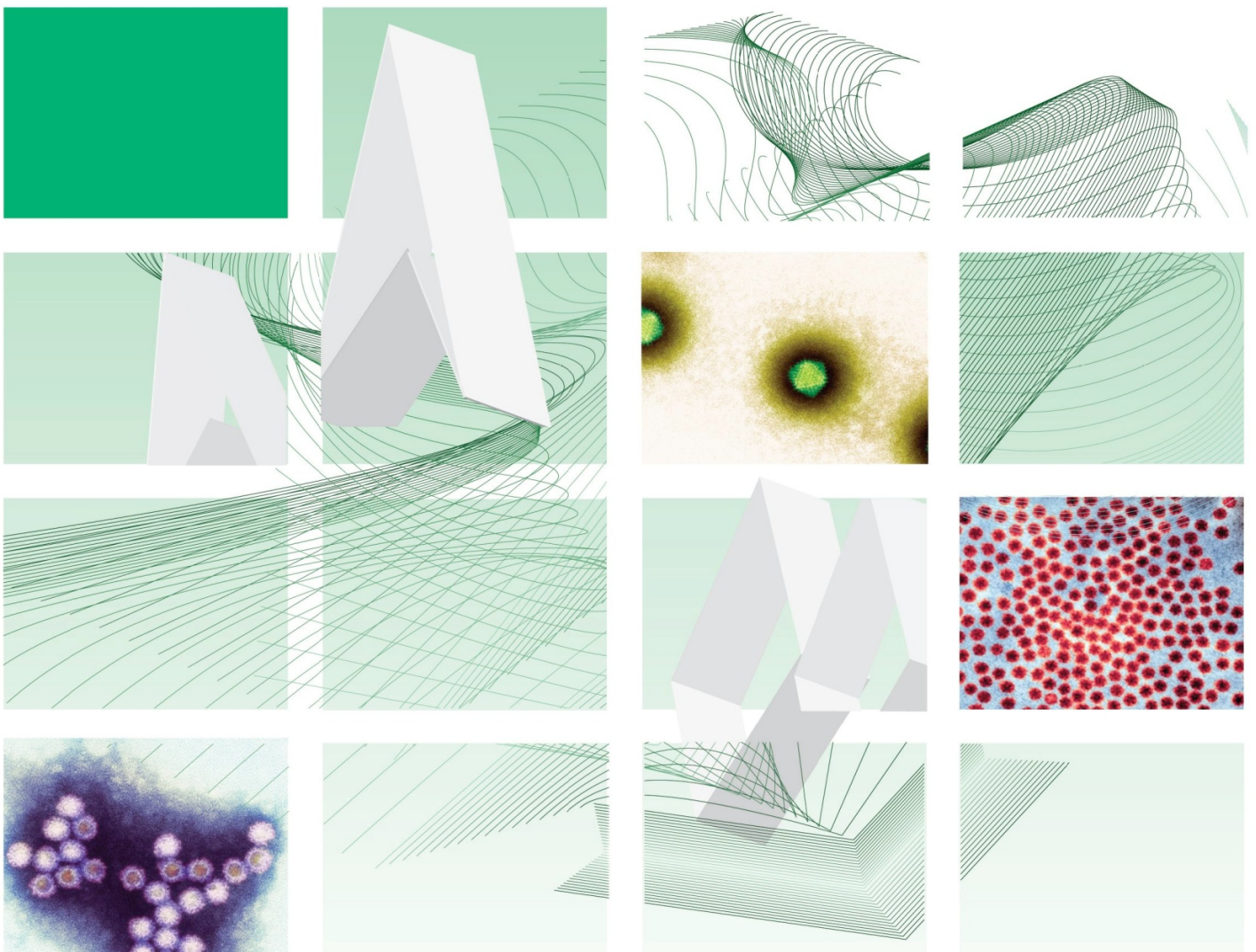




Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Isolamento di Enterovirus e Parechovirus



Emesso da Standards Unit, Microbiology Services, PHE

Virologia I V 24 | Emissione no: 3.3 | Data emissione 10.10.13 | Pagina 1 di 14

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.....	8
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA	9
2 PRELIEVO DEL CAMPIONE	9
3 TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE	10
4 PROCESSO/PROCEDURA SUL CAMPIONE	10
5 ASSICURAZIONE DELLA QUALITA'	11
6 LIMITAZIONI	12
7 PROCEDURA DI REFERTAZIONE	12
8 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE.....	12
BIBLIOGRAFIA.....	13



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 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/Pagina no.	Modifica.
Documento intero .	Formato modificato.

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 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.

Colaborazione 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 assoggettato 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 Enteroviruses and Parechoviruses. UK Standards for Microbiology Investigations. V 24 Issue 3.3. <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>

Scopo del Documento

Questa SMI descrive l'isolamento e l'identificazione degli enterovirus e parechovirus da materiale clinico.

Questa SMI deve essere usata congiuntamente ad altre SMI.

Introduzione

Generalità

Nei generi *Enterovirus* e *Parechovirus*, appartenenti alla famiglia delle *Picomaviridae*, sono presenti più di 60 sierotipi in grado di infettare l'uomo. Gli enterovirus umani sono classificati in 5 specie, poliovirus ed enterovirus umani dei gruppi A-D¹. Prima della più recente classificazione molecolare, i sottogruppi si definivano con le caratteristiche sierologiche ed includevano poliovirus (3 sierotipi), Coxsackie A e B (rispettivamente 23 e 6 sierotipi), echovirus (26 sierotipi) ed i più recenti enterovirus classificati come tipi 68-71. Due virus, in precedenza classificati con gli echovirus 22 e 23, hanno dimostrato di comprendere un genere separato all'interno della famiglia delle *Picornaviridae*, il genere *Parechovirus*; questi virus sono ora assegnati ai parechovirus umani di tipo 1 e 2. La scoperta e la caratterizzazione dei picornavirus è progredita rapidamente con l'adozione delle prove di biologia molecolare e degli schemi di tipizzazione molecolare ed ora sono stati classificati più di 90 virus come enterovirus e sei tipi di echovirus. In questo documento la dizione 'enterovirus' sarà usata genericamente per definire sia enterovirus che parechovirus.

Gli enterovirus sono in grado di causare nell'uomo un ampio spettro di malattie, da lievi stati febbrili non-specifici, associati ad esantemi nelle infezioni delle vie aeree superiori, a meningite asettica, pleurodinia, ed infezioni a possibile prognosi infausta, quale miocardite, encefalite e poliomielite paralitica. La maggior parte delle infezioni è comunque asintomatica.

La diagnosi di infezione da enterovirus con isolamento in coltura cellulare è diffusamente disponibile, relativamente rapida e l'isolato può essere tipizzato con antisieri per motivi epidemiologici. I metodi PCR sono in ogni caso sempre più utilizzati. Questi sono generalmente più sensibili e più rapidi dei metodi di coltura cellulare e possono rilevare infezioni da enterovirus non coltivabili^{2,3}.

Informazione Tecnica/Limitazioni

Contenitori per Campioni^{4,5}

Le SMI usano il termine " contenitore a chiusura ermetica con marchiatura CE " per descrivere quelli contrassegnati con la marchiatura CE per la raccolta e il trasporto dei campioni clinici. I requisiti per i contenitori dei campioni sono riportati nella Direttiva UE per i Dispositivi Sanitari Diagnostici in vitro (98/79/CE allegato 1 B 2.1) in cui si stabilisce: " La progettazione deve consentire un'agevole manipolazione e, se necessario, ridurre per quanto possibile la contaminazione dei, e perdite dal dispositivo durante l'uso e, nel caso di recipienti per campioni, il rischio di contaminazione degli stessi. Le procedure di fabbricazione devono essere adatte a questi scopi".

1 Considerazioni sulla Sicurezza⁴⁻²⁰

1.1 Prelievo del Campione^{4,5}

Contrassegnare in modo appropriato il rischio secondo le procedure locali.

1.2 Trasporto e Conservazione del Campione^{4,9}

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

Può essere utilizzato sistema di trasporto del virus (ove appropriato) ed il campione deve essere posto in un borsa o sacchetto di plastica chiuso.

Utilizzare appropriati contrassegni di rischio in accordo con le direttive locali

1.3 Procedura sul Campione⁴⁻²⁰

- Tutti gli enterovirus appartengono al Gruppo di Rischio 2. Le procedure di laboratorio che generano aerosol infettivi devono essere eseguite in cabina microbiologica di sicurezza.
- .E' richiesta la vaccinazione anti polio; le indicazioni sono fornite nella Health Protection Agency immunisation policy.
- Fare riferimento alle linee guida attuali per la manipolazione sicura dei microrganismi del Gruppo di Rischio 2 descritti in questo Metodo Nazionale Standard del RU.
- Per cortesia prendere nota che ai laboratori che conservano poliovirus selvaggi infettivi o materiali potenzialmente infettivi è raccomandato di lavorare al livello di biosicurezza 2/polio (BSL-2/polio)²¹

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

2 Prelievo del Campione

2.1 Tipo di Campioni

Tampone faringeo, tampone da vescicola, tampone oculare, LCR, feci liquido pericardico
tampone rettale, biopsia tissutale, Liquido da vescicola, tessuto post mortem

2.2 Tipo Ottimale di Prelievo del Campione^{4,5}

Tamponi, raschiamenti, liquido pericardico e tessuti devono essere prelevati il più presto possibile dopo la comparsa dei sintomi e inseriti in un Terreno di Trasporto per Virus (TTV). Le fecimemil LCR devono essere raccolti in contenitore in permeabile con marchiatura CE inserito in sacchetto di plastica

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^{4,5}

3.1 Tempo fra Prelievo del Campione e Procedura

I campioni devono essere processati il più presto possibile. In linea teorica, i sistemi di trasporto dovrebbero assicurare l'arrivo dei campioni entro 24 ore dal loro prelievo.

3.2 Considerazioni Particolari per Ridurre il Deterioramento

I campioni devono essere inseriti in un TTV idoneo immediatamente dopo il prelievo.

Se la procedura è ritardata, i campioni devono essere refrigerati. Se il ritardo supera le 24 ore, i campioni devono essere congelati a -70°C, o a temperatura inferiore, e scongelati immediatamente prima della procedura analitica. Devono essere evitati ripetuti congelamenti e scongelamenti

4 Processo/Procedura sul Campione^{4,5}

4.1 Selezione della Prova

L'isolamento in coltura cellulare è stato in passato il metodo più utilizzato per la diagnosi di enterovirus e lo è tuttora nella pratica comune. Tuttavia, le tecniche PCR offrono evidenti vantaggi per quanto riguarda la sensibilità e tempo complessivo di risposta. I centri specialistici devono essere in grado di definire la tipizzazione di specie con il sequenziamento genetico sul campione originale²².

4.2 Coltura e Ricerca

4.2.1 Preparazione del campione

Feci

I campioni fecali sono preparati in sospensione al 10-20% con una soluzione salina bilanciata contenente antibiotici, chiarificata poi con centrifugazione a 1600-2000 g per 10 minuti.

Tessuti

I tessuti sono macinati in un mortaio sterile. Occasionalmente può essere richiesta l'aggiunta di sabbia sterile ed una piccola quantità di terreno.

Dopo la preparazione di una sospensione al 10-20% in TTV, chiarificare con centrifugazione a 1600-2000 g per 10 minuti.

Tamponi

I tamponi devono essere scossi per far rilasciare il materiale cellulare nel terreno di trasporto per i virus, ponendo attenzione a non generare aerosol.

Campioni di LCR e liquido pericardio

Questi sono considerati campioni puliti e richiedono una minima preparazione.

4.2.2 Isolamento

Molte delle linee utilizzate di routine per l'isolamento virale sono sensibili all'infezione per la maggior parte degli enterovirus. Fra le linee comunemente utilizzate, quelle primarie di rene di scimmia rhesus (RKM – rhesus monkey kidney) sono le più sensibili, ma queste, per motivi etici, non sono atate più disponibili dal mese di Aprile 2006. Le linee cellulari diploidi umane, quali le MRC-5 sono risultate ugualmente sensibili e, rispetto alle altre linee cellulari, presentano l'effetto citopatico più

precocemente²³. Le cellule RD (rabbdomiosarcoma) sono state riscontrate sensibili a molti enterovirus (con eccezione del gruppo Coxsackie B), compresi un certo numero di Coxsackie A, che di solito sono isolati solo nel topo neonato²⁴. Per ridurre i tempi ed aumentare la possibilità di isolamento degli enterovirus possono essere utilizzate più linee cellulari di tipo diverso

Inoculare 0.2 mL di LCR, estratto fecale o TTV contenente il materiale clinico in ciascuna di due linee cellulari. Le cellule devono essere incubate a 35 – 37°C fino a 10 giorni. Devono essere controllate ad intervalli regolari per la comparsa del caratteristico effetto citopatico prodotto dagli enterovirus.

4.2 Identificazione

4.3.1 In laboratorio

La crescita degli enterovirus nella coltura cellulare può essere riconosciuta dalla comparsa di caratteristiche modificazioni citopatiche e confermata con immunofluorescenza o con la neutralizzazione.

La sierotipizzazione degli enterovirus deve essere eseguita principalmente per escludere i poliovirus. La determinazione di gruppo degli enterovirus, echovirus, coxsackie B e poliovirus è di consuetudine effettuata con immunofluorescenza indiretta e anticorpi monoclonali tipo-specifici. I poliovirus dovrebbero essere ulteriormente tipizzati per determinare i sierotipi 1-3.

Se richieste, possono essere eseguite successive tipizzazioni con prove di immunofluorescenza indiretta o neutralizzazione con combinazione di pool di sieri neutralizzanti di Lin, Benyesh, Melnick (LBM) od altri reagenti commerciali²⁵.

La preparazione e la colorazione dei campioni con reagenti commerciali per immunofluorescenza devono essere eseguite osservando in modo rigoroso le indicazioni del produttore.

4.4 Invio ai Laboratori di Riferimento

Devono essere inviati tutti i virus polio e quelli non identificati al PHE Colindale. La sorveglianza continua è importante per riscontrare e differenziare il vaccino dai ceppi di poliovirus selvaggi isolati. Per ulteriori informazioni sui polivirus consultare la [P1 – Surveillance of polio in the UK](#).

5 Assicurazione di Qualità

Deve essere istituito un sistema di qualità per assicurare il mantenimento di un'adeguata qualità interna ed esterna ed il controllo delle procedure della qualità. Per ulteriori informazioni sull'assicurazione di qualità consultare la [Q 2 – Quality assurance in the diagnostic virology and serology laboratory](#).

E' essenziale che i laboratori abbiano la registrazione della validazione dei metodi, degli strumenti e delle procedure analitiche commerciali e proprie, che evidenzino in modo adeguato la loro idoneità allo scopo²⁶.

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 enterovirus 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.

7 Procedura di Refertazione

7.1 Referti

I campioni negativi devono essere refertati come

"Virus non isolati"

I campioni positivi devono essere refertati come

"Isolato enterovirus (tipo xx) o "Isolato enterovirus. Risultato della tipizzazione a seguire"

8 Notifica alla PHE^{27,28} o Equivalente²⁹⁻³²

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 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, HCAIs e CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non nel 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories')

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

Bibliografia

1. Pringle CR. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. Arch Virol 1999;144:2065-70.
2. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB, et al. Development and evaluation of a 'real-time' RT-PCR for the detection of enterovirus and parechovirus RNA in CSF and throat swab samples. J Med Virol 2002;67:555-62.
3. Santos AP, Costa EV, Oliveira SS, Souza MC, Da Silva EE. RT-PCR based analysis of cell culture negative stools samples from poliomyelitis suspected cases. J Clin Virol 2002;23:149-52.
4. 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".
5. 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.
6. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
7. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
8. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
9. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
10. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
11. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
12. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.

Isolamento di Enterovirus e Parechovirus

17. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
18. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
19. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
20. 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
21. Standard biosafety level 2 requirements. WHO Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. World Health Organisation; 2004. p. 9-19.
22. Iturriza-Gomara M, Megson B, Gray J. Molecular detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. J Med Virol 2006;78:243-53.
23. Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL. Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. J Clin Microbiol 1988;26:2576-80.
24. Schmidt NJ, Ho HH, Lennette EH. Propagation and isolation of group A coxsackieviruses in RD cells. J Clin Microbiol 1975;2:183-5.
25. Lim KA, Benyesh-Melnick M. Typing of viruses by combinations of antiserum pools. Application to typing of enteroviruses (Coxsackie and ECHO). J Immunol 1960;84:309-17.
26. Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd. Standards for the Medical Laboratory. Sheffield. 2004. p. 1-56
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).