

Il campione per esame virologico: raccolta, trasporto e conservazione

Paola Martelli

*Struttura Operativa Semplice di Immunologia clinica e Virologia
Azienda Ospedaliera Santa Maria degli Angeli - 33170 Pordenone*

INTRODUZIONE

Forse niente è importante, in termini di efficacia delle indagini microbiologiche in generale e virologiche in particolare, quanto la scelta corretta del tipo di campione da analizzare, del momento e del modo in cui viene raccolto, trasportato ed eventualmente conservato. Il successo delle procedure diagnostiche è legato indissolubilmente alla qualità del materiale ottenuto e alla consapevolezza che tale qualità deve essere manenuta il più possibile invariata durante le varie fasi del lavoro successivo al prelievo (1, 2, 7, 8, 10).

A proposito di qualità del campione ricordiamo cosa indica, tra l'altro, il termine stesso: una o più parti prelevate da un sistema progettate per dare informazioni sull'intero sistema stesso. Quindi un buon campione per definizione dovrebbe essere scelto in modo da rappresentare il fenomeno che intendo studiare. Scendendo nel caso della virologia un campione adeguato dovrebbe essere tale da fornire indicazioni più esaurienti possibile sull'infezione e sul processo patologico in atto.

Il buon esito della diagnosi di laboratorio perciò dipende da un prelievo che non può essere casuale e richiede da un lato un background di conoscenze sulle malattie virali e loro patogenesi, sui possibili agenti eziologici in gioco e sulla modalità ottimali per la loro ricerca, e dall'altro l'acquisizione volta per volta di informazioni specifiche sul quadro clinico e sullo stadio di infezione, sull'età, sulle altre caratteristiche del paziente (provenienza, viaggi, abitudini particolari ecc... tra le quali non ultima l'immunocompetenza) (7, 8).

Due perciò sono le colonne portanti per poter impostare adeguatamente le ricerche virali: cultura ed esperienza acquisite nel tempo e informazioni ottenute caso per caso dalla collaborazione con il Curante (2, 5, 7, 8, 10).

Prima di affrontare in modo più specifico l'argomento vale la pena sottolineare due aspetti importanti e peculiari:

Primo: i virus sono microrganismi intracellulari che richiedono cellule metabolicamente attive per una replicazione efficiente. Non appena prelevati questa cessa e il contenuto virale del campione rischia di impoverirsi e scendere in tempi brevi al di sotto dei limiti di evidenziazione. Maggiore saranno qualità del prelievo (=carica virale) e

accuratezza dei successivi passaggi, maggiore sarà la probabilità di persistenza di livelli virali evidenziabili (1, 2, 7).

Secondo: esistono sistemi diagnostici diversi. Oltre alle tecniche di biologia molecolare, tre infatti sono gli approcci fondamentali: 1) isolamento in colture cellulare, poco frequentemente in animali e in uova; 2) ricerca dirette di particelle virali, con microscopia elettronica, o di antigeni virali; 3) indagine sierologia per evidenziare la risposta immune specifica. Molte volte uno solo di essi non soddisfa la necessità del laboratorio di un referto più esaustivo possibile e si può rendere necessario utilizzarne più di uno e bisogna prevedere questa possibilità. Ogni laboratorio deve quindi adattare i metodi di raccolta e preparazione dei campioni per ottimizzare la resa virale in relazione alle diverse strategie diagnostiche in uso (1, 2, 7, 8, 10).

Elementi fondamentali nello stabilire i corretti protocolli, che dovranno essere poi chiaramente comunicati anche ai responsabili dei prelievi, sono: 1) il momento in cui ottenere il materiale biologico (tempi); 2) il tipo di materiale e il sito anatomico da cui prelevare; 3) la modalità corretta per compiere questa operazione; 4) gli strumenti necessari; 5) i contenitori adeguati; 6) il trasporto e la conservazione idonei. Questi elementi sono strettamente correlati fra di loro e si condizionano a vicenda e, soprattutto, sono correlati all'agente patogeno ricercato e alle procedure diagnostiche previste (2, 5, 10, 12).

I tempi

In generale dovrebbero essere quanto più tempestivi possibile rispetto all'esordio dei sintomi, sia che siano previste colture o metodi non colturali sia nel caso del prelievo ematico per anticorpi della fase acuta, importanti per poter stabilire il background immunologico del paziente.

I fattori che condizionano i tempi sono l'agente sospettato, il materiale che posso o intendo prelevare e il metodo diagnostico previsto. Ad esempio il virus della parotite può essere rinvenuto nella saliva parecchi giorni prima e fino a cinque dopo l'esordio, quattordici giorni e oltre dopo l'esordio se utilizzo l'urina (14). Il virus della varicella

zoster (VZV) è isolabile al massimo per 3-4 giorni nel liquido di bolla, anche successivamente se ricorro a microscopia elettronica o PCR (3). L'importanza di un campionamento precoce non solo è dovuta al fatto che quanto più si è tempestivi tanto più è alta la probabilità di successo per la maggiore carica virale, ma anche alla possibilità il tempo condiziona la corretta interpretazione del risultato. Esempio tipico è la viruria da eseguirsi nei primi quindici-ventuno giorni dopo la nascita per poter differenziare fra infezione congenita e perinatale da CMV (4).

Per semplificare comunque indicazioni ottimali e generali possono essere: tre, quattro giorni dall'esordio e massimo 24 ore per i materiali post mortem. Una delle eccezioni che merita menzione per l'attualità dell'infezione è la SARS nel corso della quale è stato chiaramente dimostrato che l'escrezione del Coronavirus aumenta nel tempo fino a raggiungere il massimo nel corso della seconda settimana di malattia (6, 11).

Per quanto riguarda la ricerca degli anticorpi è consigliabile sempre un secondo prelievo per verificare la dinamica della risposta immune in genere dopo una-due settimane, anche se talvolta la presenza di IgM può già indirizzare la diagnosi al primo campionamento. Se viene richiesta l'indagine su liquor deve essere sempre associata a quella su siero (7, 8, 13).

Sito di prelievo e tipo di materiale biologico, modalità e contenitori

A riconoscere l'organo bersaglio e a capire cosa e come raccogliere ci guidano i sintomi e i segni come pure ci aiutano la conoscenza della patogenesi, la storia naturale dell'infezione. Se infatti è chiaro per esempio che in caso di meningocefalite il liquido cefalo rachidiano potrebbe rappresentare il materiale idoneo come in caso di gastroenteriti lo possono essere le feci, meno immediato è l'utilizzo del campione di urine in caso di parotite o di infezione da CMV.

Modalità e contenitori specifici sono diretta conseguenza di sito, materiale e sistemi diagnostici (tabelle dalla 1 alla 3). Dal punto di vista pratico è utile distinguere materiali contaminati (esempio feci) e no (esempio liquido cefalorachidiano) da un lato e suscettibilità all'essiccamento (esempio tampone faringeo) e no (esempio urine).

Premessa importante alla raccolta è che una volta deciso che il prelievo deve essere fatto si deve procedere in modo deciso, anche se la procedura risulta fastidiosa, chiarendo magari in precedenza al paziente e ai parenti cosa sarà fatto (7).

Nelle tabelle dal numero 1 al 2 sono schematizzati il campione e modalità di raccolta per la coltura. Le stesse informazioni sono indicate nelle

tabella 3 per i metodi non colturali.

In generale, per quanto riguarda gli strumenti per il prelievo ambulatoriale è necessario disporre in ambulatori di bisturi, speculum, siringhe da insulina, cateteri per prelievo rinofaringeo, set per prelievo ematici, tamponi adeguati. Materiali per rachicentesi o pompe per prelievo dalle vie respiratorie sono invece più comunemente dotazione dei reparti specializzati.

Per quanto riguarda i tamponi in particolare è conveniente escludere l'alginato di calcio, che può diminuire l'infettività di HSV, virus con capsidi e *Chlamydiae* e il legno che può risultare tossico per colture cellulari per la possibile presenza di tossine e formaldeide (5, 7). Lo stelo può essere in materiale plastico o alluminio, rigido o flessibile e di diametro diverso a secondo degli usi. La punta può essere di dacron, rayon, poliestere e cotone (2, 5, 7, 9, 10).

È necessario di riporre di vetrini puliti (trattati in acetone/etanolo) con adeguato contenitore per il trasporto (a libro, vaschetta o almeno piastra di Petri in materiale plastico sigillata con scotch). Sono utilizzabili anche vetrini ricoperti di teflon con pozzetto centrale già pronti all'uso.

Per quanto riguarda i contenitori devono essere adeguati al prelievo e consentire una raccolta agevole quindi è meglio prevedere una rosa di possibilità: esempio provette da 15 ml e provettoni da 50 ml con tappo a vite, ma anche provette più piccole (1-2 ml circa), contenitori per urino - colture con tappo a vite. I contenitori devono essere preferibilmente sterili, inerti, non rilasciare sostanze tossiche o comunque interferenti, resistenti al congelamento $\leq 70^{\circ}\text{C}$ anche rapido. A prova di spandimento e di rottura. In caso di sistemi non colturali commerciali, vanno usati i materiali forniti o indicati dalla ditta. Nel caso i materiali (esempio prelievi con tamponi) siano suscettibili di disidratazione i contenitori devono contenere un adeguato medium di trasporto (VTM), la cui funzione o oltre a prevenire appunto l'essiccamento è quello di stabilizzare i virus e mantenerne il più possibile la vitalità e ritardare, in caso di materiale contaminato, la crescita di batteri (2, 5, 7, 9, 10).

Esistono varie formulazioni da preparare in casa e commerciali, in alcuni casi sono disponibili kit completi per la raccolta e il trasporto (5). Per i VTM in genere viene utilizzata una fonte proteica (BSA, gelatina), un antifungino e un antibiotico in tampone. MEM o HANKS' BSS +SBA/FBS /gelatina p più streptomina, penicillina, neomicina, vancomicina- fungizone, nistatina. I medium comunemente usati per la *Chlamydiae* (2SP o 4SP) vanno bene. Importante è utilizzarne piccoli volumi (2-3 ml) per evitare l'eccessiva diluizione,

volumi maggiori in genere posso non essere necessari solo per tessuti (5-7 ml). In condizioni particolari può essere usata soluzione fisiologica meglio TSB. Non dovrebbero essere usati i tamponi con terreno di trasporto per batteri (Stuart, Amies), il materiale può comunque essere recuperato ma la resa è di solito inferiore in particolare se presente charcoal per la possibile inattivazione virale. I liquidi non devono essere posti in VTM che oltre a essere superfluo (molti sono sterile e hanno un contenuto proteico sufficiente a stabilizzare i virus) ha un effetto di diluizione (2, 5, 7, 9, 10).

Il prelievo per indagini sierologiche va eseguito in provette senza anticoagulanti e senza conservante, anche se per alcuni sistemi è consentito l'utilizzo di plasma. In genere conviene comunque seguire le indicazioni fornite dalla Ditta produttrice dei kit usati.

Trasporto e conservazione

Sistemi colturali: l'invio al Laboratorio deve essere quanto più tempestivo possibile, alcuni materiali come il liquor non dovrebbero essere trattiene assolutamente in reparto. Se non è immediato l'invio, i campioni vanno refrigerati a 4°C, con eccezione del sangue fluido che va refrigerato o meno a seconda del sistema di separazione delle cellule (2, 5, 7, 9).

Il trasporto deve essere fatto in contenitori refrigerati, (thermos con ghiaccio, scatole di polistirolo con siberini non a diretto contatto con i campioni) in caso di virus labili (es RSV) se è indispensabile un tragitto molto lungo il campione dovrebbe essere inviato in ghiaccio secco.

Una volta in laboratorio, gran parte dei virus resistono 1-3 giorni a temperature fra 2 e 8°C, tuttavia è meglio seminare subito e conservare a -70°C il residuo. Virus labili (RSV) dovrebbero essere congelati rapidamente in ghiaccio secco e acetone. L'utilizzo di 2SP con il 10% di sieroalbumina fetale e 10% di dimetil solfossido può aiutare ulteriormente la stabilità. Il congelamento a -20°C non deve mai essere fatto in quanto risulta estremamente dannoso (2, 5, 7, 9, 10).

Sistemi non colturali: durata del trasporto e T di conservazione non sono così stringenti come per le procedure colturali, ma vanno comunque osservate alcune regole: per i trasporti brevi in genere non serve refrigerazione, una volta in laboratorio gli antigeni generalmente resistono almeno 24-48h a 2-8°C, per tempi più lunghi possono essere conservati a temperature ≤20°C. Nel caso di utilizzo di sistemi commerciali si devono seguire le indicazioni fornite dalla ditta produttrice (2, 5, 7, 9).

Prelievo ematico per indagini sierologiche: le provette vanno tenute a temperatura ambiente, lascia-

te coagulare. Mai congelate! In laboratorio vanno sierate al più presto e il siero va conservato per qualche giorno a temperatura fra 2 e 8°C per più di una settimana è conveniente congelare a -20°C, salvo indicazioni specifiche diverse delle Ditta produttrici dei sistemi diagnostici in uso.

Ricordare che non è indispensabile il trasporto refrigerato, se è previsto però un tragitto lungo è consigliabile spedire sieri piuttosto che sangue intero che potrebbe emolizzare. Gli anticorpi sono resistenti ma bisogna fare attenzione per evitare la contaminazione batterica del sangue e l'emolisi che si può verificare facilmente per motivi diversi (7).

I trasporti interni ed esterni all'Ospedale e la spedizione dei campioni vanno fatta negli adeguati contenitori e imballi nel rispetto delle norme di sicurezza.

Valutazione dell'appropriatezza e criteri di non accettabilità

È responsabilità del laboratorio stabilire i criteri di accettabilità dei campioni e le linee guida per rifiutarli. Queste devono essere chiaramente comunicate e spiegate ai responsabili dei prelievi. Non appena il campione perviene al laboratorio deve essere verificato che quanto previsto sia rispettato pienamente. In particolare va controllato:

- 1) La corretta identificazione del campione (dati anagrafici, provenienza, data, tipo di campione ecc)
- 2) La scheda con dati anagrafici, clinici -anamnestici e il medico richiedente (come preventivamente concordata).
- 3) Il contenitore: adeguatezza; integrità, tenuta, contaminazione esterna.
- 4) Il trasporto: contenitori, temperatura e tempi
- 5) Il campione e la sua congruenza e quantità sufficiente per la ricerca virale richiesta, nonché la contaminazione batterica o con altri materiali (esempio liquor-sangue, urine-feci, sperma-urine ecc). In caso di siero l'emolisi, la torbidità.

Una volta verificata una qualsiasi congruenza va annotata in appositi registri e notificata immediatamente al responsabile del prelievo.

Nel caso il campione non risponda ai requisiti richiesti preventivamente indicati ai prelevatori, comunicare e motivare il rifiuto del campione tempestivamente ai prelevatori preferibilmente in modo scritto.

È importante prevedere tre possibili percorsi

- 1) Inadeguatezza grave e irrimediabile: rifiuto.
- 2) Campione adeguato: accettazione.
- 3) Se l'inadeguatezza non compromette inequivocabilmente il percorso diagnostico o è in parte rimediabile, in relazione anche alla preziosità o unicità del campione il percorso analitico può

partire accettando il campione con riserva, notificando immediatamente il problema rilevato al Prelevatore e prevedendo un'ulteriore nota in calce al referto definitivo (2, 5).

Conclusioni

Il campione ben raccolto rappresenta uno scrigno ricco di preziose informazioni che noi abbiamo l'obbligo di conservare e sfruttare al meglio. Pur tenendo conto delle diverse caratteristiche di virus e sistemi diagnostici, sono necessarie dei protocolli che pur prevedendo la massima parte delle

possibili richieste siano semplici e non complicano senza ragione precisa il lavoro. È consigliabile scegliere le condizioni ottimali inoltre che permettano in un secondo tempo, se necessario, di variare il percorso diagnostico: esempio passare da una indagine colturale a una di tecnica di amplificazione. Nelle tabelle 4, 5, 6 sono pertanto riassunte regole estremamente semplificate che possono aiutare a raggiungere questo target e per trasporto e conservazione e per accettazione del campione.

Tabella 1. Sono schematizzati campioni (non liquidi) dai tratti gastroenterici , genitourinari, da cute e mucose , modalità di raccolta e virus più comunemente ricercati . I materiali prelevati con tampone devono essere immediatamente stemperati in adeguato VTM (2, 5, 7, 8, 9, 10).

Campione per coltura	Modi di raccolta	Virus	Note
Gastrointestinali	Tampone rettale: inserire 4-6 cm nel retto, ruotare , stemperare in VTM Feci 2-3 g (2 -3 cucchiani da te) in contenitore steriles (VTM solo se trasporto non immediato e rischio di essiccamento)	Adeno, Entero, HSV Adeno, Entero, Corona.	Proctite . Per gastroenteriti non equivalente a feci in quanto a resa virale
Genitourinari	T. Cervicali (inserire a 1 cm, ruotare 10 sec) T.Vulvare T.Uretrale (2-4cm)	HSV, CMV, Adeno HSV HSV, Adeno	Eliminare prima il muco Non far urinare per almeno 1 h prima
Lesioni delle mucose	Tampone strofinato sulla lesione	Orali: Coxsackie A., HSV Anogenitali: HSV	
Lesioni cute	Vescicola fresca: lavare con fisiologica, rompere, raccogliere liquido e cellule della base con tampone. Se non vescicole, inumidire tampone con fisiologica e strofinare o rompere la superficie della lesione e prelevare dalla base con tampone umido o eseguire uno scraping .	Coxsackie A, Echo, HSV, VZV	Per VZV meglio aspirare liquido con siringa da insulina e sciacquare l'aghetto in VTM

Tabella 1a e 1b. Sono schematizzati campioni dalle vie respiratorie, modalità di raccolta e virus più comunemente ricercati . I materiali prelevati con tampone devono essere immediatamente stemperati in adeguato VTM. (2, 5, 6, 8, 9, 10, 11)

Campione da vie respiratorie	Modo di raccolta	Virus
Liquidi	In contenitore sterile	RESPIRATORI
Gargarizzato con 10 ml di VTM (TSB)	Raccolta non conveniente	Rinite : Rino, RSV, Influenza, Adeno , Entero, Reo, Corona Faringite : Parainfluenza, Influenza, HSV, CMV ,+ virus della rinite Laringotracheite : Parainfluenza ,Influenza , RSV Bronchite, Bronchiolite : RSV, Parai, Influenza
Lavaggio nasale Aspirato nasofaringeo	Instillare salina sterile nelle narici , raccolta facendo inclinare capo in avanti. Meglio dispositivi con catetere e pompa in particolare nei bambini per aspirato.	Polmonite: Influenza, RSV, Parainfluenza, Adeno, CMV, Morbillo, Varicella , Coronavirus Altri virus reperibili in vie respiratorie (prelievo rinofaringeo): Parotite Esantematici : Entero, Rosolia, Morbillo Sindromi posttrapianto :HSV,CMV Infezioni congenite : CMV, Rosolia, HSV, VZV
Lavaggio broncoalveolare., Aspirato endotracheale (8-10 ml) L.pleurico (2ml)		Note T.nasale indicato per Rhino T.rinofaringeo per Influenza., parainfluenza, RSV meglio del faringeo Per Coronavirus di SARS indicati campioni dalle basse vie

Tabella 1b.

CAMPIONE DA VIE RESPIRATORIE	Modo di raccolta	Virus
Tamponi (t) Nasale Rinofaringeo Orofaringeo	Non lasciare essiccare. Inserire un t. sottile flessibile per narice lasciare per qualche secondo, stemperare nello stesso VTM per entrambi T. sottile flessibile attraverso narice fino a rinofaringe. Ruotare e stemperare in VTM Tamponare vigorosamente tonsille e faringe posteriore. Usare abbassalingua per evitare di raccogliere saliva.	Vedi tabella 1a

Tabella 2a. Sono schematizzati i liquidi biologici più comunemente usati per la coltura virale (2, 5, 9, 10)

Campione per coltura : Liquidi	Modo di raccolta	Virus
CSF (2-5 ml)	Disinfezione con.tintura iodio 2%.In spazi intervertebrali L3- L4 o 4-5 . In contenitore sterile vuoto	Enterovirus, Mumps ; meno frequentemente isolati Arbo, HSV, LCML (difficile VZV, Morbillo meglio PCR)
Urine (10-20 ml mitto dimezzo)	In contenitore sterile (2-3 campioni sequenziali per CMV)	CMV (neonati), Adenovirus (uretriti, cistiti emorragiche), HSV(uretriti), Polyoma (BK cistite emorragica,) Rubella, Mumps
Liquido amniotico	Amniocentesi in contenitore sterile	CMV,Rubella
Liquido.pericardico (2 ml)	In contenitore sterile	Coxsackie B

Tabella 2b.

Campioni x coltura	Modo di raccolta	Virus
Mat.congiuntivale./corneale	Tamponare con t. sottile flessibile umido (fisiologica) cong. inferiore in VTM (prima eliminare muco)/ spatolato per cornea.	Congiuntiviti :e. Adeno, Enterovirus, Morbillo (Rosolia) Cheratocongiuntivite : Adeno , HSV,VZV Coriorenite : CMV
Tessuti	Biopsia in VTM Tess.autoptici (1-2 g) in VTM 8-10 ml	Patologia d'organo

Tabella 2c. Modalità per sangue e midollo (2, 4, 5, 6, 9, 10)

Campione per coltura	Modo di raccolta	Virus
Sangue (4-7 ml) *A (10 ml in leucopenici)	Prelievo in provette con anticoagulante EDTA (citrato, eparina)**.In alcuni casi serve siero o coagulo (previa disinfezione cute : ottimale alcol isopropilico 70 % + iodio 2%)	Comuni : CMV, HSV, Enterovirus nei neonati , Arbo Arenav., Retro., EBV
Midollo (2 ml)	Da cresta iliaca anteriore (bambini), posteriore, sterno, tibia (per età <18 mesi)	CMV

Note e commenti

- *Utile in infezioni persistenti e disseminate dei pazienti immunocompromessi
- **Anticoagulanti: EDTA, Eparina; Citrato . Meglio EDTA perchè 1) eparina da un lato è stato segnalato interferire con HSV e dall'altro non è indicata nel caso il campione si debba necessariamente utilizzare anche per biologia molecolare; 2) per CMV antigenemia sono indicate eparina e EDTA

Tabella 2c: modalità per sangue e midollo (2, 4, 5, 6, 9, 10)

Tabella 3. Indicazioni per metodi di virologia non colturale(2,7, 9).

Metodo	Virus	Campioni/modi di raccolta (vedi sempre eventuali indicazioni Ditte)
Evidenziazione AG con IF/ IE	Adeno ,CMV, HSV , Influenza, Para influenza, RSV, VZV, Morbillo, Parotite, Corona, Entero	Tamponi /scraping: in VTM o su vetrino (HSV e VZV) Aspirati e fluidi / tessuti Raccolta come coltura
EIA/Latex	Adeno, HSV , RSV, Astro Entero, Rota	Fluidi e Aspirati come coltura Feci in contenitore sterile o pulito asciutto Tamponi o scraping
EM	Rota, e agenti non coltivabili, Norwalk, Calici, Astro, Corona	Feci in contenitore sterile o pulito asciutto Altri materiali : vedicoltura

Tabella 4. Indicazioni di massima e semplificate per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei prelievi percoltura.

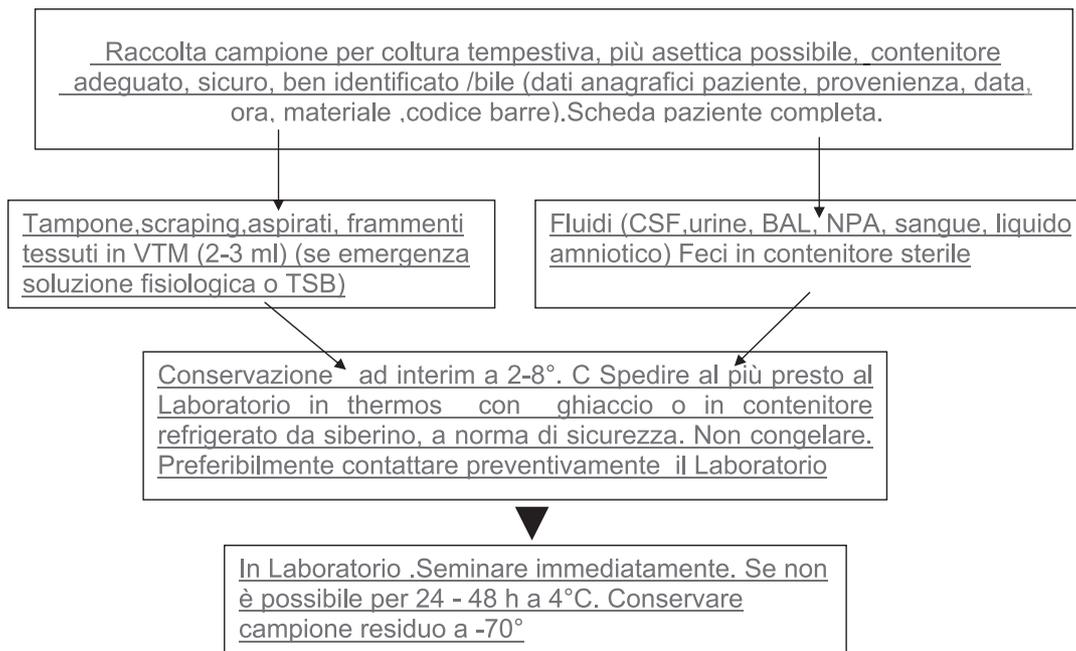


Tabella 5. Indicazioni di massima e semplificate per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei prelievi per metodi non colturali

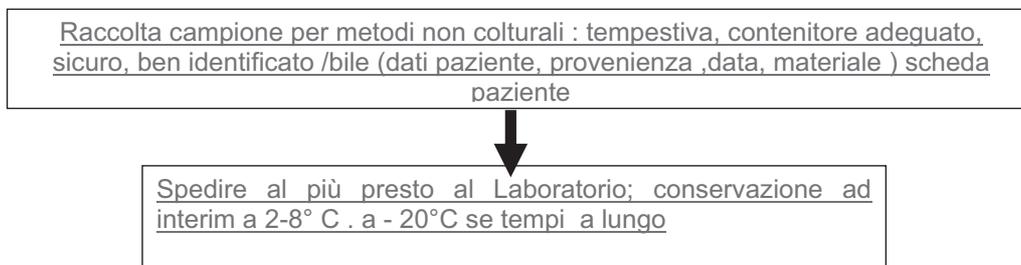
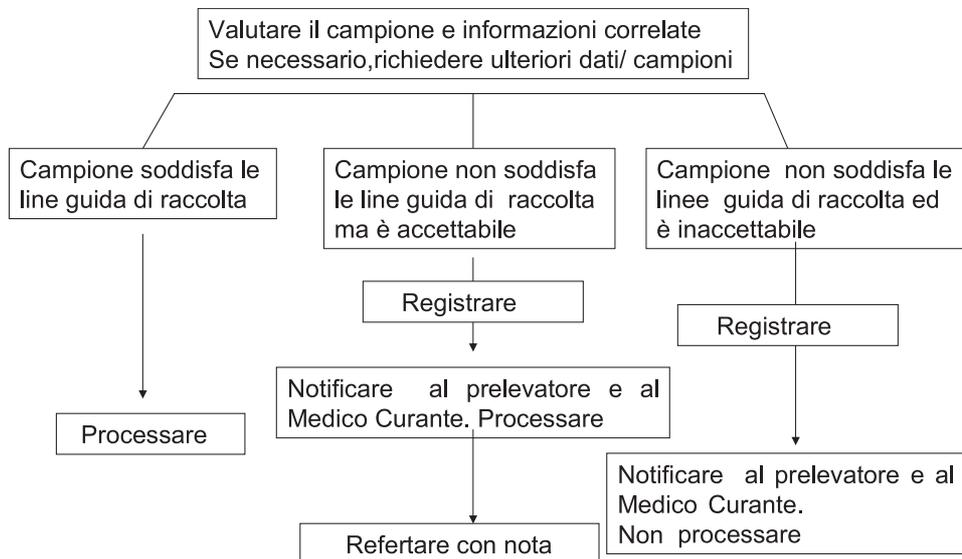


Tabella 6. Schema per la valutazione del campione , l'accettazione con o senza riserva il rifiuto



BIBLIOGRAFIA

1. Clarke LM. Laboratory diagnosis of Viral and Rickettsial Infection: Introduction in Clinical Microbiological procedures Handbook, HD. Isenberg, ASM 1992, Washington DC; Section 8.1
2. Forman M, Valsamakis A. Specimen, Collection, Transport and Processing in Virology in Manual of Clinical Microbiology, Murray PR, ASM, Washington DC 2003, 8th ed; 1227-1241.
3. Gershon AA, Larussa P, Steinberg SP. Varicella Zoster Virus in Manual of Clinical Microbiology, Murray PR, ASM, Washington DC 2003, 8th ed; 1313-1330.
4. Hodinka RL. Human CMV in Manual of Clinical Microbiology, Murray PR, ASM, Washington DC 2003, 8th ed; 1304-1318.
5. Leonard GP, Gleaves CA. Collection and Transport of specimen for Viral and Rickettsial cultures in Clinical Microbiological procedures Handbook, HD. Isenberg, ASM 1992, Washington DC; Section 8.2
6. Kamps-Hoffman SARS Reference – 10/2003 Sarsreference.com
7. Madeley CR, Lennette D, Halonen P. Specimen Collection and Trasport in laboratory diagnosis of infectious Diseases: Priciples and Practice, Balows A,

- Hausler WJ, Lennette EH. USA 1988; 1-11.
8. Mchintosh K. Diagnostic Virology in Fields Virology, Fields NF, Knipe M, Howoley PM Lippincot-Raven Philadelphia 1996; 401-403.
9. Miller JM, Holmes HT, Kusher K. General Principles of Specimen Collection and Handlig in Manual of Clinical Microbiology Murray PR, ASM, Washington DC 2003, 8th ed; 55-66.
10. Miller JM, Holmes HT. Specimen Collection, Transport and Storage in Manual of Clinical Microbiology, Murray PR, ASM, Washington DC 1999, 7th ed; 33-63.
11. Peiris JJ, Chu CM, Cheng VC et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of Coronavirus associated SARS *pneumoniae*: a prospective study. Lancet 2003b; 361: 1767-1772.
12. Reimer LG, Carroll KC. Procedure for the storage of Microorganism in Manual of Clinical Microbiology Murray PR, ASM, Washington DC 2003, 8th ed; 67-73.
13. Reiser BS, Woods FC, Thomson KB et al. Specimen processing in Manual of Clinical Microbiology Murray PR, ASM, Washington DC 1999, 7th ed; 64-104.
14. Wolinsky JS. Mumps Virus in in Fields Virology, Fields NF, Knipe M, Howoley PM. Lippincot-Raven Philadelphia 1996; 1243–1265.