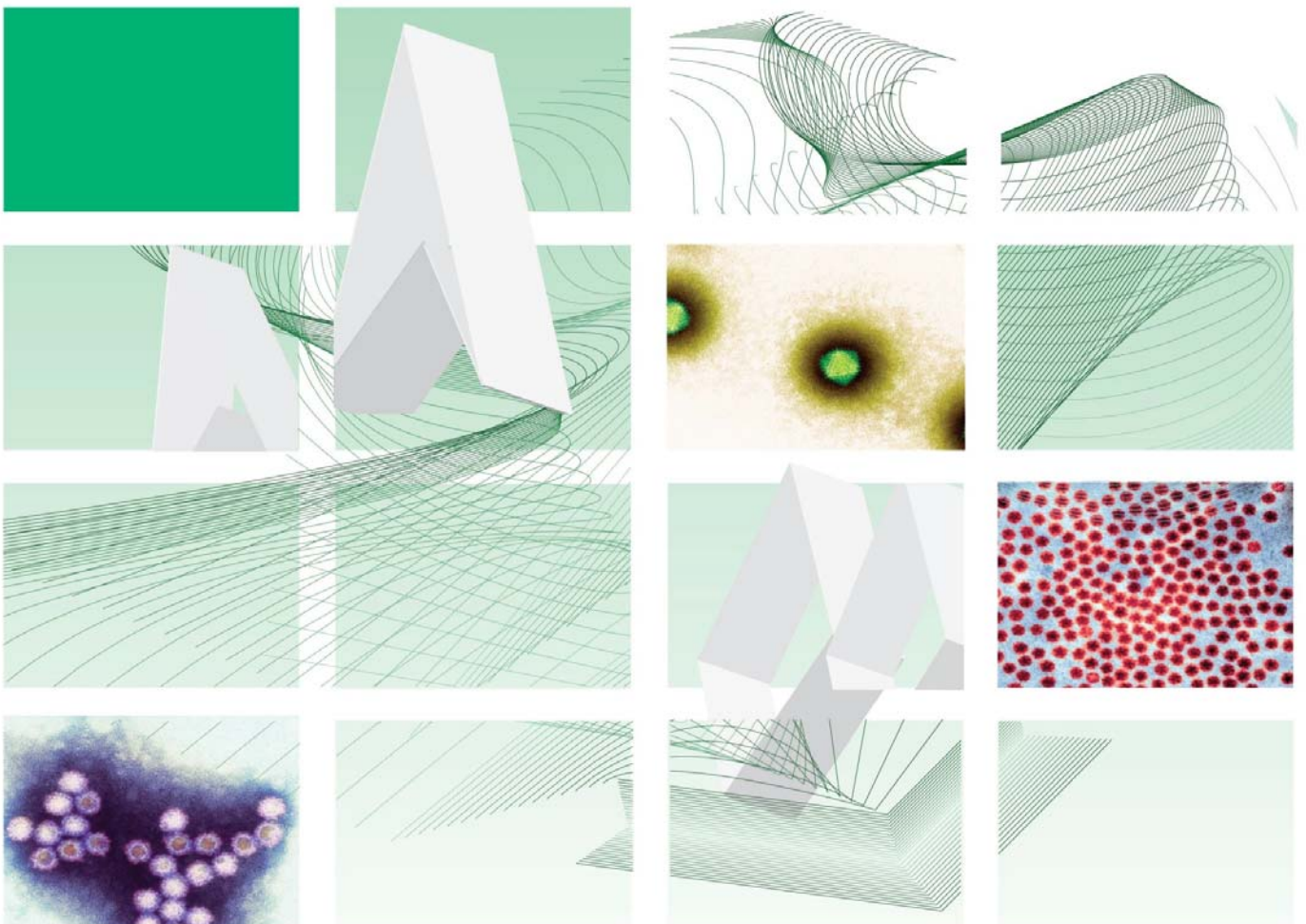




Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Immunofluorescenza ed Isolamento di Virus da Campioni delle Vie Respiratorie



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 Division
Health Protection Agency
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	11
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA.....	12
2 PRELIEVO DEL CAMPIONE	12
3 TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE	12
4 STRUMENTAZIONE E REAGENTI	13
5 PROCESSO/PROCEDURA SUL CAMPIONE	13
6 ASSICURAZIONE DELLA QUALITA'	15
7 LIMITAZIONI	15
8 PROCEDURA DI REFERTAZIONE	15
9 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE	16
APPENDICE	17
BIBLIOGRAFIA	18



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 documento controllato 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.	3/10.10.13
Emissione eliminata. no	1.2
Emissione inserita no.	1.3
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.	2/20.04.12
Emissione eliminata. no	1.1
Emissione inserita no.	1.2
Sezione(i) interessate/Pagina no.	Modifica.
Documento intero .	Documento presentato in nuovo formato.

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 test 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 di sorveglianza della salute pubblica, 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 <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnershipshttp>. 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. 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 di elevata qualità che possono essere verificate. Le SMI forniscono inoltre un punto di riferimento per lo sviluppo del metodo.

Le prestazioni delle 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. Opportunità di partecipazione per contribuire alla consultazione è estesa al pubblico con l'accesso libero al nostro sito web.

Informazione della Gestione e dei Dati Sensibili

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

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

Dichiarazione Legale

Mentre ogni cura è stata intrapresa per la preparazione delle SMI, PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, deve, per quanto possibile in base a qualunque legge vigente, escludere la responsabilità per tutte le perdite, costi, reclami, danni o spese derivanti da o connesso 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. (2013). Immunofluorescence and Isolation of Viruses from Respiratory Samples. UK Standards for Microbiology Investigations. V 22 Issue 1.3.

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

Scopo del Documento

Questo MNS descrive la ricerca e l'isolamento di virus da campioni delle vie respiratorie. Le colture virali utilizzate sono considerate un "standard di riferimento" per la diagnosi di laboratorio delle infezioni delle vie respiratorie, ma sono state progressivamente sostituite dai metodi molecolari. Su sito informatico <http://www.hpa.org.uk/SMI> sono disponibili informazioni sulla preparazione e mantenimento delle colture cellulari e dei metodi molecolari e sierologici. Nonostante il progressivo ricorrere all'utilizzo della PCR per la diagnosi, i metodi di isolamento dei virus respiratori in coltura cellulare continuano ad essere necessari per verificare le variazioni genomiche ed eseguire prove antivirali di sensibilità fenotipica.

Questa SMI deve essere usata congiuntamente ad alte SMI.

Introduzione

Generalità

Famiglia delle Orthomyxoviridae

Generi *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*

L'Influenza è una malattia di importanza globale¹. Tutti gli anni in ogni parte del mondo circa il 20% dei bambini ed il 5% degli adulti sviluppa sintomi d'influenza A o B. E' nota anche la possibilità di pandemia dovuta alla capacità del virus influenzale A di ricombinarsi geneticamente. Questi virus sono in grado di sviluppare numerose malattie, dall'infezione asintomatica a sindromi respiratorie di varia tipologia con coinvolgimento polmonare, cardiaco, cerebrale, epatico, renale e muscolare, a polmonite primaria fulminante virale o secondaria di tipo batterico². La progressione della malattia è condizionata dall'età del paziente, grado di efficienza dell'immunità pre-esistente, caratteristiche del virus, condizione di fumatore, co-morbilità, immunosoppressione e gravidanza. Il virus è diffuso con colpi di tosse e starnuti e conseguente dispersione di piccole goccioline cariche di virus. L'infezione può essere diffusa anche col vomito. Gli aspirati nasofaringei sono considerati il materiale più idoneo per la ricerca di virus influenzali³.

I virus dell'influenza A, B, e C sono meglio isolati in colture di cellule PLC e cellule canine di rene di Madin Darby (MDCK - Madin Darby dog kidney cells) poste in agitazione su rulli. Le MDCK ed altre cellule richiedono terreno addizionato di tripsina per ottimizzarne la loro sensibilità. La tripsina è aggiunta per consentire la separazione del virus HA in HA1 e HA2, necessaria alla replicazione. La replicazione del virus è rilevata con emoadsorbimento (EA), emoagglutinazione o immunofluorescenza.

Famiglia Paramyxoviridae⁴

Sottofamiglia *Paramyxovirinae*

Genere *Respirovirus*

Specie *Human parainfluenza virus tipo 1*, *Human parainfluenzavirus tipo 3*

Genere *Rubulavirus*

Specie *Human parainfluenzavirus tipo 2*, *Human parainfluenzavirus tipo 4*, *Human parainfluenzavirus tipo 4a*, *Mumps virus*

I virus parainfluenzali e della parotite si replicano in colture cellulari NCI-H292 poste in agitazione su rulli in terreno addizionato di tripsina per ottimizzare la sensibilità, e in PLC prive di tripsina.

Immunofluorescenza ed Isolamento di Virus da Campioni delle Vie Respiratorie

L'effetto citopatico (ECP) indotto da questi virus può manifestarsi dopo 4 - 7 giorni, ma le colture possono non evidenziare positività e richiedere un'altra settimana d'incubazione perché si manifesti la crescita. Raramente le cellule si separano, e l'ECP può non essere distintamente visibile. E' pertanto importante sottoporre queste linee cellulari a verifica con emoadsorbimento durante il periodo di incubazione e prima di scartarle per accertare che il virus non sia erroneamente sfuggito all'osservazione. Informazioni per l'emoadsorbimento sono descritte nella [V45 – Emoadsorbimento dei virus](#).

Genere *Morbillivirus*

Specie *Measles virus*

E' insolito che un laboratorio clinico ponga la diagnosi avvalendosi solo della manifestazione clinica e dall'accertamento sierologico. Raramente i campioni respiratori sono inviati al laboratorio per l'esame colturale del virus, ma in alcuni casi, lo sono per la ricerca con immunofluorescenza diretta. In questi materiali la ricerca del virus del morbillo è eseguita con la PCR. Questo virus diffonde solo nella fase iniziale dell'infezione e pertanto il periodo d'isolamento è molto ridotto. L'isolamento colturale richiede tempo e di solito lo si esegue solo quando necessitano prove di sensibilità o dati epidemiologici. Non è stato fino ad ora sviluppato alcun sistema colturale di riferimento; comunque il WHO raccomanda l'utilizzo delle cellule Vero/SLAM⁶. Per maggiori informazioni sul morbillo consultare [G 7 – Investigation of Red Rash](#)..

Sottofamiglia *Pneumovirinae*

Genere *Pneumovirus*

Specie *Human Respiratory Syncytial Virus (RSV)*

Tipo *Human respiratory syncytial virus type A; Human respiratory syncytial virus type B*

Il RSV causa infezioni respiratorie ricorrenti dall'infanzia all'età adulta. Le epidemie sono frequenti e possono essere di tipo nosocomiale. L'infezione diffonde per mezzo di aerosol, con goccioline di grandi e non di piccole dimensioni, e con vomito. Il RSV può manifestarsi con tosse abbaiante, bronchite, bronchiolite o polmonite interstiziale. E' la più frequente causa di affezione polmonare nei bambini ospedalizzati d'età inferiore ad un anno.

L'esame colturale rappresenta il modo più sicuro per identificare questo microrganismo, ma l'isolamento è difficile da ottenere per la rapida perdita di vitalità del virus. I campioni devono essere conservati a 4°C in terreno di trasporto e seminati non oltre quattro ore dopo il prelievo. E' noto che le colture di cellule Hep-2 poste in agitazione su rulli sono sensibili all'RSV⁶. L'Immunofluorescenza è utilizzata nei casi in cui si richiede una diagnosi rapida.

Genere *Metapneumovirus*

Specie *Human metapneumovirus*

L'infezione da Metapneumovirus è frequente in bambini d'età inferiore a 5 anni. Causa malattia ad ampio spettro, simile a quella da RSV; si manifesta con febbre, tosse e raffreddore. Il virus si sviluppa lentamente in LLCMK2, Hep 2 e MDCK ed è più frequentemente diagnosticato con la PCR.

Famiglia Picornaviridae

Genere *Enterovirus*

Specie *Human enterovirus A-D*

Tipi *Coxsackievirus A (A21) e B (B4 B5), Echovirus, Enterovirus 68-71*

Immunofluorescenza ed Isolamento di Virus da Campioni delle Vie Respiratorie

Gli Enterovirus sono diffusi con goccioline di aerosol, vomito e per via oro-fecale. Producono ECP in NCI-H292, RMK, RD, MA-104 trattate con tripsina e fibroblasti diploidi umani, preferibilmente in colture poste in agitazione su rulli⁷.

Genere *Parechovirus*

Specie *Human parechovirus*

Tipo *Human parechovirus tipi 1-3*

Tutti i tre tipi di HPeV sono stati isolati da soggetti con sintomatologia respiratoria. L'HPeV-1 è segnalato come causa di malattia respiratoria in bambini d'età inferiore ai 2 anni. Si sviluppa in cellule BGM. L'HPeV-3 è stato associato a malattia respiratoria, gastroenterite ed esantema, e può svilupparsi nelle cellule Vero.

Genere *Rhinoviruses*

Specie *Human rhinovirus A, Human rhinovirus B*

Tipo Rhinovirus (tipi classificati 1-100)

I Rhinovirus sono associati ad infezioni del tratto respiratorio superiore o a comuni raffreddori che si possono complicare in otite media nei bambini e sinusiti negli adulti⁸. I Rhinovirus sono anche in grado di causare infezioni del tratto respiratorio inferiore, come polmonite, dispnea nei bambini, e negli adulti aggravare condizioni patologiche quali asma e malattie polmonari ostruttive croniche. Human Rhinovirus ha una temperatura di crescita ottimale a 33°C, relativamente bassa, ritenuta un adattamento evolutivo all'ambiente nasofaringeo⁸.

I Rhinovirus diffondono con aerosol e vomito. Questi virus producono ECP nelle cellule NCI-H292, RMK, RD, MA-104 trattate con tripsina e nei fibroblasti diploidi umani, preferibilmente in colture poste in agitazione su rulli a +33°C - 34°C.

Famiglia Adenoviridae

Genere *Mastadenovirus*

Tipo Adenovirus

Gli Adenovirus sono associati a diverse sindromi cliniche. Diffondono per mezzo di goccioline, vomito e per via oro-fecale. L'Adenovirus è noto come causa di malattia respiratoria nei bambini e può determinare infezione respiratoria del tratto superiore od inferiore, incluse bronchioliti e polmoniti⁹. Il virus è anche responsabile di febbre faringocongiuntivale e di congiuntivite epidemica. Nei pazienti immunodepressi questi virus possono diffondere in modo sistemico, determinando elevata mortalità.

La maggior parte dei sierotipi, diversi dal 40 e 41, si replicano rapidamente in tutte le linee cellulari umane HEK, HEp2, HeLa, A549, HEL, e NC1-H292 con o senza agitazione su rulli⁷. Gli adenovirus sono fra i più facili da identificare perché determinano uno specifico ECP e sono gli unici a produrre grandi quantità di antigeni solubili di tipo diverso, con proprietà gruppo specifiche che facilitano la diagnosi durante la loro crescita nella coltura cellulare.

Famiglia Coronaviridae

Genere *Coronavirus*

Specie *Human coronavirus 229E, human coronavirus OC-43, severe acute respiratory syndrome coronavirus*

I Coronavirus sono comuni cause di raffreddore. Il Coronavirus 229-E cresce in cellule HEL. Di solito è difficile ottenerne l'isolamento e come il coronavirus OC-43 può richiedere la coltura in cellule d'organo. Per questo motivo nel laboratorio clinico di routine di solito non si esegue l'esame colturale⁷. Nel 2002-2003, in Estremo Oriente ed in Canada, il coronavirus della SARS ha causato una grave malattia del tratto respiratorio inferiore, con indice complessivo di mortalità superiore al 7% e fino al 50% nei pazienti con più di 65 anni. Di solito nei casi sospetti di SARS non si eseguono semine in colture cellulari; per la diagnosi di laboratorio si usano la PCR ed accertamenti sierologici.

Informazione Tecnica /Limitazioni

N/D

1 Considerazioni sulla Sicurezza¹⁰⁻²⁶

1.1 Prelievo del Campione^{10,11}

Contrassegnare in modo appropriato il rischio secondo le procedure locali.

1.2 Trasporto e Conservazione del Campione¹⁰⁻¹⁵

E' essenziale il rispetto delle regolamentazioni postali e del trasporto.

Può essere utilizzato un appropriato sistema di trasporto del virus ed il campione deve essere posto in un sacchetto di plastica chiuso, separato dal modulo di richiesta.

1.3 Procedura sul Campione¹⁰⁻²⁶

N/D

2 Prelievo del Campione

2.1 Tipo di Campioni

Aspirati naso faringei, tamponi nasali, lavaggio bronco alveolare, tampone faringeo/associato a tampone nasale e tampone faringeo, espettorato

2.2 Tempo Ottimale per Prelievo del Campione

I campioni respiratori devono essere prelevati nei primi tre giorni di malattia e non oltre il quinto giorno. Tutti i campioni devono essere prelevati prima dell'inizio della chemioterapia.

2.3 Tipo di Campione Idoneo e Metodo di Prelievo

Possono essere richiesti campioni duplicati per escludere altri microrganismi patogeni.

2.4 Quantità Adeguata e Numero Appropriato di Campioni

N/D

3 Trasporto e Conservazione del Campione^{10,11}

3.1 Tempo fra Prelievo del Campione e Procedura

I campioni devono essere prelevati entro tre giorni dall'insorgenza della malattia e non oltre il quinto giorno. Tutti i campioni devono essere prelevati prima dell'inizio della somministrazione di

3.2 Considerazioni Particolari per Ridurre il Deterioramento

In caso di ritardo dell'inizio della procedura i campioni devono essere refrigerati a 4°C. Se il ritardo supera le 24 ore, conservare a -70°C e scongelare prima dell'inizio della procedura. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

4 Strumentazione e Reagenti

4.1 Strumentazione

N/D

4.2 Reagenti

N/D

5 Processo/Procedura sul Campione^{10,11}

5.1 Selezione della Prova

Nei casi che richiedono un esame urgente si possono utilizzare: microscopia elettronica (ME), immunofluorescenza (IF) o ricerca dell'antigene con confezione commerciale; questi metodi forniscono un risultato provvisorio, da confermare, ove possibile, con l'esame colturale. In alcuni casi può essere utilizzato un metodo PCR validato.

L'IF è un metodo diagnostico rapido raccomandato che consente di determinare anche la qualità del campione prelevato. Se sul vetrino sono assenti cellule epiteliali il riscontro di virus è alquanto improbabile. Si riducono pure le possibilità di isolamento colturale. In questo caso è opportuno richiedere ai medici curanti l'invio di un campione successivo.

5.2 Coltura e Ricerca

5.2.1 Procedura sul campione

Aspirato nasofaringeo

- Usare una pipetta di plastica a punta sottile per prelevare dal contenitore di plastica (estrattore monouso di muco) il materiale mucoso da trasferire in una provetta da centrifuga di plastica contenente 2 mL di PBS. Omogeneizzare il campione.
- Trasferire circa 500 µL della sospensione in terreno di trasporto per virus (TTV) per l'isolamento.
- Si raccomanda di trasferire altri 10 mL di PBS nella provetta di plastica da centrifuga e centrifugare poi a 380x g per 10 minuti.
- Rimuovere il sopranatante e sospendere di nuovo in 200 µL di PBS.
- Ripetere le fasi precedenti fino alla rimozione completa del muco. Ciò facilita la purificazione delle cellule

Tamponi

- I tamponi devono arrivare spezzati nel TTV. Non sono accettabili tamponi essiccati o inseriti in terreno di trasporto per batteriologia; richiedere di ripetere il prelievo dei campioni in modo adeguato
- Verificare la chiusura del contenitore. Trasferire il materiale dal tampone al terreno di trasporto con passaggio su Vortex per 15 secondi

Immunofluorescenza ed Isolamento di Virus da Campioni delle Vie Respiratorie

- Conservare il campione a -80°C

5.2.2 Tecnica Microscopica

I vetrini per la microscopia di IF devono essere preparati preferibilmente con materiale prelevato direttamente dall'aspirato. Se ciò non è possibile, allestire il preparato con il campione ricevuto in terreno di trasporto per virus (TTV). Se il campione è inadeguato richiedere la ripetizione del prelievo.

Contrassegnare un vetrino ed in funzione della densità aggiungere 10 – 25 µL di sospensione cellulare ad 8 aree circoscritte. Asciugare il vetrino su piastra termica. Ridurre il numero delle aree di semina in rapporto alla quantità di materiale disponibile.

Fissare il vetrino in acetone per 10 minuti a temperatura ambiente e lasciar asciugare all'aria.

Il vetrino è pronto per la colorazione con tecnica d'immunofluorescenza da eseguire secondo le indicazioni del produttore.

5.2.3 Isolamento⁷

Lo scopo dell'isolamento virale è di dimostrare la presenza e la vitalità dei virus nei campioni clinici.

Sono disponibili numerosi tipi di colture cellulari. Generalmente tutti i virus descritti in questa MSI crescono meglio in linee cellulari di tessuto umano, quali quelle di polmone embrionale (HEL, human embryonic lung). Alcuni laboratori includono le cellule di rene di cane (MDCK), in quanto i virus parainfluenzali ed influenzali non crescono nelle cellule HEL.

Il campione ottenuto dopo le fasi di preparazione, ben miscelato e purificato, è inoculato in colture cellulari monostrato(i) selezionate. Questa procedura deve essere eseguita in cabina di sicurezza di classe I. Le provette devono essere contrassegnate in modo che la parte contenente il monostrato possa essere riconosciuta facilmente e sia sempre mantenuta su questo lato. Il monostrato assorbe le semine a temperatura ambiente. Il tempo richiesto per l'adsorbimento dei microrganismi sullo strato cellulare condiziona in modo determinante la sensibilità. Se possibile, prolungare questa fase per una notte. Le colture sono poi arricchite con terreno di mantenimento ed incubate a 35°C - 36°C per sette quattordici giorni. Le linee cellulari HEL devono essere messe in rotazione su un dispositivo a rulli rotanti o agitate su piastra rotante. Le provette devono essere controllate al microscopio ottico ogni 24 o 48 ore per verificare la comparsa dell'effetto citopatico e la loro contaminazione.

Per la comparsa dell'ECP non sono richieste sottocolture delle cellule e queste sono necessarie solo se le colture cellulari si contaminano con batteri e funghi, o manifestano aspetti degenerativi dello strato cellulare.

5.3 Identificazione

In laboratorio

L'identificazione degli isolati può essere ottenuta in modo diverso:

- Effetto citopatico: consultare la tavola in allegato. L'interpretazione dell'ECP è molto soggettiva ed è particolarmente importante l'esperienza acquisita nella lettura delle colture. In caso di dubbio avvalersi di una valutazione aggiuntiva. Gli ECP devono essere confermati con immunofluorescenza, PCR, o dal laboratorio di riferimento. Sì

Immunofluorescenza ed Isolamento di Virus da Campioni delle Vie Respiratorie

può verificare un'errata identificazione e la contaminazione. Pertanto, ove possibile, ogni osservazione insolita deve far richiedere un secondo campione.

- Per confermare la comparsa dell'ECP di solito si esegue la ricerca dell'antigene con immunofluorescenza; questo metodo non è in grado di rilevare tutti i tipi di virus e pertanto non saranno diagnosticati i ceppi o tipi di nuovo isolamento. Seguire le istruzioni del produttore.
- .Emoadsorbimento: questo metodo è descritto nella [V 45 – Haemadsorption of Viruses](#)
- .E' stata dimostrata l'utilità della PCR singola o multipla. Le ricerche hanno dimostrato che il numero dei pazienti con manifestazioni cliniche è stato sottostimato quando la diagnosi si è avvalsa solo della coltura cellulare e dell'immunofluorescenza..

5.4 Invio ai Laboratori di Riferimento

- Gli isolati da saggiare con le prove di sensibilità devono essere inviati all'Antiviral Susceptibility Reference Laboratory, Public Health England.
- .Gli isolati di Influenza devono essere inviati per la tipizzazione al WHO National Influenza Laboratory, HPA, Colindale.

6 Assicurazione di Qualità

Deve essere predisposto un sistema per assicurare un'appropriata verifica della qualità interna ed esterna ed il mantenimento delle procedure del controllo di qualità.

E' essenziale che i laboratori dispongano di una adeguata validazione di metodi, strumentazione, procedure analitiche proprie o commerciali dimostrando che queste sono idonee agli scopi.

7 Limitazioni

L'isolamento dei microrganismi dipende dal corretto prelievo del campione, trasporto, conservazione, procedura analitica; qualità e numero di linee cellulari usate e disponibilità di condizioni di coltura idonee ed informazioni cliniche appropriate/disponibili.

Devono essere utilizzate solo linee cellulari note per la loro sensibilità ai virus respiratori e questa caratteristica deve essere verificata sulle forniture e ad intervalli regolari. Le cellule prelevate dopo conservazione in idrogeno liquido devono essere verificate per la sensibilità prima del loro utilizzo.

La procedura(e) di questi documenti aiutano a descrivere standard microbiologici di buona qualità per specifici tipi di campioni. Possono essere richieste altre procedure ed è essenziale l'interpretazione dei risultati da parte di personale qualificato. Prendere nota, per cortesia, che la conoscenza delle malattie infettive si aggiorna costantemente e sebbene questa SMI sia regolarmente riveduto, potrebbe non includere patogeni emergenti.

Le precedenti indicazioni devono essere supplementate con la valutazione locale del rischio.

8 Procedura di Refertazione

8.1 Referti

I campioni negativi devono essere refertati come "Virus non isolato". "IF negativo per ..."

I campioni positivi devono essere refertati come "Isolato Influenza". IF positivo per ..."

Se si procede ad altri accertamenti, deve essere emesso un referto che notifica l'attesa di altri risultati.

9 Segnalazioni alla PHE^{27,28} o Equivalenti²⁹⁻³²

Le Norme di Denuncia della Health Protection Agency del 2010 richiedono ai laboratori diagnostici di comunicare alla Public Health England (PHE) l'identificazione degli 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 possono essere notificati il più presto possibile oralmente, si raccomanda entro 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 Health Protection Team. 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 NHS segnala spontaneamente alla HPE gran parte delle diagnosi di laboratorio sostenute da agenti causali e molte sezioni della HPE 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 HIV & STIs, HCAIs e CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non nel 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories')

In Scozia^{29,30}, Galles³¹ e Irlanda del Nord³² sono vigenti altre disposizioni.

Virus Influenza A, B, e C: Segnalare tutti i casi, con informazioni cliniche e/o fattori di rischio specificati in modo opportuno.

Virus Parainfluenza tipo 1, 2, 3, 4A, 4B: Segnalare tutti i casi.

Virus della parotite: Segnalare tutti i casi, con informazioni su viaggi, e dati clinici e/o fattori di rischio specificati in modo opportuno.

Virus del morbillo: Segnalare tutti i casi, con informazioni su viaggi, e dati clinici e/o fattori di rischio specificati in modo opportuno.

Virus Respiratorio Sinciziale (RSV, Respiratory Syncizual Virus): Segnalare tutti i casi.

Rhinovirus: Segnalare tutti i casi.

Adenovirus: Segnalare tutti i casi.

Coronavirus: Segnalare tutti i casi con informazioni complete su viaggi.

Appendice: Aspetto ECP

Causa CPE	Crescita Usuale Tempo (giorni)	Aspetto su		
		HEL	PLC-PRF5	MDCK
Influenza	3 – 5	No crescita	Emoadsorbimento	Emoadsorbimento
Parainfluenza	3 - 5	No crescita	Emoadsorbimento	Emoadsorbimento
RSV	5 - 6		Piccoli sincizi rotondeggianti (le cellule tendono a raggrupparsi e fondersi),alcune aree sottili e chiare	
Rhinovirus	4 - 10		Cratteristico arrotondamento rifrangente CPE. Identico a quello prodotto da enteroviruses	
Adenovirus	2 - 10	'Mongolfiera' , arrotondamento allungato, lievemente granuloso, specialmente al bordo dello strato cellulare		
Enteroviruses		Le cellule assumono forma rotondeggianti,rifrangente ed infine si contraggono prima di staccarsi dalla superficie cellulare		

Fotografie dell'ECP sono riportate sul sito web CVN <http://www.clinicalvirology.org/>

Bibliografia

1. Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 2002;20:3068-87.
2. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet* 2003;362:1733-45.
3. Heikkinen T, Salmi AA, Ruuskanen O. Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for detection of influenza. *BMJ* 2001;322:138.
4. Mackie PL. The classification of viruses infecting the respiratory tract. *Paediatr Respir Rev* 2003;4:84-90.
5. Black FL. Measles. In: Evans AS, Kaslow RA, editors. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. 4th ed. New York: Plenum Medical Book Company; 1997. p. 507-10.
6. McIntosh K. Respiratory Syncytial Virus. In: Evans AS, Kaslow RA, editors. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. 4th ed. New York: Plenum Medical Book Company; 1997. p. 691-3.
7. Halonen P, Herholzer J, Ziegler T. Advances in the diagnosis of respiratory virus infections. *Clin Diagn Virol* 1996;5:91-100.
8. Savolainen C, Blomqvist S, Hovi T. Human rhinoviruses. *Paediatr Respir Rev* 2003;4:91-8.
9. Rocholl C, Gerber K, Daly J, Pavia AT, Byington CL. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. *Pediatrics* 2004;113:e51-e56.
10. 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".
11. 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.
12. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
13. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
14. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
15. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
16. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
17. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.

Immunofluorescenza ed Isolamento di Virus da Campioni delle Vie Respiratorie

18. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
23. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
24. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
25. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
26. 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
27. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37
28. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
29. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
30. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
31. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
32. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).