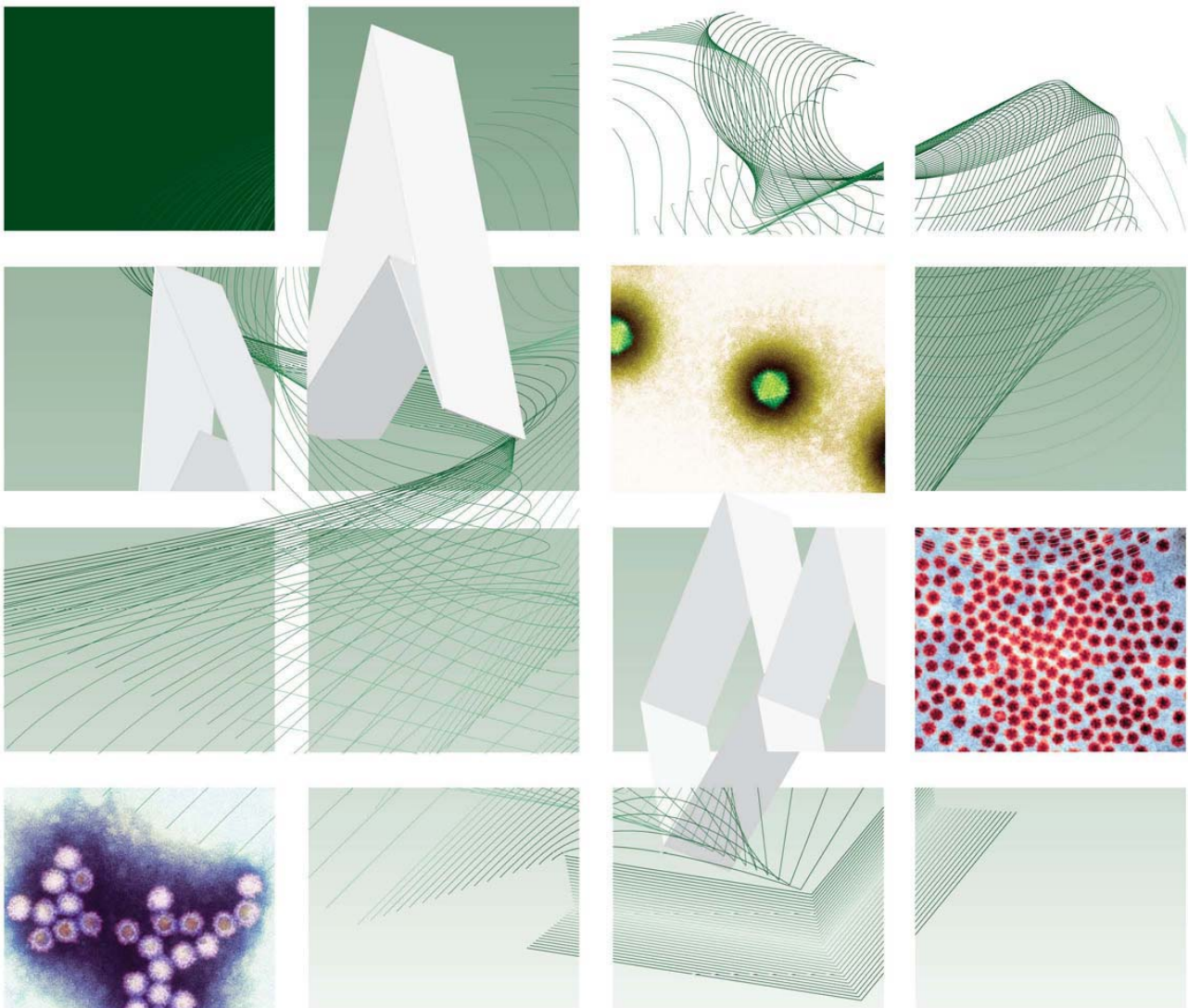


Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito

Ricerche di V. Influenza A H1N1 di Origine Suina con Saggio PCR Quadriplex Influenza A associato a Influenza A H1 di Origine Suina e al Saggio N1



Emesso da Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA

Virologia I V 49 | Emissione no: 1.2 | Data emissione 02.11.11 | Pagina 1 di 15

Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Health Protection Agency (HPA) 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@hpa.org.uk

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

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



Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito # : Situazione

Utilizzatori delle SMI

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

- Nel Regno Unito sono principalmente destinate come risorsa generale ai professionisti che operano nel campo della medicina di laboratorio. La consulenza specialistica dovrebbe essere disponibile qualora necessaria.
- 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 da parte dei reparti ospedalieri.
- Le SMI forniscono gli standard per le ricerche microbiologiche anche ai responsabili della sanità pubblica che devono considerarle come parte delle procedure da adottare per la salute (sia clinica che pubblica) per la propria popolazione..

Informazioni di base per le SMI

Le SMI comprendono algoritmi e procedure raccomandate che riguardano tutte le componenti del processo diagnostico dalla fase pre-analitica (sindrome clinica) alle diverse fasi analitiche (prove di laboratorio) e post-analitiche (interpretazione e comunicazione dei risultati).

Gli algoritmi delle sindromi sono corredati da informazioni più dettagliate contenenti consigli sulle indagini per specifiche malattie e infezioni. Note orientative riguardano il contesto clinico, la diagnosi differenziale e indagini appropriate per particolari condizioni cliniche. Le note orientative descrivono metodologie di laboratorio essenziali che sono alla base della qualità, ad esempio la validazione della prova, la garanzia della qualità, la definizione dell'incertezza della determinazione.

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

Coinvolgimento delle Organizzazioni Professionali

Lo sviluppo delle SMI è condotto nell'ambito dell'HPA in collaborazione con il NHS, Public Health del Galles e con le organizzazioni professionali.

L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito

<http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>. L'inclusione del logo di una organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del comitato direttivo e dei gruppi di lavoro che sviluppano le SMI, anche se le opinioni dei partecipanti non sono necessariamente quelle espresse da tutta l'organizzazione che essi rappresentano.

Gli Standard di Microbiologia del RU erano in precedenza conosciuti come Metodi Nazionali Standard.

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).

Ricerche di V. Influenza A H1N1 di Origine Suina con Saggio PCR Quadriplex Influenza A associato a Influenza A H1 di Origine Suina e al Saggio N1

Le SMI sono sviluppate, revisionate ed aggiornate con un ampio processo di consultazione. I documenti elaborati riflettono l'opinione della maggior parte dei partecipanti. Le SMI sono liberamente disponibili per la consultazione su <http://www.hpa.org.uk/SMI> come documenti controllati in formato Adobe PDF.

Assicurazione di Qualità

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 ben referenziate e non rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio disponibili nel Regno Unito. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche 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. Queste stesse devono essere utilizzate in associazioni con altre SMI

I laboratori di microbiologia del Regno Unito che non utilizzano le SMI dovrebbero essere in grado di dimostrare almeno l'equivalenza delle loro metodologie di prova.

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.

Sebbene sia stata posta la massima attenzione nella preparazione delle SMI, la HPA, e l'organizzazione(i) subentranti e qualsiasi altra organizzazione di sostegno, dovranno, per quanto possibile nel rispetto della legge vigente, escludere la responsabilità per qualsiasi spreco, costo, reclamo, danno o maggior spesa derivanti da o connesse all'uso di una SMI o qualsiasi informazione ivi contenuta. Se sono apportate modifiche a una SMI, deve essere chiaro dove e chi le ha apportate

Le SMI sono assoggettate ai diritti d'autore della HPA, che devono essere riconosciuti quando appropriato.

La tassonomia microbica è aggiornata al momento in cui è stata completata la revisione.

Regolamentazione della Gestione dei Dati Sensibili

Le valutazioni delle Regole Anti-discriminazione concernenti le SMI sono disponibili all'indirizzo <http://www.hpa.org.uk/SMI>.

La HPA 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.

Citazione Suggesta per questo Documento

Health Protection Agency. (2011). Investigation of Swine-Lineage Influenza A/H1N1 v Using the Quadriplex Influenza A PCR Assay with Swine-Lineage Influenza A H1 and N1 Assays. UK Standards for Microbiology Investigations. V 49 Emissione 1.2. <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>.

Contenuti

RINGRAZIAMENTI	2
RICERCHE MICROBIOLOGICHE: PROCEDURE STANDARD DEL REGNO UNITO: SITUAZIONE	3
TABELLA MODIFICHE	6.
DIAGRAMMA 1: RICERCA DI V. INFLUENZA H1N1 DI ORIFGINE SUINA CON SAGGIO PCR QUADRIplex INFLUENZA A CON INFLUENZA A H1 DI ORIGINE SUINA E SAGGIO N1².....	7
DIAGAMMA 2	8
SEGNALAZIONE ALL' AHPA	11
APPENDICE 1: GESTIONE CASI CONFERMATI O PROBABILI	12
APPENDICE 2: MATRICE DI REFERTAZIONE PER V. INFLUENZA H1N1 DI ORIGINE SUINA	13
BIBLIOGRAFIA	15



La procedura di sviluppo delle SMI è certificata ISO 9001.



La NHS Evidence ha accreditato la procedura usata dalla HPA per produrre le SMI. L'accreditamento è valido per tre anni dal Luglio 2011. L'accreditamento è riferito alle linee guida emanate dall'Ottobre 2009 che utilizzano le procedure descritte nella HPA's Standard Operating Procedure SW3036 (2009) versione 6. Informazioni più dettagliate sull'accreditamento sono disponibili al sito www.evidence.nhs.uk

Tabella delle modifiche

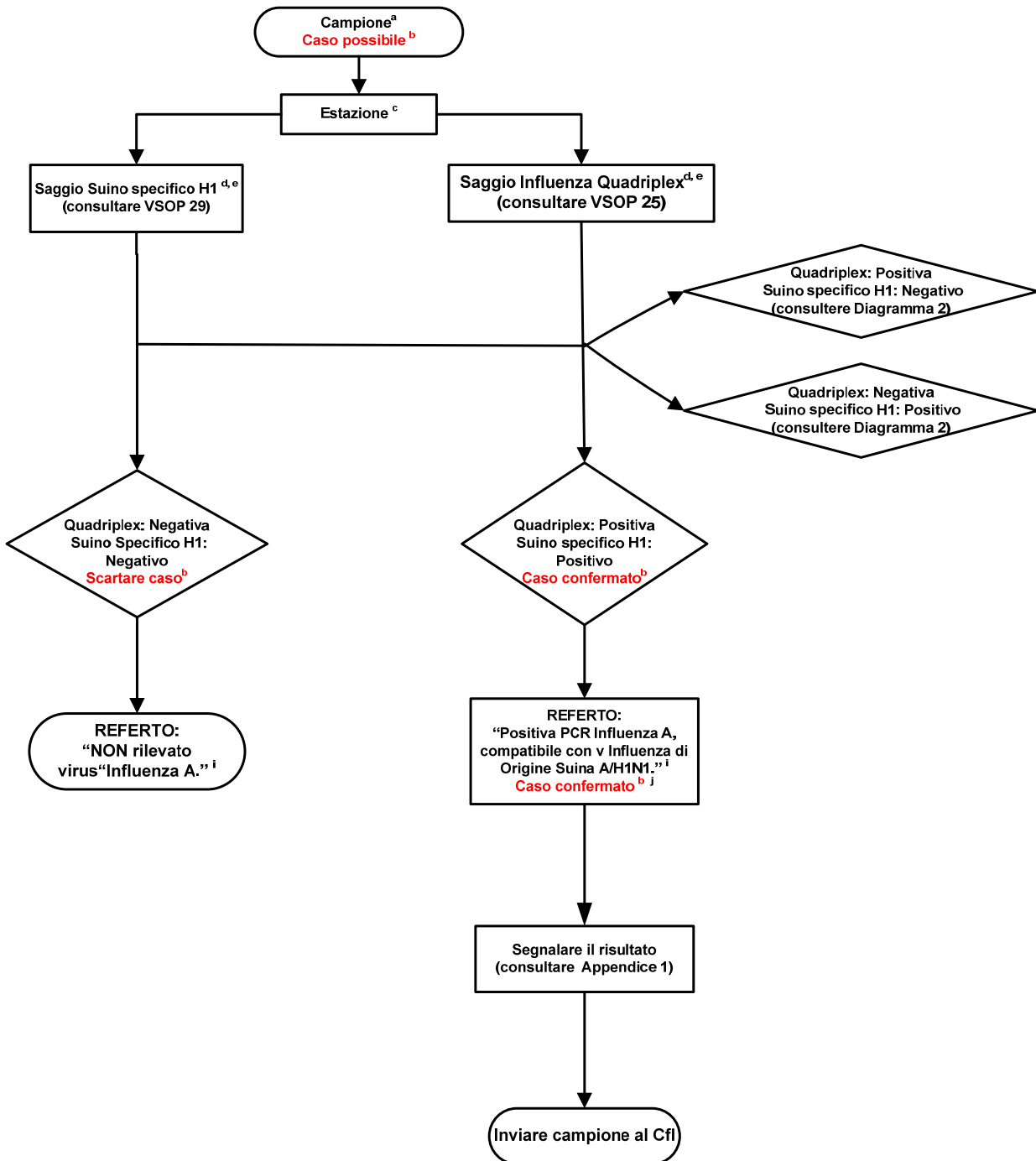
Ciascun documento controllato possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso la standards@hpa.org.uk.

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

Modifica No/Data.	2/02.11.11
Emissione inserita no.	1.1
Emissione eliminata. no	1.2
Sezione(i) interessate/Pagina no.	Modifica.
Documento intero .	Documento presentato in nuovo formato.
Bibliografia	Bibliografia in parte aggiornata.

Modifica No/Data.	1/19.06.09
Emissione inserita no.	1
Emissione eliminata. no	1.1
Sezione(i) Interessate	Modifica.
Diagramma 1	Rimozione inattivazione al calore dalla casella per estrazione e inserita nelle note a piè pagina..
Diagramma 2	Diagramma di flusso modificato per facilitare refertazione. Casella per referto positivo peri. H1 o H3 modificata per segnalare la tipizzazione antigenica.
Note a piè pagina c.	Aggiunta richiesta di conservare aliquote dei campioni.
Nota a piè pagina m.	Aggiunta nota m a piè pagina.
Appendice 2	Aggiunte Appendice 2 e tabella.

Diagramma 1: Ricerca di V. INFLUENZA A H1N1 di Origine Suina con Saggio PCR Quadriplex con Influenza A H1 di origine Suina e saggi N1²



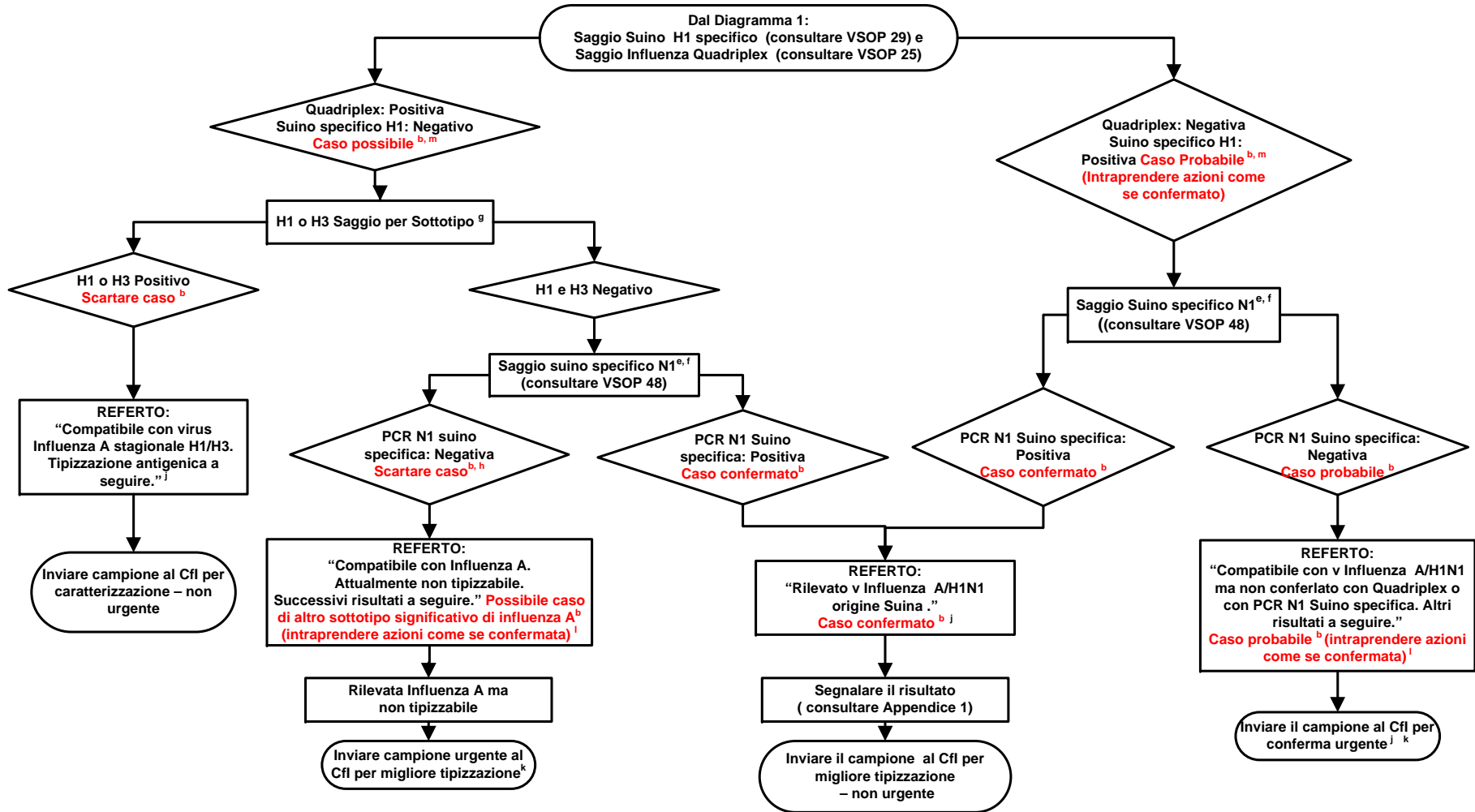
NB: Cambi degli algoritmi secondo le specifiche delle Autorità di Gestione

Irlanda del Nord: Userà di Screening una prova con Matrice proteica invece del saggio Quadriplex. Oltre al saggio specifico per il suino della HPA eseguono anche quello del CDC.

Edinburgo e Glasgow: Invece del saggio Quadriplex useranno una PCR multipla con Matrice genetica. Utilizzeranno un saggio suino specifico 'Dublin', quello suino specifico del Cfl sarà usato come accertamento specifico di secondo livello.

Galles: Useranno il saggio NASBA flu A e per conferma i saggi Suino specifici del CDC e dell'HPA.

Diagramma 2:



NB: Cambi degli algoritmi secondo le specifiche delle Autorità di Gestione

Irlanda del Nord: Userà di Screening una prova con Matrice proteica invece del saggio Quadriplex. Oltre al saggio specifico per il suino della HPA eseguono anche quello del CDC.

Edinburgo e Glasgow: Invece del saggio Quadriplex useranno una PCR multipla con Matrice genetica. Utilizzeranno un saggio suino specifico 'Dublin', quello suino specifico del Cfl sarà usato come accertamento specifico di secondo livello.

Galles: Useranno il saggio NASBA flu A e per conferma i saggi Suino specifici del CDC e dell'HPA.

Note e piè pagina

- a) I campioni devono essere prelevati ed inviati al laboratorio con confezionamento appropriato (confezionamento di classe B). I campioni sono di solito tamponi di tipo combinato nasale e faringeo, inseriti in terreno di trasporto per virus. (consultare linea guida HPA per la raccolta del campione e trasporto 'Standard practical advice for investigating individuals with possible swine influenza infection' disponibile sul sito web www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1241048770758) I campioni devono essere inviati ai laboratori designati con corriere qualificato. In laboratorio i campioni devono essere manipolati come quelli appartenenti al Gruppo di Rischio 2, diversamente da quelli che provengono da soggetti con Infezione nota; in questo caso devono essere manipolati in Cabine di Sicurezza Biologica di Classe 1 o Classe 2 in un laboratorio di Categoria 2 (o in Categoria di contenimento 3, se si tratta di campioni liquidi quali l'espettorato o aspirato naso faringeo)¹.
- b) Questo algoritmo si riferisce alla ricerca ove la definizione del caso è compatibile o è stata iniziata la sorveglianza per influenza A/H1N1 di origine suina. Le definizioni di caso sono disponibili presso l'HPA come Swine Influenza case definition' al sito www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1241048739571. Le definizioni possono essere modificate, facendo riferimento a quanto esposto in precedenza e agli ultimi algoritmi proposti. S6a (http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1240732819361) e S6b (http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1244023923195) consultabili sul sito web dell'HPA.
- c) Una parte del campione deve essere inattivata a 80°C per 20 minuti. Una parte deve essere conservata per successiva caratterizzazione presso il Cfl comprendente la coltura, qualora le prove iniziali del RMN risultino positive.
- d) Swine-Lineage Influenza A H1 Specific Fast Real Time PCR – consultare V29 – Swine-Lineage Influenza A H1 specific fast Real Time PCR, (disponibile con password o su richiesta al sito www.hpa-standardmethods.org.uk). Notare che il saggio è validato per l'estrazione con Qiagen QIAamp® Viral RNA Mini confezione o Biomerieux NucliSENS® easy MAG
Real-time Influenza Quadriplex assay - consultare [V 25 - Real-Time Quadriplex PCR for the detection of Influenza](#) o simili matrici generiche per influenza A per saggio di amplificazione dell'acido nucleico.
- e) Notare che il controllo usato nella real time PCR è geneticamente diverso dal controllo positivo del virus (A/Aragon/3218/2008); I falsi positive conseguenti a contaminazione con questo virus possono essere rapidamente differenziati dai veri positivi con il sequenziamento..
- f) [Swine-lineage influenza A N1 real time confirmatory PCR assay](#) -- consultare V 48 (disponibile ai possessori di password o su richiesta al sito web www.hpa-standardmethods.org.uk) o saggi con matrice simile per amplificazione dell'acido nucleico dell'influenza A.
- g) Saggio One-Step Influenza Multiplex Real Time RT-PCR (Influenza A H1H3 Subtype assay) – consultare VSOP 50 (disponibile per possessori di password o su richiesta sul sito web www.hpastandardmethods.org.uk).
- h) Organizzare il trasporto urgente di campione CFI per la caratterizzazione come questo profilo potrebbe essere compatibile con l'influenza aviaria (o umana H2). Considerare la possibilità di falsi negativi a saggi specifici per H1 di origine suina e ripetere, interpretare alla luce dei risultati delle prove ripetute. Se il risultato non sarà ripetuto, attendere i risultati del Cfl
- i) Considerare l'aggiunta di un commento quale: 'Un risultato PCR negativo non esclude necessariamente l'infezione da virus Influenza A (H1N1) d'origine Suina'. Le prove possono essere falsamente negative se: (i).I campioni sono stati prelevati con tamponi o inseriti in terreno di trasporto non idoneo; (ii). I campioni sono stati prelevati in modo non adeguato (consultare le linee guida per il campionamento alla nota a piè pagina b); (iii). I campioni sono

Ricerche di V. Influenza A H1N1 di Origine Suina con Saggio PCR Quadriplex Influenza A associato a Influenza A H1 di Origine Suina e al Saggio N1

stati prelevati troppo precocemente nel periodo d'incubazione o tardivamente durante il periodo di ricovero

- j Informare dei risultati positivi il Cfl (OpsRoom), HPU e CDSC tramite fax o e-mail riservata
- k Le disposizioni vigenti suggeriscono d'inviare i campioni per la conferma il più rapidamente possibile al Cfl (Respiratory Virus Unit, Virus Reference Department, HPA, Cfl, Colindale, London, NW9 5HT. Telefono 020 8327 6239. Ulteriori prove di conferma possono includere il sequenziamento.
- l Prevedere il trasporto urgente del campione al Cfl per la caratterizzazione del campione. Considerare la possibilità di saggi Quadriplex o N1 suinospecifici falsamente negativi, o saggi suino specifici H1 falsamente positivi, interpretando in funzione dei risultati dei campioni ripetuti..
- m) Refertare in questa fase solo se si prevedono significativi ritardi delle prove successive – consultare Appendice 2

Notifica alla HPA ^{2,3}

Le Norme di Denuncia di Denuncia della Health Protection Agency del 2010 richiedono ai laboratori diagnostici di comunicare all'Health Protection Agency (HPA) 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 HPA. 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'iniezione imputabili ad agenti causali soggetti a tale disposizione.

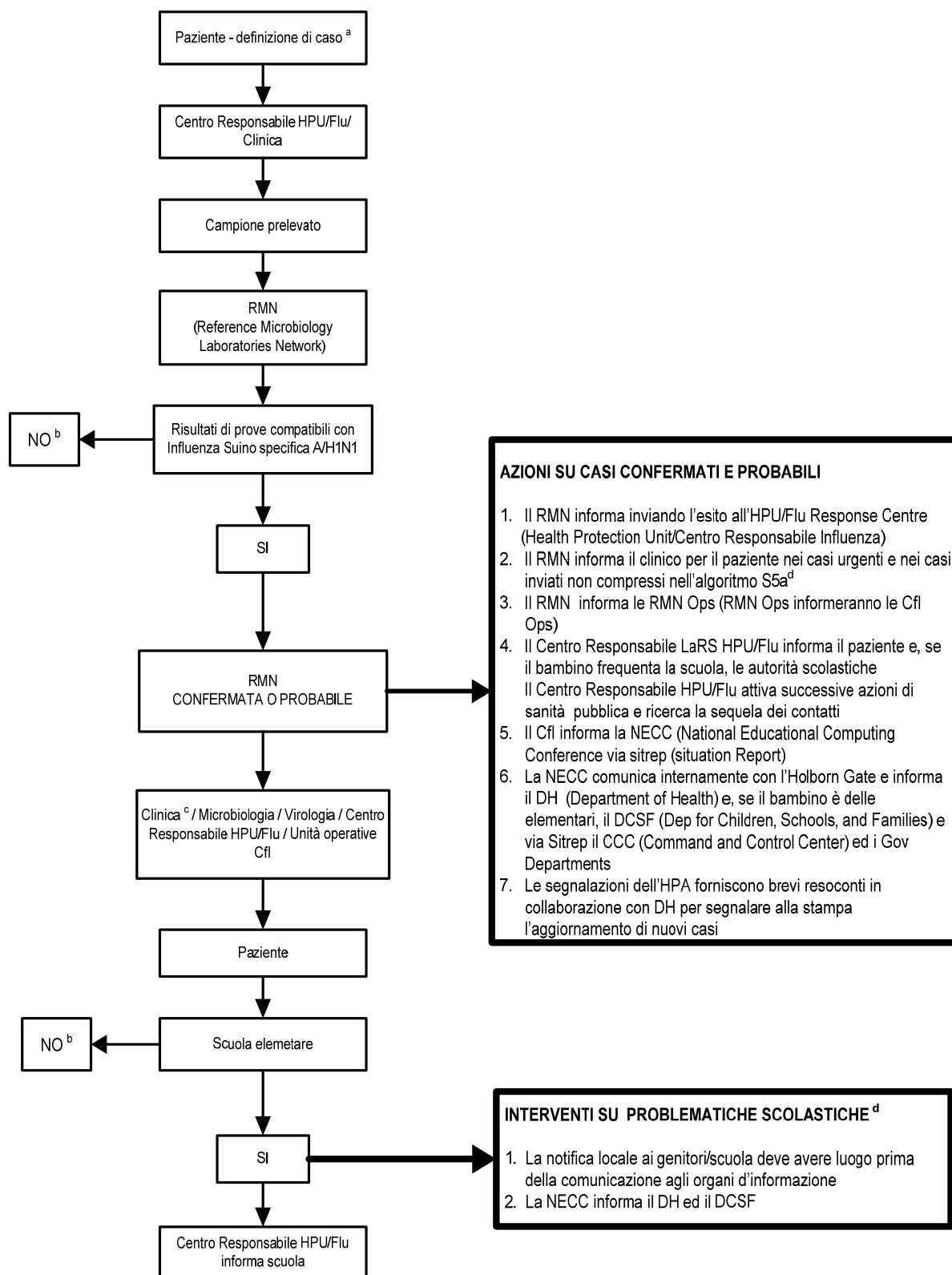
La denuncia secondo la Direttiva dell'Health Protection (Notification) Regulations 2010 non sostituisce l'informazione volontaria all'HPA. La maggior parte dei laboratori NHS segnala spontaneamente all'HPA gran parte delle diagnosi di laboratorio sostenute da agenti causali e molte sezioni dell'HPA hanno 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 Scozia⁴ e Galles⁵ sono vigenti altre disposizioni.

Come da accordi intercorsi con la Health Protection Agency, la presente traduzione è a cura del Dott. Roberto Rescaldani, già Direttore del Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Ospedale Universitario San Gerardo dei Tintori di Monza.

Appendice 1 – Gestione dei casi confermati e Probabili



Appendice 2: Matrice Refertazione per V. Influenza A/ H1N1 di Origine Suina

Profilo	Sequenza Prove (da sinistra a destra)					Referto	Azione
	Quadriplex (Matrice)	Suino H1	Suino N1	Sottotipo H1H3	Ripetere Suino H1		
1	Negativa	Negativo				NON rilevato virus Influenza A	Nessuna
2	Positiva	Positivo				PCR POSITIVA per virus Influenza A compatibile con virus Influenza A/H1N1 di origine Suina. Caso confermato.	Comunicare il risultato. Inviare campione al CfL
3*	Positiva	Negativo				PCR POSITIVA per virus Influenza A Caso possibile. Referto successivo a seguire	Comunicare il risultato. Accertamento locale successivo
4	Positiva	Negativo		Positivo		PCR POSITIVA per virus Influenza A compatibile con virus Influenzale stagionale H1/H3 Influenza A. Influenza V. A/H1N1vdi origine suina NON rilevato. Risultati successivi a seguire.	Comunicare il risultato. Inviare campione al CfL
5	Positiva	Negativo	Positivo	Negativo		PCR POSITIVA per virus Influenza A. RILEVATA Influenza A/H1N1 di origine suina. Caso confermato	Comunicare il risultato. Inviare campione al CfL
6		Negativo	Negativo	Negativo		PCR POSITIVA per virus Influenza A compatibile con virus Influenza A. Non attualmente tipizzabile. NON rilevato virus Influenza A/H1N1 di origine suina. Possibile caso da altri virus significativi di sottotipi di Influenza A. Risultati successivi a seguire	Comunicare risultato. Inviare URGENTEMENTE campione al CfL
7*	Negativa	Positivo				PCR POSITIVA per virus Influenza A compatibile con virus Influenza A/H1N1di origine Suina. Caso probabile. Referto successivo a seguire	Comunicare il risultato. Accertamento locale successivo
8	Negativa	Positivo	Positivo			PCR POSITIVA per virus Influenza A. RILEVATO v. Influenza A/H1N1 di origine Suina. Caso confermato.	Comunicare il risultato Inviare campione al CfL

--	--	--	--	--	--	--	--

Ricerche di V. Influenza A H1N1 di Origine Suina con Saggio PCR Quadriplex Influenza A associato a Influenza A H1 di Origine Suina e al Saggio N1

9	Negativa	Positivo	Negativo		Nota a piè pagina "I"	Risultati PCR compatibili per V Influenza A/H1N1 di Origine Suina, ma non confermati da Quadriplex o da PCR N1 Suino specifica. Caso probabile di influenza di origine suina. Successivi risultati a seguire	Comunicare il risultato Inviare URGENTEMENTE il campione al Cfl
---	----------	----------	----------	--	-----------------------	--	--

Nota a piè pagina

^I Predisporre il trasporto urgente del campione al Cfl per conferma. Considerare la possibilità di risultati falsi negativi con Quadriplex o per saggio N1 suino specifico o falsi positivi con saggio H1 specifico suino, e ripetere; interpretare in funzione dei risultati delle prove ripetute

* Questi devono essere refertati come risultati provvisori solo se le prove per N1 o H1H3 si prevede siano ottenibili con ritardi significativi.

Bibliografia

1. Advice on working with influenza viruses. <http://www.hse.gov.uk/biosafety/diseases/pandflu.htm>. p. 1-6.
2. Health Protection Agency. Laboratory Reporting to the Health Protection Agency: Guide for Diagnostic Laboratories. 2008.
3. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance 2010. http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH_114510. p. 1-112.
4. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act 2008. <http://www.scotland.gov.uk/Topics/Health/NHS-Scotland/publicact/Implementation/Timetable3333/Part2Guidance/Q/EditMode/on/ForceUpdate/on>.
5. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance 2010. <http://wales.gov.uk/docs/phhs/publications/100716ahealthprotguidanceen.pdf>.