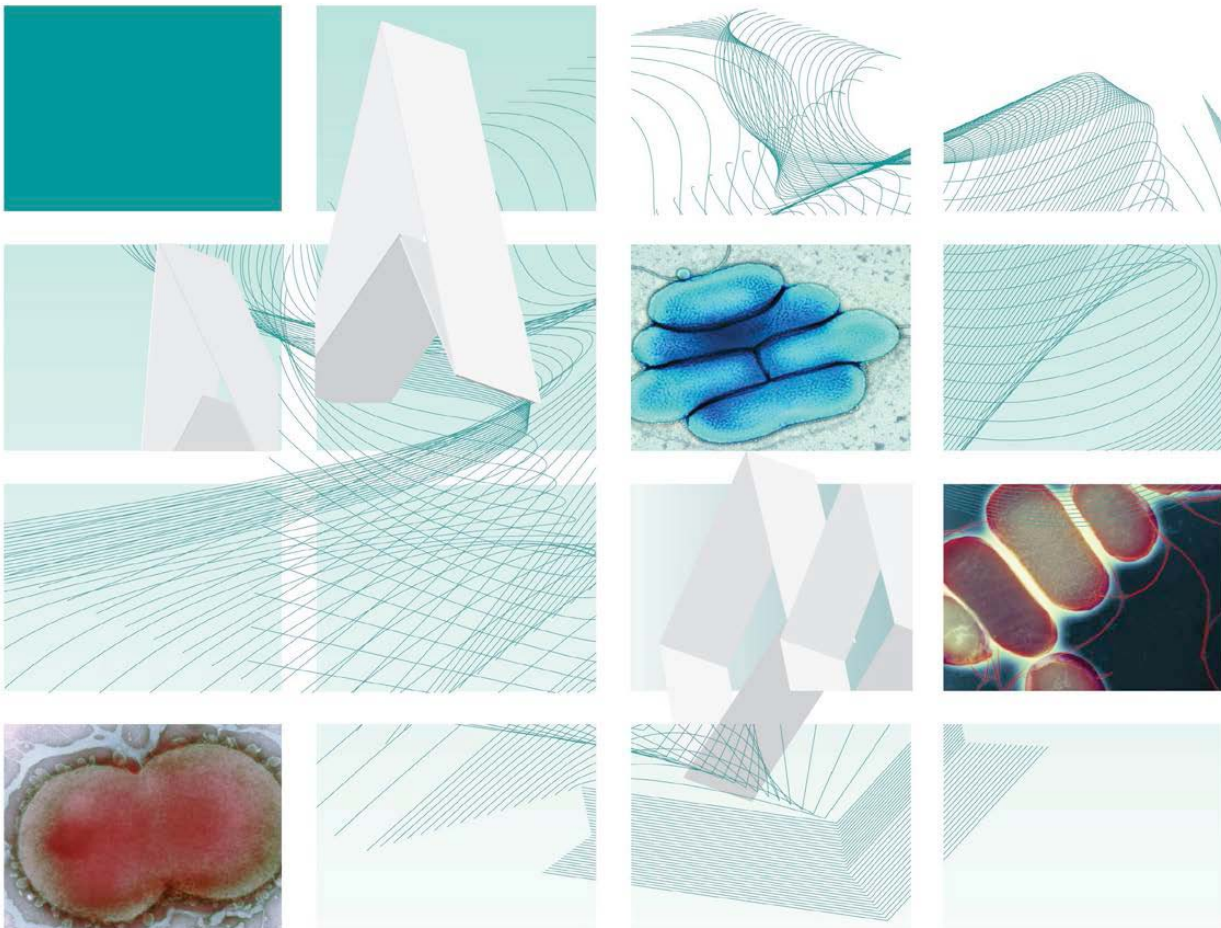




Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito

Identificazione di specie *Clostridium*

IN REVISIONE



Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Public Health England (PHE) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <http://www.hpa.org.uk/SMI/WorkingGroups>).

Si ringraziano per contributi forniti i numerosi operatori dei laboratori clinici, gli specialisti e i laboratori di riferimento che hanno fornito informazioni e commenti durante lo sviluppo di questo documento. Si ringraziano i Revisori Medici per le modifiche apportate ai contenuti clinici.

Per ulteriori informazioni contattare:

Standards Unit
Microbiology Services
Public Health England

61 Colindale Avenue

London NW9 5EQ

E-mail: standards@phe.gov.uk

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

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



Contenuti

RINGRAZIAMENTI.....	2
TABELLA MODIFICHE	4
RICERCHE MICROBIOLOGICHE STANDARD DEL REGNO UNITO: SCOPO E OBIETTIVO.....	5
SCOPO DEL DOCUMENTO	8
INTRODUZIONE.....	8
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI.....	9
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA	10
2 MICROORGANISMO BERSAGLIO	10
3 IDENTIFICAZIONE	11
4 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE <i>CLOSTRIDIUM</i>	13
5 REFERTAZIONE	14
6 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE	15
APPENDICE	15
BIBLIOGRAFIA.....	17



NICE ha accreditato la procedura usata dalla Public Health England per elaborare gli Standards for Microbiology Investigations. L'accreditamento è valido per 5 anni dal Luglio 2011. Informazioni più dettagliate sull'accreditamento possono essere consultate: www.nice.org.uk/accreditation.

Per ulteriori informazioni sul nostro accreditamento consultare: : www.nice.org.uk/accreditation

Tabella delle Modifiche

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso la E-mail: standards@phe.gov.uk

I documenti nuovi o revisionati devono essere controllati in ciascun laboratorio in accordo con il sistema locale di gestione della qualità.

Modifica No/Data.	5/10.03.14
Emissione eliminata. no	3.1
Emissione inserita no.	3.2
Sezione(i) interessate/Pagina no.	Modifica.
Documento intero .	<p>Il documento è stato inserito in un nuovo formato che evidenzia il passaggio della Health Protection Agency alla Public Health England.</p> <p>Prima pagina ridisegnata.</p> <p>Rinominata la pagina di “Stato come Scopo” e Obiettivo ed aggiornata in modo appropriato.</p> <p>I loghi delle organizzazioni professionali sono stati revisionati ed aggiornati.</p> <p>La bibliografia degli standard di sicurezza è stata revisionata ed aggiornata.</p> <p>Il contenuto scientifico rimane invariato.</p>

Modifica No/Data.	4/21.10.11
Emissione eliminata. no	3
Emissione inserita no.	3.1
Sezione(i) interessate.	Modifica.
Intero documento	Documento presentato in nuovo formato.
Bibliografia	Bibliografia In parte aggiornata.

Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito[#]: Scopo e Obiettivo

Utilizzatori delle SMI

Sono stati identificati tre gruppi di utenti per i quali le SMI sono particolarmente utili:

- 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 da parte dei reparti ospedalieri.
- 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 garanzia della qualità, la definizione dell'incertezza della determinazione.

La Standardizzazione del processo diagnostico conseguente all'adozione delle SMI consente di garantire in tutto il Regno Unito strategie d'indagine equivalenti nei diversi laboratori ed è una condizione essenziale per interventi nel campo della sanità pubblica, della sorveglianza, e per le attività di ricerca e di sviluppo. Nel Regno Unito le SMI rappresentano strategie omogenee per le prove diagnostiche e la programmazione degli interventi di sanità pubblica

Collaborazione Paritaria

La preparazione e stesura delle SMI è effettuata mediante collaborazione paritaria fra PHE, NHS, Royal College of Pathologists e le organizzazioni professionali.

L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito

<http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships> 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. Queste stesse devono essere utilizzate in associazioni con altre SMI.

Le prestazioni della SMI dipendono dal personale ben addestrato e dalla qualità dei reagenti e delle attrezzature utilizzate. I laboratori dovrebbero assicurare che tutti i reagenti di tipo commerciale e quelli messi a punto in laboratorio siano stati validati e risultati idonei allo scopo. I laboratori devono partecipare a programmi di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

Coinvolgimento del Paziente e della Comunità

Nello sviluppo delle SMI i rispettivi Gruppi di Lavoro sono impegnati per favorire il coinvolgimento dei pazienti e dell'opinione pubblica. Grazie al coinvolgimento pubblico, di operatori sanitari, ricercatori e organizzazioni di volontariato la SMI risultante sarà strutturalmente valida e atta a soddisfare le esigenze dell'utente. L'opportunità di partecipazione per contribuire alla consultazione è estesa al pubblico con l'accesso libero al nostro sito web

Informazione della Gestione e dei Dati Sensibili

La PHE è un'organizzazione che condivide le direttive Caldicott. Ciò significa prendere ogni possibile precauzione per prevenire la diffusione non autorizzata di informazioni sui pazienti e di garantire che le informazioni relative agli stessi siano mantenute in condizioni di sicurezza.

Lo sviluppo di metodi SMI è assoggetto agli obiettivi PHE di Uguaglianza http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317133470313. I Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità di consultazione efficace con gli appartenenti al pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialistici coinvolti.

Dichiarazione Legale

Mentre ogni cura è stata intrapresa per la preparazione delle SMI, PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, deve, per quanto possibile in base a qualunque legge vigente, escludere la responsabilità per tutte le perdite, costi, reclami, danni o spese derivanti da o connessi all'uso di una SMI o con qualsiasi informazione ivi contenuta. Se si apportano modifiche a una SMI, si deve porre in evidenza dove e da chi sono state effettuate tali modifiche.

Le conoscenze di base e la tassonomia microbica per la SMI sono le più complete possibili, al momento della pubblicazione. Eventuali omissioni e nuove informazioni saranno considerate nel corso della prossima revisione. Queste procedure standard (SMI) possono essere sostituite solo da revisioni dello standard, azione legislativa, o in seguito ad indicazioni da parte dell'ente accreditato NICE.

I diritti d'autore delle SMI sono della "Crown" e questi dovrebbero essere riconosciuti quando appropriato.

Citazione Suggesta per questo Documento

Public Health England. (2014). Identification of *Clostridium* species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 8 Emissione 3.2. <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>.

IN REVISIONE

Scopo del Documento

Questa SMI descrive l'identificazione delle specie *Clostridium*.

Sono note numerose specie di clostridi, riscontrate nelle feci animali e nell'ambiente. In questa SMI saranno discusse solo quelle associate all'uomo.

Questa SMI deve essere usata congiuntamente alle altre SMI.

Introduzione

Tassonomia

Il genere *Clostridium* attualmente comprende circa 100 specie. Nel 1994 l'eterogeneità di questa specie è stata confermata con il sequenziamento del gene 16S rRNA. Come risultato sono stati proposti cinque nuovi generi ed undici nuove specie¹, nessuna delle quali appare significativa nelle infezioni dell'uomo^{1,2}.

Caratteristiche dellr specie *Clostridium*

Le specie *Clostridium* sono costituite da bastoncini Gram-positivi, (alcune a Gram-variabile), spesso accoppiati o in corte catenelle, con estremità arrotondate o talvolta affusolate o tozze, spesso pleiomorfi. Le specie *Clostridium* sono molto variabili per la loro tolleranza verso l'ossigeno. Alcune, come il *Clostridium novyi* tipo A e *Clostridium haemolyticum*, appartengono alle specie anaerobie obbligate assolute e possono richiedere incubazione prolungata su piastre preridotte o di recente preparazione e la completa manipolazione in cabina anaerobica. Al contrario, *Clostridium tertium*, *Clostridium histolyticum* e *Clostridium carnis* sono aerotolleranti e sviluppano colonie su agar sangue incubato in aria addizionata di CO₂ al 5-10%².

In teoria tutti i componenti del genere, tranne *Clostridium perfringens*, sono mobili con flagelli peritrichi e formano endospore ovali o sferiche che possono rigonfiare la cellula. Possono essere saccarolitici o proteolitici e di solito sono catalasi-negativi. Molte specie producono potenti esotossine³.

Tossine delle specie *Clostridium*

Le specie *Clostridium* di importanza clinica producono un'ampia varietà di tossine. La loro produzione provoca diverse manifestazioni cliniche, quali tenano o botulismo, conseguenti alla produzione di neurotossine che sono fra le più potenti sostanze letali note all'uomo⁴. Le tossine dei clostridi sono proteine biologicamente attive con le caratteristiche degli antigeniche e pertanto possono essere neutralizzate da antisieri specifici. Il riscontro di una particolare tossina in un campione del paziente può essere diagnostico e rendere pertanto superfluo l'isolamento del microrganismo (ad esempio del *Clostridium difficile*).

Il *Clostridium perfringens* è la specie di più frequente isolamento. Dalle combinazioni delle principali tossine letali prodotte si possono differenziare cinque tipi (A-E)².

Principi di Identificazione

Le caratteristiche utili per identificare alcune specie patogene si ottengono dall'osservazione di alcune caratteristiche, quali: aspetto delle colonie, colorazione Gram e presenza od assenza di β -emolisi. Per ottenere una presunta identificazione si possono utilizzare altre prove fenotipiche,

associate alla disponibilità di un manuale di laboratorio di qualità, quale il Wadsworth-KTL Anaerobe Laboratory Manual⁵. E' importante ottenere una coltura pura, perché una sottile diffusione della crescita di alcune specie *Clostridium* può mascherare microrganismi contaminanti. Se è richiesta la conferma dell'identificazione, inviare i ceppi isolati all'Anaerobe Reference Laboratory, Cardiff.

Se si sospetta il *Clostridium botulinum*, Inviare direttamente campioni di siero del paziente, feci e alimenti implicati al Food Safety Microbiology Laboratory, Colindale.

Informazione Tecnica/Limitazioni

N/D

IN REVISIONE

1 Considerazioni sulla Sicurezza⁶⁻²²

Microrganismi del Gruppo di Rischio 2

Fare riferimento alle linee guida sulla sicurezza nella manipolazione dei microrganismi documentati in questa SMI.

Eseguire le procedure di laboratorio che generano aerosol infettivi 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

Specie *Clostridium* Segnalate come Causadi Malattia nell'Uomo³

Specie *Clostridium* che causano malattia nell'uomo³

Comunemente isolate

- C. perfringens*
- C. septicum*
- C. tertium*
- C. difficile*

Raramente isolate

- C. novyii* tipo A
- C. sordellii*

Isolate molto raramente

- C. tetani*
- C. histolyticum*
- C. botulinum*

Clostridi "non patogeni" di Comune Isolamento

- C. sporogenes*
- C. ramosum*
- C. innocuum*
- C. paraputrificum*
- C. cadaveris*
- C. bifermentans*
- C. fallax*
- C. clostridioforme*

3 Identificazione

3.1 Aspetto Microscopico

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

Bastoncini Gram-positivi, possono contenere una sola endospora. Alcune specie possono essere Gram variabili.

Colorazione delle spore

Utilizzata per definire l'aspetto e la posizione delle spore (opzione alternativa: contrasto di fase).

<i>C. perfringens</i>	Non sporula sui comuni terreni
<i>C. botulinum</i>	Ovale, subterminale
<i>C. difficile</i>	Ovale, subterminale
<i>C. novyi</i>	Ovale, subterminale
<i>C. sordellii</i>	Ovale, subterminale
<i>C. septicum</i>	Ovale, subterminale
<i>C. tetani</i>	Rotonda, terminale

3.2 Terreno di Primo Isolamento

Agar contenente sangue incubato a 35°C - 37°C per 40-48 ore

3.3 Aspetto delle Colonie

L'aspetto delle colonie varia con le specie e di seguito è riportata una succinta descrizione di quelle più importanti

Microrganismo	Caratteristiche di crescita su agar contenete sangue dopo incubazione anaerobica a 35°C – 37°C for 40–48 ore
<i>C.Botulinum/ perfringens</i>	Colonie larghe (3 mm), irregolarmente circolari, lisce, grigiastre, traslucide con margine irregolare che può diffondere. La maggior parte dei ceppi sono β -emolitici; producono lecitinasi.
<i>C. difficile</i>	Colonie lucenti, grigie, rotonde, con margine rugoso; fluorescenza verde-gialla alla luce UV. Di solito non sono emolitiche, sviluppano caratteristico odore fetido.
<i>C. novyi</i>	Colonie rilevate, circolari, che divengono piatte ed irregolari con l'invecchiamento della coltura. Le colonie tendono a fondersi formando una crescita diffusa con una doppia zona di β -emolisi. Il tipo A produce lecitinasi e lipasi.
<i>C. perfringens</i>	Colonie grandi, lisce, regolarmente convesse, ma possono essere piatte con margine irregolare. Di solito presentano una doppia area di β -emolisi, produce lecitinasi.
<i>C. septicum</i>	Di solito produce una crescita diffusa con una area ridotta di β -emolisi
<i>C.sordelli/b fermentans</i>	Colonie bianche, convesse, rotonde, con margine frastagliato, che può diffondere. Possono essere β -emolitiche, producono lecitinasi, indolo positive
<i>C. tetani</i>	Sottile crescita diffusa che può apparire β -emolitica (può essere di difficile osservazione)

Altre specie <i>Clostridium</i>	L'aspetto della colonia è vario, ma può produrre una crescita diffusa che può essere o non β -emolitica
---------------------------------	---

3.4 Procedure di Prova

Nagler ([TP 22 - Nagler test](#)) con antitossina di *C. perfringens*

C. perfringens è inibito dalla antitossina come quella prodotta da *C. bifermentans* and *C. sordellii*.

Specie diverse da *C. perfringens* possono produrre lecitinasi.

Controllare anche la produzione di lipasi (substrato perlaceo) su agar tuorlo d'uovo.

Reverse CAMP test

Il Reverse Camp test può essere utilizzato per differenziare *C. perfringens* da altre specie *Clostridium*²³.

Confezioni commerciali per l'identificazione

I risultati devono essere interpretati con cautela associandoli a quelli delle altre prove.

Se clinicamente indicato inviare all'Anaerobe Reference Laboratory per ulteriore identificazione

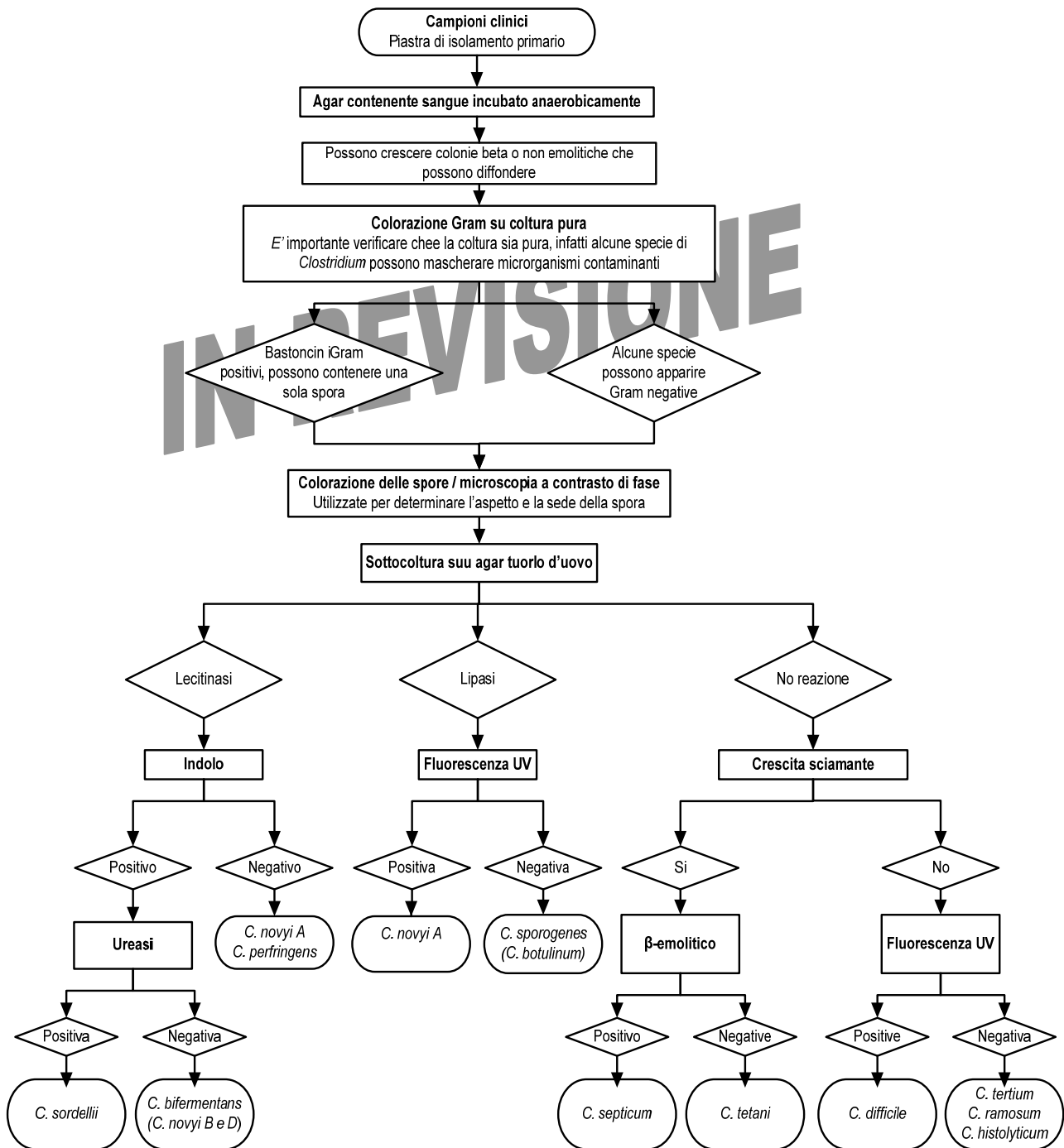
3.5 Identificazione Successiva

N/A

3.6 Conservazione e Invio

Se richiesto, conservare l'isolato in stato di purezza in brodo per anaerobi esigenti o in Robinson's cooked meat broth per l'invio al Laboratorio di Riferimento.

4 Identificazione di specie *Clostridium*



Il Diagramma di Flusso rappresenta solo un'indicazione

5 Refertazione

5.1 Identificazione Presuntiva

Se rilevate appropriate caratteristiche di crescita, aspetto delle colonie, colorazione Gram della coltura e gli isolati sono metronidazolo sensibili.

5.2 Conferma dell'Identificazione

Dopo piastra di Nagler, Reverse CAMP test per *C. perfringens*, identificazione con confezione commerciale e/o referto del Laboratorio di Riferimento.
ai risultati di conferma della coagulasi.

5.3 Medico Microbiologo

Informare il medico microbiologo di tutte le colture positive da sedi normalmente sterili.

In accordo con i protocolli locali il medico microbiologo deve essere informato anche della specie presunta o confermata di *Clostridium*, e quando il modulo di richiesta contiene informazioni importanti quali

- Casi di trauma, ferite penetranti, fratture esposte o ritenzione di corpo estraneo, o inoculazione nota per abuso di droghe (specialmente eroina)
- Aborto settico
- Sospetta mionecrosi da clostridi, miofascite (necrotizzante), infezione di ferita chirurgica (in modo particolare nei casi di malattia occlusiva dei vasi periferici e/o diabete mellito)
- Altre condizioni cliniche gravi quali l'alcolismo o abusi di sostanze, immunodeficienza, tumori, oppure persone in trattamento per neoplasie (incluso neutropenia e/o mucosite)
- Intossicazione alimentare (specialmente se si manifesta paralisi discendente con interessamento dei nervi cranici) e/o consumo inusuale di alimenti importati (sospetto di botulismo)
- Ricerca in corso di epidemie
- Colite pseudomembranosa o diarrea in corso di terapia antibiotica
- Sospetto tetano

Seguire i protocolli locali per la refertazione al clinico

5.4 CCDC

Fare riferimento alle Memorandum locale di Informazione

5.5 Public Health England²⁴

Fare riferimento alle linee guida del CDSC e ai documenti del COSUVUR. Informare il gruppo di controllo delle infezioni degli isolati presunti o confermati di *C. botulinum* e *C. difficile*

5.6 Gruppo controllo Infezione

Informare il gruppo di controllo delle infezioni degli isolati presunti o confermati di *C. botulinum* e *C. difficile*

6 Invio

Per informazioni sugli accertamenti disponibili, i tempi di risposta, le procedure di trasporto ed altre informazioni riguardanti il laboratorio di riferimento rivolgersi a: <http://www.hpa.org.uk/cfi/rsil>

Inviare a:

<http://www.hpa.org.uk/ProductsServices/MicrobiologyPathology/LaboratoriesAndReferenceFacilities/>

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

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

Inghilterra e Galles

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

Scozia

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

Irlanda del Nord

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

7 Notifica al PHE^{24,25} o Equivalente²⁶⁻²⁹

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'.

Esistono accordi diversi in Scozia^{26,27}, Galles²⁸ e Irlanda del Nord²⁹.

IN REVISIONE

Bibliografia

1. Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, et al. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:812-26.
2. Koneman EW, Allen S D, Janda W M, Schreckenberger P C, Winn W J, editors. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1997. p. 709-84
3. Holt JG, Krieg N R, Sneath P H A, Staley J T, Williams S T, editors. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994. p. 560
4. Hatheway CL. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:66-98.
5. Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron D et al. *Anaerobic Bacteriology Manual*. In: Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron D et al, editors. Sixth ed. Star Publishing Company; 2002. p. 54.
6. 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".
7. 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.
8. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
9. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
10. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
11. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
12. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
13. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
14. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
15. 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.
16. 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.
17. 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.

IN REVISIONE

18. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
19. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
20. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
21. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
22. 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
23. Buchanan AG. Clinical laboratory evaluation of a reverse CAMP test for presumptive identification of *Clostridium perfringens*. J Clin Microbiol 1982;16:761-2.
24. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.
25. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
26. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
27. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
28. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
29. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).

IN REVISIONE