*)⁴¹

3.5 Identificazione successiva

Metodi molecolari rapidi

L'identificazione fenotipica può essere difficile per via di esigenze di crescita, natura asaccarolitica e scarso numero di caratteristiche biochimiche differenti nell'ambito delle specie *Campylobacter*⁸. La maggior parte dei laboratori clinici non va oltre l'identificazione presunta.

Comunque, i metodi molecolari hanno avuto un impatto enorme sulla tassonomia dei *Campylobacter*. Le analisi delle sequenze geniche hanno comportato una maggiore comprensione delle relazioni filogenetiche dei *Campylobacter* e dei microrganismi affini e hanno conseguito la rilevazione di numerose nuove specie. Le tecniche molecolari hanno reso più rapida e precisa l'identificazione di molte specie di quanto sia stato possibile con le tecniche fenotipiche.

Sono stati sviluppati numerosi metodi di tipizzazione rapida per isolati da campioni clinici; questi includono tecniche molecolari, quali Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multilocus Sequence Typing (MLST), Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MVA), SNP assays and Whole Genome Sequencing (WGS). Tutti questi approcci permettono il riconoscimento dei sottotipi di ceppi non correlati, ma lo fanno con diversa accuratezza, potere discriminante, e riproducibilità.

Tuttavia, alcuni di questi metodi rimangono accessibili solo ai laboratori di riferimento e sono difficili da implementare per identificazione batterica di routine in un laboratorio clinico.

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

La PFGE rileva variazione genetica tra i ceppi con enzimi di restrizione con rari-tagli, seguita dalla separazione dei conseguenti grandi frammenti genomici su un gel di agarosio. La PFGE è nota per essere altamente discriminante ed è una tecnica frequentemente utilizzata per indagini sui focolai

e ha guadagnato una diffusa applicazione nella caratterizzazione degli isolati epidemiologicamente correlati. Tuttavia, la stabilità della PFGE può essere insufficiente per un'applicazione affidabile in studi epidemiologici a lungo termine. Inoltre, a causa della sua natura, richiede tempo (30 ore o più per l'esecuzione) e la richiesta di attrezzature speciali, la PFGE non è utilizzata ampiamente se non nei laboratori di riferimento^{42,43}.

E' stata utilizzata con successo per l'identificazione e sottotipizzazione delle specie *Campylobacter* - *C. jejuni*⁴⁴.

Multilocus sequence typing (MLST)

La MLST misura direttamente le variazioni di sequenza del DNA in un set di geni strutturali e caratterizza i ceppi per i loro profili allelici unici. Il principio di MLST è semplice: la tecnica richiede la PCR seguita dal sequenziamento del DNA. Le differenze nucleotidiche tra ceppi possono essere controllate in un numero variabile di geni in funzione del grado di differenziazione desiderato. La tecnica è altamente discriminata, in quanto rileva tutti i polimorfismi all'interno di un gene anziché solo le modifiche non sinonimo che alterano la mobilità elettroforetica del prodotto proteico. Uno dei vantaggi di MLST rispetto ad altri metodi di tipizzazione molecolare è che i dati di sequenza sono trasferibili fra laboratori e hanno portato alla creazione di banche dati globali che consentono lo scambio dei risultati di tipizzazione molecolare tramite Internet⁴⁵.

Gli svantaggi della MLST sono il costo e il notevole impegno di laboratorio richiesto per amplificare, determinare, e rileggere la sequenza nucleotidica dei frammenti di DNA bersaglio, rendendo il metodo poco adatto per i test di routine di laboratorio.

Questo metodo è stato utilizzato con successo per differenziare i ceppi ed identificare linee clonali di specie *Campylobacter* (ad esempio *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, e *C. fetus*). Tuttavia, usando questo metodo sono state pure identificate numerose altre specie di *Campylobacter* emergenti (come *C. hyointestinalis*, *C. lanienae*, *C. sputorum*, *C. concisus* e *C. curvus*)^{46,47}.

Whole genome sequencing

Noto anche come "sequenziamento completo del genoma, completo sequenziamento del genoma, o l'intero sequenziamento del genoma". Si tratta di un procedura di laboratorio che determina in una sola volta la sequenza del DNA del genoma di un microrganismo. Sono note diverse tecniche disponibili ad elevata produttività utilizzate per sequenziare un intero genoma, quali pyrosequencing, tecnologia nanopore, sequenziamento Illumina, sequenziamento Ion Torrent, ecc. Questo metodo di sequenziamento rappresenta una grande promessa per una rapida, precisa e completa identificazione della trasmissione batterica in ambito ospedaliero e nella comunità, con riduzioni concomitante di infezioni, morbilità e costi.

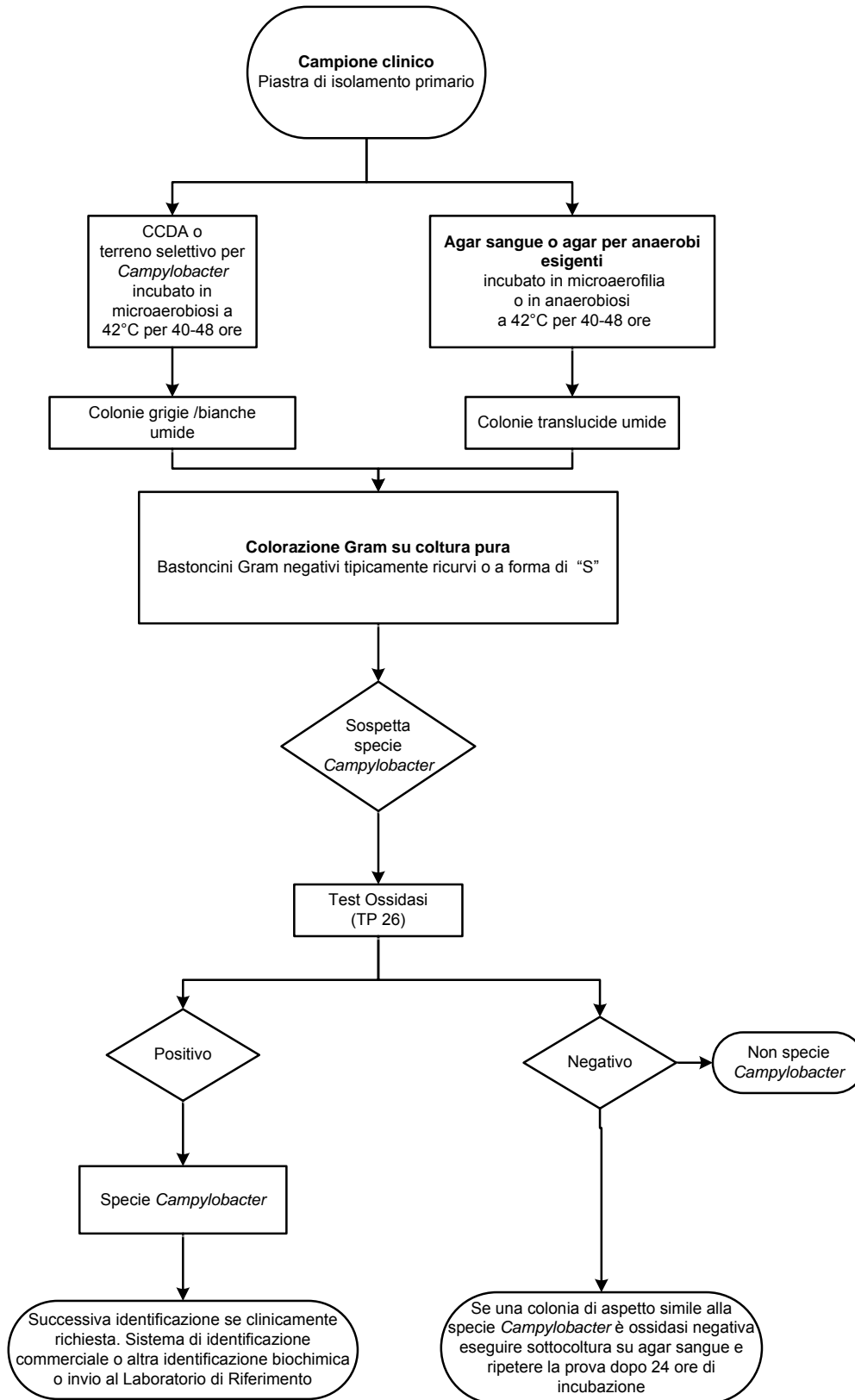
E' stato utilizzato con successo per esplorare il genoma di *Campylobacter jejuni* che è stato concluso nel 2000 dal Centro di Sanger. I risultati hanno determinato che il genoma di *C. jejuni* possiede 1.641.481 paia di basi, e contiene 1.654 geni codificanti proteine. Questa tecnica ha anche rivelato che questo microrganismo ha sequenze ipervariabili, che possono essere importanti per la sua strategia di sopravvivenza⁴⁸.

3.6 Conservazione e invio

Se richiesto, salvare un consistente inoculo dell'isolato puro su un tampone di trasporto con carbone per l'invio al Laboratorio di Riferimento.

Nota: Per conservare le colture pure a breve termine, seminare abbondantemente un tampone di trasporto con carbone posto poi a 4°C. Per la conservazione a lungo termine a -70°C (o a temperatura inferiore), si raccomanda l'uso di palline in brodo glicerolo (sono disponibili confezioni commerciali).

4 Identificazione di specie *Campylobacter*:



Il Diagramma di Flusso è solo indicativo

5 Refertazione

5.1 Identificazione presunta

Se riscontrate appropriate caratteristiche di crescita, aspetto delle colonie e prova dell'ossidasi.

5.2 Conferma dell'identificazione

Successive prove biochimiche e/o molecolari e/o referto del laboratorio di riferimento.

5.3 Medico microbiologo

Informare il medico microbiologo delle specie di *Campylobacter* confermate se il modulo di richiesta contiene importanti informazioni quali:

- grave infiammazione con diarrea ematica
- setticemia
- storia di alcolismo, immunodeficienza o altre gravi patologie concomitanti, quali tumori, o pazienti in terapia antitumorale, con possibile comparsa di neutropenia e/o mucosite
- ricerca in corso di epidemia

Seguire i protocolli locali per la refertazione al clinico.

5.4 CCDC

Fare riferimento al Memorandum di Informazione.

5.5 Public Health England⁴⁹

Fare riferimento alle linee guida attuali del CDSC alle indicazioni del COSURV.

5.6 Gruppo controllo prevenzione infezione

Informare il gruppo di controllo delle infezioni dell'identificazione di specie *Campylobacter* se l'isolato proviene da un paziente

6 Invii

6.1 Laboratorio di riferimento

Contattare l'appropriato laboratorio nazionale di riferimento dedicato per informazioni su accertamenti disponibili, tempi di risposta, procedure di trasporto ed altre informazioni riguardanti l'invio del campione:

Gastrointestinal Bacteria Reference Unit
Bacteriology Reference Department
Public Health England
61 Colindale Avenue
London
NW9 5EQ
Tel.020 8327 6173

<https://www.gov.uk/qbru-reference-and-diagnostic-services>

Contattare il centralino della PHE: Tel. +44 (0) 20 8200 4400

Inghilterra e Galles

<https://www.gov.uk/qbru-reference-and-diagnostic-services>

Scozia

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

Irlanda del Nord

<http://www.belfasttrust.hscni.net/Laboratory-MortuaryServices.htm>

7 Notifica al PHE^{49,50} o Equivalente⁵¹⁻⁵⁴

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'.

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

Esistono accordi diversi in [Scotland](#)^{51,52}, [Wales](#)⁵³ and [Northern Ireland](#)⁵⁴.

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

Collaboratori: Roberto Rossetti, già Primario del Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Civile di Pistoia ASL 3

Monica Raggi, Dirigente di primo livello del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori di 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. Euzéby, JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature Genus *Campylobacter*. 2013.
2. Man SM. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:669-85.
3. Vandamme P, Debruyne L, De BE, Falsen E. Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;60:2016-22.
4. Snelling WJ, Matsuda M, Moore JE, Dooley JS. *Campylobacter jejuni*. *Lett Appl Microbiol* 2005;41:297-302.
5. Vandamme P, De Ley J. Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:455.
6. Fitzgerald C, Nachamkin I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 10 ed. Vol 1. 2011. p. 885-99.
7. Alispahic M, Hummel K, Jandreski-Cvetkovic D, Nobauer K, Razzazi-Fazeli E, Hess M, et al. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis. *J Med Microbiol* 2010;59:295-301.
8. Maher M, Finnegan C, Collins E, Ward B, Carroll C, Cormican M. Evaluation of culture methods and a DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces. *J Clin Microbiol* 2003;41:2980-6.
9. MacFaddin J. Oxidase Test. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Wilkins and Williams; 2000. p. 368-78.
10. Lastovica AJ, le RE. Efficient isolation of *Campylobacter upsaliensis* from stools. *J Clin Microbiol* 2001;39:4222-3.
11. On SL. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:405-22.
12. Boswell TC, Kudesia G. Serological cross-reaction between *Legionella pneumophila* and *campylobacter* in the indirect fluorescent antibody test. *Epidemiol Infect* 1992;109:291-5.
13. 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".
14. 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.
15. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
16. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.

17. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
18. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
19. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
20. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
21. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
26. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
27. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
28. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
29. 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
30. Collins CH, Kennedy.D.A. Laboratory acquired infections. In: Woburn MA, editor. Laboratory acquired infection: History, incidence, causes and prevention. 4 ed. 1999. p. 1-37.
31. On SL, Atabay HI, Corry JE, Harrington CS, Vandamme P. Emended description of *Campylobacter sputorum* and revision of its infrasubspecific (biovar) divisions, including *C. sputorum* biovar *paraureolyticus*, a urease-producing variant from cattle and humans. Int J Syst Bacteriol 1998;48 Pt 1:195-206.
32. On SL, Bloch B, Holmes B, Hoste B, Vandamme P. *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., isolated from the porcine stomach, and an emended description of *Campylobacter hyointestinalis*. Int J Syst Bacteriol 1995;45:767-74.
33. Vandamme P, Daneshvar MI, Dewhirst FE, Paster BJ, Kersters K, Goossens H, et al. Chemotaxonomic analyses of *Bacteroides gracilis* and *Bacteroides ureolyticus* and reclassification of *B. gracilis* as *Campylobacter gracilis* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1995;45:145-52.
34. Debruyne L, On SL, De BE, Vandamme P. Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus*

- subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:1126-32.
35. Figura N, Guglielmetti P, Zanchi A, Partini N, Armellini D, Bayeli PF, et al. Two cases of *Campylobacter mucosalis* enteritis in children. *J Clin Microbiol* 1993;31:727-8.
 36. Newell DG. *Campylobacter concisus*: an emerging pathogen? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:1013-4.
 37. Taylor BV, Williamson J, Luck J, Coleman D, Jones D, McGregor A. Sensitivity and specificity of serology in determining recent acute *Campylobacter* infection. *Intern Med J* 2004;34:250-8.
 38. 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.
 39. Mandrell RE, Harden LA, Bates A, Miller WG, Haddon WF, Fagerquist CK. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:6292-307.
 40. 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.
 41. Kabir SM, Kikuchi K, Asakura M, Shiramaru S, Tsuruoka N, Goto A, et al. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan. *Jpn J Infect Dis* 2011;64:19-27.
 42. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* 2006;55:645-59.
 43. Brosch R, Brett M, Catimel B, Luchansky JB, Ojeniyi B, Rocourt J. Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Int J Food Microbiol* 1996;32:343-55.
 44. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 2001;39:1889-94.
 45. Feil EJ, Spratt BG. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:561-90.
 46. Dingle KE, Colles FM, Falush D, Maiden MC. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 2005;43:340-7.
 47. Miller WG, Chapman MH, Yee E, On SL, McNulty DK, Lastovica AJ, et al. Multilocus sequence typing methods for the emerging *Campylobacter* species *C. hyointestinalis*, *C. lanienae*, *C. sputorum*, *C. concisus*, and *C. curvus*. *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:45.
 48. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 2000;403:665-8.
 49. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.
 50. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
 51. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).

52. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
53. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
54. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).