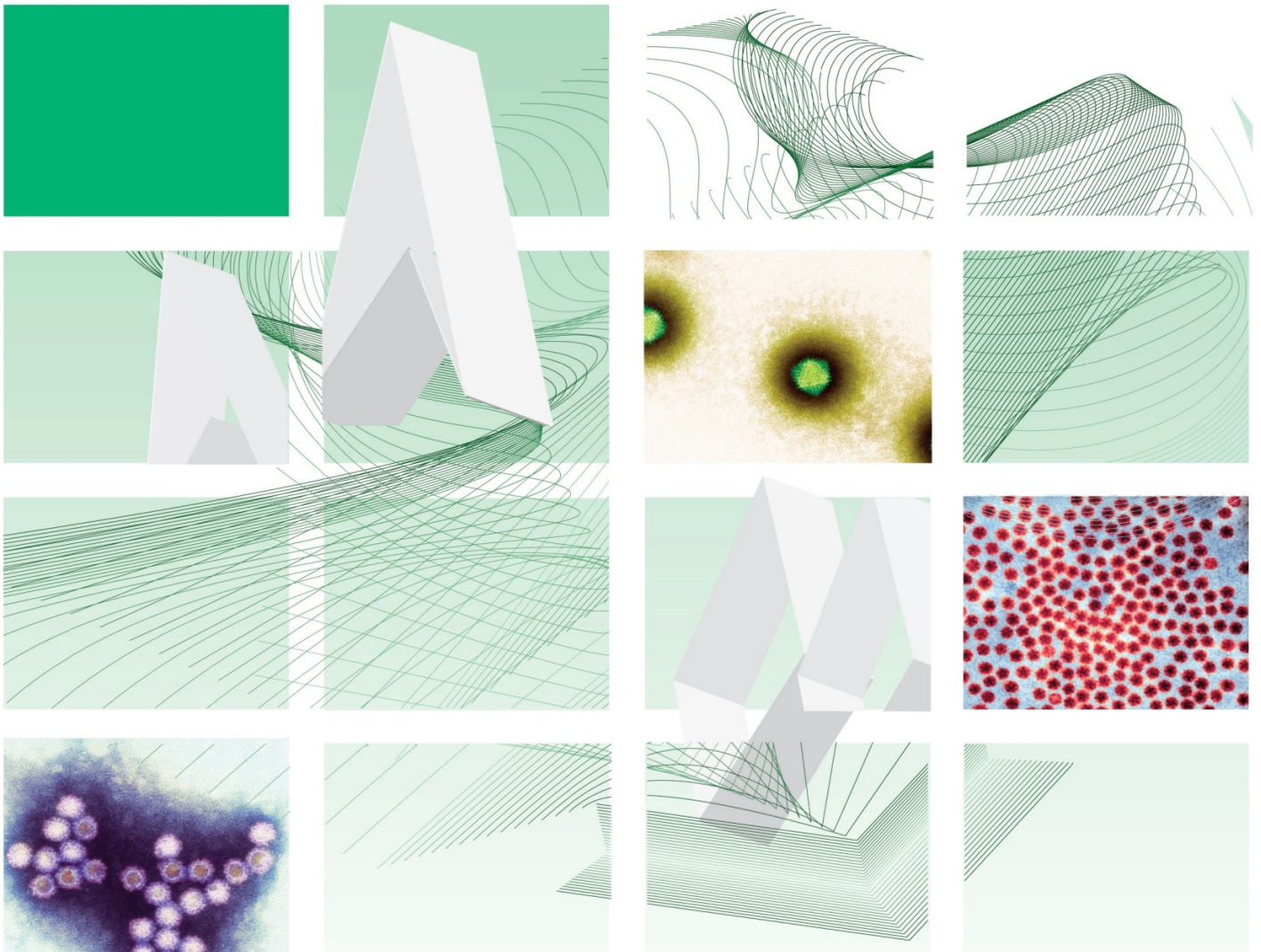




Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Isolamento di Virus Erpetici Umani (esclusi Herpes genitalis)



Emesso da Standards Unit, Microbiology Services, PHE

Virologia I V 23 | Emissione no: 3.3 | Data emissione 10.10.13 | Pagina 1 di 19

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.....	10
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA	11
2 PRELIEVO DEL CAMPIONE	11
3 TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE	12
4 PROCESSO/PROCEDURA SUL CAMPIONE	12
5 ASSICURAZIONE DELLA QUALITA'	15
6 LIMITAZIONI	15
8 PROCEDURA DI REFERTAZIONE	15
9 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE	16
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 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.	6/10.10.13
Emissione eliminata. no	3.2
Emissione inserita no.	3.3
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/Frontespizio 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.	5/20.04.12
Emissione eliminata. no	3.1
Emissione inserita no.	3.2
Sezione(i) Interessate	Modifica.
Intero documento	Documento presentato in nuovo formato Aggiunta intestazione standard per Informazione Tecnica
Sezione 3	Capitoli risistemati
Sezione 8	Aggiornata per includere la regolamentazione 2010. della Health Protection
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 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 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. 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 Suggestita per questo Documento

Public Health England. (2013). Isolation of Human Herpes Viruses (excluding Herpes genitalis) . UK Standards for Microbiology Investigations. V 23 Emissione 3.3. <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>.

Scopo del Documento

Questa SMI riporta i metodi utilizzati per isolare ed identificare i VHS (isolati da sedi non genitali), VVZ e CMV, utilizzando due tecniche di colture cellulari. La ricerca di VHS da siti genitali (herpes genitalis) è presentata nella [V 17-Isolation of herpes simplex virus associated with herpes genitalis](#).

Questa SMI deve essere usata congiuntamente ad alte SMI.

Introduzione

Generalità¹

La famiglia delle *Herpesviridae* comprende oltre 100 virus che sono stati isolati da una grande varietà di vertebrati. La Famiglia delle *Herpesviridae* è suddivisa in tre sottofamiglie o generi: *Alfa*, *Beta* e *Gammaherpesviridae* che dipendono dal tipo di ospite, durata del ciclo riproduttivo, citopatogenicità e caratteristiche dell'infezione latente. Attualmente, otto componenti della Famiglia sono stati riconosciuti come agenti infettivi nell'uomo, di questi, quattro possono essere isolati ed identificati utilizzando le colture cellulari monostrato convenzionali, vale a dire:

- Virus herpes simplex di tipo 1 (VHS 1)
- Virus herpes simplex 2 (VHS 2)
- Virus varicella zoster (VVZ)
- Citomegalovirus (CMV).
- Virus Herpes Simplex (VHS)

Il VHS è un membro del genere *Alphaherpesviridae*. Infetta l'epitelio della mucosa e si può manifestare in numerosi sedi corporee².

Nel corso dell'infezione primaria il virus penetra nelle parti distali dei nervi sensoriali ed è trasportato nella radice dei gangli dorsali, specificamente nell'area epiteliale coinvolta, ove si realizza un'infezione latente. Da questa condizione di latenza si può manifestare una riattivazione, una replicazione dell'infezione o una diffusione asintomatica del virus.

Di consuetudine le infezioni da VHS1 causano infezioni "in sedi circostanti", ma questa situazione sembra meno chiara, in quanto questo tipo di infezione può frequentemente manifestarsi in altre sedi. Di solito il VHS provoca l'herpes orale (ulcerazione fredda), ma può anche associarsi ad infezione oculare (cheratocongiuntivite ed ulcerazioni corneali) e con infezioni genitali, ove, nelle persone immunocompetenti, le infezioni rimangono localizzate³.

I VHS possono infettare il sistema nervoso centrale (SNC) e manifestarsi come encefalite. Questa infezione può conseguire ad un'infezione primaria da VHS o come conseguenza della riattivazione del virus. E' fondamentale l'esigenza di una diagnosi rapida di encefalite erpetica per consentire una pronta somministrazione di specifici farmaci antivirali. Il metodo di scelta nella diagnosi per questa manifestazione clinica è rappresentato dalla ricerca del DNA virale nel liquido cefalorachidiano (LCR) utilizzando la Polymerase Chain Reaction (PCR), da preferirsi all'esame colturale^{4, 5}.

Nei neonati il VHS può manifestare un'infezione generalizzata che coinvolge molteplici organi ed è spesso letale⁶. Si è osservato che i neonati nati da madri che hanno acquisito l'infezione primaria

da VHS in prossimità del termine della gravidanza, diversamente dall'infezione da riattivazione, hanno un'incidenza d'infezione superiore, probabilmente a causa della più consistente carica virale che si associa a questo tipo d'infezione primaria in contrasto all'infezione da riattivazione del virus⁷.

Con l'avvento di efficaci farmaci antivirali per le infezioni da VHS, ha assunto maggior importanza la necessità di metodi diagnostici accurati, relativamente rapidi, che consentano la tipizzazione degli isolati e, se richiesta, anche la determinazione della sensibilità agli antivirali. L'isolamento dell'VHS su colture cellulari monostrato soddisfa queste richieste.

Virus Varicella-Zoster (VVZ)⁸

Il VVZ è un membro del genere *Alphaherpesviridae*. L'infezione primaria causata da questo virus determina la varicella (chickenpox) che solitamente si manifesta come malattia pediatrica. Dopo un periodo di incubazione variabile fra 10 e 21 giorni compaiono sintomi, che si manifestano con stato febbrile associato ad esantema maculare a rapida evoluzione in vescicole ripiene di liquido, queste si trasformano poi in croste che in pochi giorni guariscono. Le lesioni caratteristiche si manifestano a "gruppi" in modo che tutti gli stadi dell'esantema possono essere presenti nello stesso momento con distribuzione sul corpo di tipo centripeto. La gravità della malattia aumenta negli adulti in quanto possono manifestarsi complicanze quali polmonite ed encefalite, in modo particolare nei pazienti immunocompromessi. L'infezione in gravidanza da VVZ presenta una condizione di rischio che può coinvolgere lo sviluppo fetale *in utero*, o se l'infezione è contratta in prossimità del termine della gravida, può manifestarsi come grave infezione neonatale con comparsa dei sintomi 7 -10 giorni dopo la nascita.

VVZ ha la capacità di stabilire un'infezione a lungo termine nelle radici dei gangli sensoriali. La riattivazione del virus assume in ogni caso la forma di un esantema unilaterale, solitamente limitato ad un solo dermatomero. Questa condizione è nota come herpes zoster (comunemente definita come fuoco di Sant'Antonio). E' più frequentemente osservata nella regione toracica ed occasionalmente in quella del capo, dove può riscontrarsi un coinvolgimento oculare. Il fuoco di Sant'Antonio si manifesta più frequentemente negli anziani e negli immunocompromessi. Nei pazienti immunocompromessi, l'esantema può essere associato ad un'infezione disseminata, coinvolgendo un ampio numero di organi.

Citomegalovirus (CMV)⁹

Il CMV è un membro del genere *Bethaherpesviridae* e possiede molte caratteristiche di questo genere. Manifesta spiccato tropismo per la cellula ospite, si associa a queste e si replica più lentamente degli altri componenti delle *Alphaherpesviridae* quali VHS o VVZ.

A seguito di un'infezione primaria, come per gli altri membri delle *Herpesviridae*, può riscontrarsi una condizione d'infezione persistente o di latenza virale ed il virus può essere ritrovato per lunghi periodi in diversi liquidi corporei, quali saliva, urine, seme, latte materno.

Il CMV raramente causa un'infezione sintomatica nei soggetti immunocompetenti. E' stato comunque associato a casi con anticorpi eterofili negativi di infezione mononucleosica dopo una consistente somministrazione di derivati ematici per interventi chirurgici importanti o successivi a traumi. L'infezione da CMV durante la gravidanza può essere asintomatica ma può determinare un'infezione *in utero* che conduce all'insorgenza di un'infezione congenita da CMV¹⁰.

L'infezione da CMV in pazienti con immunodepressione acquisita come nell'AIDS, o indotta, come nei riceventi trapianti, può produrre gravi conseguenze per l'elevato grado di morbilità e di mortalità che si riscontra in questi gruppi di ammalati. Nei trapiantati l'infezione può sorgere come conseguenza della riattivazione del virus endogeno o come infezione o re-infezione da virus presente nell'organo trapiantato. In entrambi i casi, è essenziale una rapida diagnosi di

Isolamento di Virus Erpetici Umani (esclusi Herpes genitalis)

infezione da CMV per permettere la somministrazione della terapia anti-virale. A questo scopo, la diagnosi di infezione da CMV nel paziente immunocompromesso è ottenuta in modo migliore con la ricerca del DNA virale utilizzando la tecnica PCR¹¹

Informazione Tecnica/Limitazioni

N/D

1 Considerazioni sulla Sicurezza¹²⁻²⁸

1.1 Prelievo del Campione¹²⁻¹³

Contrassegnare in modo appropriato il rischio secondo le procedure locali.

1.2 Trasporto e Conservazione del Campione¹²⁻¹⁷

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 Campione¹²⁻²⁸

- Questi virus sono classificati nel Gruppo dei patogeni di Rischio 2; fare riferimento alle attuali linee guida sulla sicurezza per la manipolazione dei microrganismi del Gruppo di Rischio 2
- Le donne in gravidanza possono essere a rischio di trasmissione dell'infezione al feto. Pertanto, il personale sanitario senza una precedente anamnesi positiva per queste infezioni, che può, o potrebbe essere in gravidanza, dovrà essere informato dei rischi relativi ad un proprio coinvolgimento
- Le procedure di laboratorio che comportano l'insorgenza di aerosol infettivi devono essere condotte in una cabina microbiologica di sicurezza do Classe 1 (CMS)
- E' raccomandato in modo particolare che siano calzati i guanti quando si seminano i campioni o si manipolano le cellule che sono sospettate di contenere virus.

Le precedenti linee guida devono essere supplementate con il COSHH locale per la valutazione del rischio.

2 Prelievo del Campione

2.1 Tipo di Campioni

VHS	Tamponi da vescicole	Tamponi congiuntivali
	Tamponi da lesioni	Tamponi faringei
	Tamponi da ulcere	Tamponi orali
CMV	Lavaggio orale	Urine
	Gargarismo faringeo	Sangue eparinato
	Lavaggio broncoalveolare	Espettorato indotto
VZV	Liquidi da vescicola	Tamponi da lesione
	Tamponi da vescicola	Croste da lesioni
	Tamponi da lesioni	Raschiamento da lesioni

2.2 Tempo Ottimale di Prelievo del Campione

I tamponi o i campioni devono essere prelevati il più presto possibile dopo la comparsa dei sintomi. I raschiamenti o i tamponi prelevati nell'area delle lesioni attive dovrebbero essere immediatamente inseriti in un Terreno di Trasporto per Virus (TTV). Non è di solito necessario ripetere il campionamento, tranne che per i casi sospetti di CMV. In questi l'escrezione o la diffusione virale possono essere transitori e permangono per un tempo considerevole dopo l'infezione primaria; si potrà pertanto richiedere l'accertamento su altri campioni in funzione del virus isolato.

Tutti i campioni devono essere prelevati prima dell'inizio della chemioterapia antivirale.

2.3 Tipo di Campione Appropriato e Metodo di Prelievo

N/D

2.4 Quantita' Adeguata ed Appropriato Numero di Campioni

N/D

3 Trasporto e Conservazione del Campione^{12,13}

3.1 Tempo fra Prelievo del Campione e Procedura

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

Quando si utilizzano sistemi di trasporto verificare che i campioni pervengano entro le 24 ore.

3.2 Considerazioni Particolari per Ridurre il Deterioramento

Dopo il prelievo i campioni devono essere inseriti immediatamente in un idoneo TTV.

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 o a temperatura inferiore e scongelare prima dell'inizio della procedura. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

4 Processo/Procedura sul Campione^{12,13}

4.1 Selezione della Prova

Per fornire una risposta provvisoria nel caso di richiesta di risultato urgente si possono utilizzare la microscopia elettronica (ME), l'immunofluorescenza (IF), la ricerca dell'antigene usando prodotti commerciali, ma questi risultati, in teoria, dovrebbero essere confermati con la PCR o l'esame colturale. Per il CMV è anche opportuno considerare la tecnica delle "shell vial".

4.2 Tecnica Microscopica

Le griglie per la ME ed i vetrini per microscopia per IF devono essere preferibilmente preparati con materiale prelevato direttamente dalla lesione. Fare riferimento alla [V 13 - Investigation of clinical specimens by electron microscopy using the floatation \(direct\) method](#).

4.3 Coltura e Ricerca

Pre-trattamento

N/D

Procedura sul campione

I campioni devono essere passati su vortex o agitati vigorosamente per fare rilasciare il materiale cellulare nel terreno di trasporto. Per evitare la formazione di aerosol il campione non deve essere aperto subito dopo questo trattamento.

I campioni devono essere centrifugati prima della semina per concentrare il materiale cellulare presente nel campione. Per evitare la formazione di aerosol il campione non deve essere aperto subito dopo la centrifugazione. Per una procedura immediata è richiesta l'apertura del contenitore del campione in CMS di classe 1.

Se si ricevono croste vescicolari per l'isolamento del virus, queste devono essere preparate dopo la loro frammentazione in una provetta di Griffith e il materiale di nuovo sospeso nel TTV. Prima di inoculare le colture cellulari può essere necessario chiarificare con centrifugazione il TTV. Si deve notare che qualsiasi procedura che possa potenzialmente generare aerosol deve essere eseguita in una CMS di classe 1.

Isolamento ed effetto Citopatico

VHS^{1,29}

Molte delle linee cellulari utilizzate di routine per l'isolamento dei virus sono sensibili all'infezione da VHS. Fra queste, i fibroblasti diploidi umani MRC-5 si sono dimostrati le più sensibili all'infezione ed alla comparsa più precoce dell'effetto citopatico (ECP) rispetto ad altre linee. Le linee cellulari stabilizzate Vero, derivate dall'African Green Monkey Kidney (rene di scimmia verde africana) sono una appropriata alternativa.

Seminare 100µL - 200µL di TTV contenente il materiale clinico in ciascuna di due provette di coltura cellulare contenente la linea(e) cellulare selezionata. Le cellule devono essere incubate a 35-37°C, con o senza oscillazione, per sette giorni. Per risultati colturali rapidi, le colture dovrebbero essere esaminate giornalmente per la comparsa del caratteristico ECP, associato all'infezione da VHS. In alternativa, i laboratori possono esaminare le colture cellulari dopo 24 e 48 ore, poi durante ogni altro giorno lavorativo.

Per produrre l'effetto ECP non sono di solito richiesti trasferimenti ciechi dalle colture e questi dovrebbero essere effettuati solo se le cellule sono contaminate da batteri o funghi, o presentano fenomeni degenerativi prodotti dal materiale clinico.

VVZ⁸

Il VVZ è in grado di replicarsi in molte linee cellulari di mammiferi di uso comune; in ogni caso la replicazione ottimale *in vitro* si realizza meglio nelle linee cellulari semi-continue di fibroblasti diploidi umani, quali le MRC-5.

Seminare 100µL – 200µL di TTV contenente materiale clinico in ciascuna di due provette di due colture cellulari contenenti la linea(e) cellulare selezionata. Le colture devono essere incubate a 35-37°C, con o senza oscillazione. Se il materiale clinico contiene VVZ la comparsa dell'ECP può richiedere fino a 21 giorni e talvolta un periodo superiore.

VVZ è un virus particolarmente integrato nella cellula e pertanto le particelle virali non sono rilasciate nel terreno di coltura. In conseguenza di ciò, l'ECP è caratterizzato dalla comparsa di piccoli foci di cellule a "palloncino". È importante che le colture siano osservate con frequenza giornaliera in quanto è certamente possibile che le cellule infettate si stacchino dal contenitore (provetta o fiasca) e lo spazio vuoto da loro lasciato nello strato cellulare può essere sostituito da fibroblasti non infettati.

Isolamento di Virus Erpetici Umani (esclusi Herpes genitalis)

In funzione della caratteristica integrazione cellulare del virus, il trasferimento “cieco” della coltura, o la propagazione seriale del virus, richiedono che le cellule siano distrutte con un metodo fisico. Lo strato monocellulare deve essere rimosso dalla superficie del contenitore della coltura con raschiamento usando un appropriato strumento sterile o con tripsina; la sospensione cellulare prodotta sarà lisata poi con cicli di congelamento scongelamento o per sonicazione.

CMV

Il CMV manifesta uno spiccato tropismo cellulare e può essere isolato solo in cellule di origine umana. La linea cellulare scelta per l'isolamento del CMV è la MRC-5, linea semi-continua fibroblastica diploide di origine umana.

Seminare 100µL – 200µL di materiale clinico in ciascuna di due provette di coltura cellulare MRC-5. Le colture devono essere incubate a 35-37°C, con o senza oscillazione, per un minimo di 28 giorni. Per preservare le linee cellulari dal deterioramento, si consiglia di nutrire le colture con terreni di mantenimento ogni 7 giorni.

Il CMV è un virus integrato nella cellula e pertanto le particelle virali non sono rilasciate nel terreno di coltura. Di conseguenza, l'ECP è caratterizzato dalla comparsa di foci contenenti cellule rifrangenti di grandi dimensioni. Per motivi di lenta replicazione le colture cellulari di CMV devono essere controllate fino a 28 giorni prima di essere scartate come negative. In funzione della caratteristica integrazione cellulare del virus, il trasferimento “cieco” della coltura o la propagazione seriale del virus richiedono che le cellule siano distrutte con un metodo fisico. Lo strato monocellulare può essere rimosso dalla superficie del contenitore della coltura (provetta o fiasca) con raschiamento dello strato cellulare, effettuato con un appropriato strumento sterile o con uso di tripsina; la sospensione cellulare prodotta sarà

4.4 Identificazione

In laboratorio

L'ECP prodotto dai virus VHS, CMV e VVZ può essere considerato caratteristico, in modo particolare da persona con esperienza; può comunque essere confermato con IF diretta o indiretta mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali.

La sierotipizzazione di HSV è raccomandata per tutti i nuovi isolati con IF diretta od indiretta e anticorpi monoclonali tipo specifici.

Invio al Laboratorio di Riferimento

L'invio necessario per:

- Tipizzazione degli isolati
- Prove di sensibilità agli antivirali (disponibile presso l'Antiviral Reference Laboratory, Birmingham Laboratory, Public Health England, West Midlands).

5 Assicurazione della Qualità

Deve essere predisposto un sistema per assicurare un'appropriate verifica della qualità interna ed esterna ed il mantenimento delle procedure del controllo di qualità³⁰.

E' indispensabile che i laboratori dispongano di un'appropriate validazione di metodi, strumentazione e procedure commerciali o di laboratorio che dimostrino la loro idoneità alle richieste.

6 Limitazioni

L'isolamento positivo dei microrganismi dipende da: appropriato prelievo del campione, trasporto, conservazione e procedura analitica, qualità e disponibilità di linee cellulari utilizzate, adozione di condizioni corrette per la coltura e dalla disponibilità di adeguate/appropriate notizie cliniche.

Devono essere utilizzate solo linee cellulari sicuramente sensibili agli herpes virus umani e la loro sensibilità deve essere verificata all'acquisizione e ad intervalli regolari. La sensibilità delle cellule prelevate all'azoto liquido deve essere verificata per prima dell'uso.

La procedura(e) di questi documenti hanno lo scopo di descrivere metodi standard di microbiologia per i tipi di campioni specificati. Possono essere richieste altre procedure ed è indispensabile l'interpretazione professionale di un gruppo qualificato. Per cortesia, prendere nota che le conoscenze delle malattie infettive cambiano continuamente ed anche se questa MSI riveduta regolarmente potrebbe non includere patogeni emergenti.

Le linee guida precedentemente esplicitate devono essere supplementate con le valutazioni delle limitazioni

7 Procedura di Refertazione

7.1 Referti

I campioni che producono il caratteristico ECP e che sono successivamente confermati con IF, utilizzando specifici anticorpi monoclonali, devono essere refertati nel modo seguente:

come "Isolato Citomegalovirus"

I campioni che non presentano il caratteristico ECP dopo un'incubazione minima di 28 giorni devono essere refertati nel modo seguente:

"Virus non isolato"

I risultati positivi per VHS devono essere refertati come "Isolato virus Herpes simplex tipo ..."

8 Notifica alla PHE^{32,33} o Equivalente³⁴⁻³⁷

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 il locale 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 PHE gran parte delle diagnosi di laboratorio sostenute da agenti causali e molti PHE Health Protection Team 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, HCAs e CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non nel 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories')

In Scozia^{34,35} e Galles³⁶ e nell'Irlanda del Nord³⁷ sono vigenti altre disposizioni.

Le seguenti condizioni richiedono la segnalazione alla Public Health England

Tutte le identificazioni clinicamente significative da casi neurologici, da siti genitali o casi di meningite, encefalite e decessi associati a VHS.

Tutte le identificazioni clinicamente significative di CMV..

Tutte le identificazioni clinicamente significative di VVZ da neonati o donne in gravidanza e casi di meningite, encefalite, polmonite e decesso..

In Inghilterra e nel Galles la varicella non è una malattia assoggettata a denuncia e pertanto non richiede la segnalazione al CCDC locale. In Scozia la malattia è assoggettata a denuncia e deve essere segnalata allo Scottish Centre for Infection and Environmental Health (SCIEH).

HSV e CMV non sono malattie da denunciare e pertanto non richiedono la segnalazione al locale CCDC.

Bibliografia

1. Whitley RJ. Herpes simplex virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. "Fields" Virology. 4th ed. Vol 2. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 2493.
2. Kolokotronis A, Doumas S. Herpes simplex virus infection, with particular reference to the progression and complications of primary herpetic gingivostomatitis. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:202-11.
3. Kaye S, Choudhary A. Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res* 2006;25:355-80.
4. Whitley RJ. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res* 2006;71:141-8.
5. Strick LB, Wald A. Diagnostics for herpes simplex virus: is PCR the new gold standard? *Mol Diagn Ther* 2006;10:17-28.
6. Caviness AC, Demmler GJ, Almendarez Y, Selwyn BJ. The prevalence of neonatal herpes simplex virus infection compared with serious bacterial illness in hospitalized neonates. *J Pediatr* 2008;153:164-9.
7. Prober CG, Sullender WM, Yasukawa LL, Au DS, Yeager AS, Arvin AM. Low risk of herpes simplex virus infections in neonates exposed to the virus at the time of vaginal delivery to mothers with recurrent genital herpes simplex virus infections. *N Engl J Med* 1987;316:240-4.
8. Arvin AM. Varicella Zoster Virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Roizmann B, Monath TP, Straus SE, Chanock RM, Melnick JL, editors. "Fields" Virology. 3rd ed. Vol 2. Lippincott Williams and Wilkins; 1996. p. 2565.
9. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol* 2008;197:65-73.
10. Mosca F, Pugni L. Cytomegalovirus infection: the state of the art. *J Chemother* 2007;19 Suppl 2:46-8.
11. Drew WL. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20:408-11.
12. 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".
13. 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.
14. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
15. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
16. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.

Isolamento di Virus Erpetici Umani (esclusi Herpes genitalis)

17. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
18. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
19. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
20. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
25. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
26. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
27. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
28. 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
29. Gray JJ. Herpes simplex virus. In: Caul EO, editor. Immunofluorescence: Antigen detection techniques in diagnostic microbiology. London: Public Health Laboratory Service; 1992. p. 75-84.
30. Snell JJS BD, Roberts C, editors. Immunofluorescence: Antigen detection techniques in diagnostic microbiology. Quality Assurance Principles and Practice in the Microbiology Laboratory. 1999. p. 147-8.
31. Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd. Standards for the Medical Laboratory. Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd. Sheffield: 2004. p. 1-56.
32. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37
33. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
34. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
35. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
36. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.

Isolamento di Virus Erpetici Umani (esclusi Herpes genitalis)

37. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).