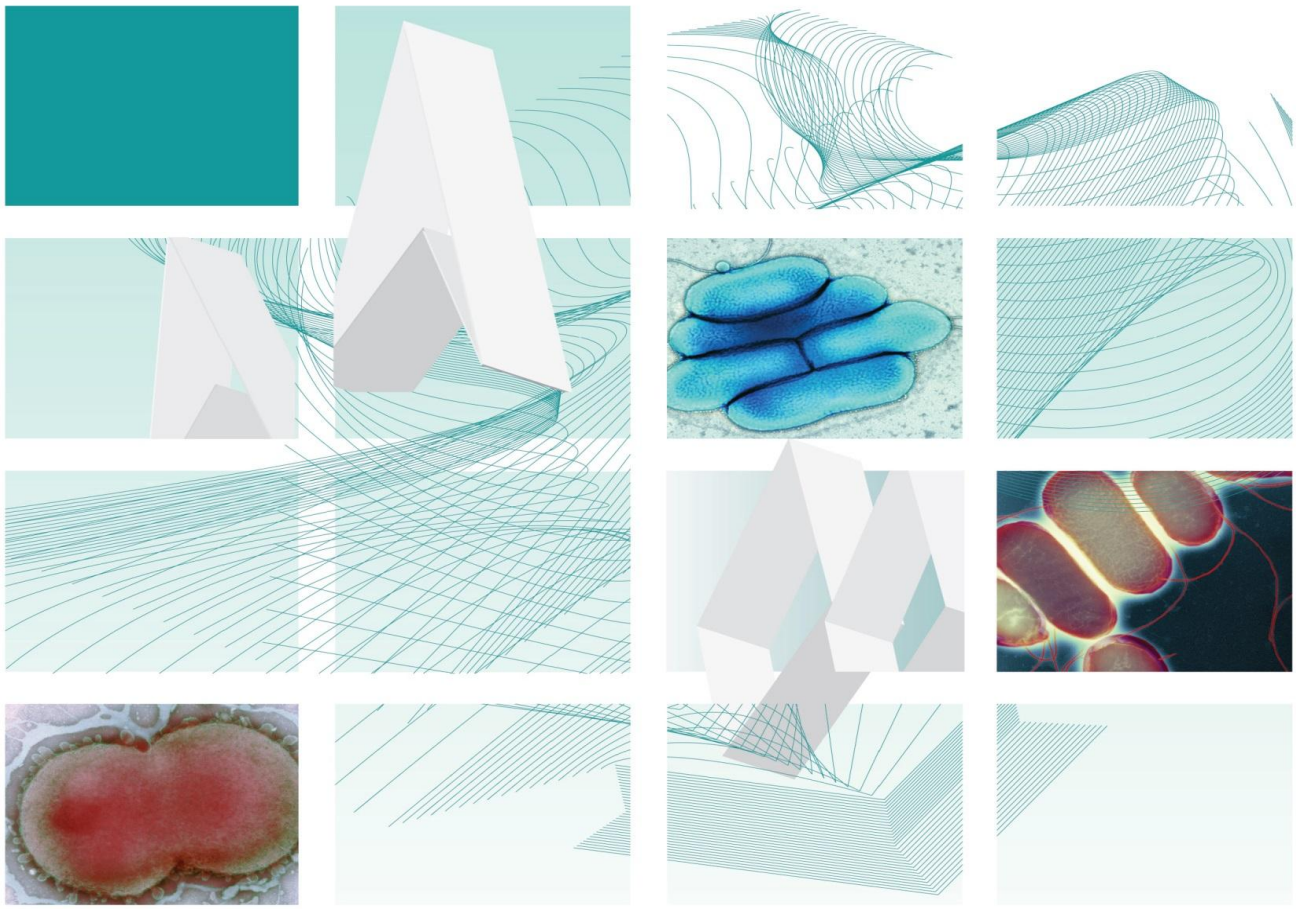
Public Health England

# Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

## Identificazione di *Streptococcus* spp, *Enterococcus* spp e microrganismi morfologicamente simili



NICE accredited
www.nice.org.uk/accreditation

"NICE has renewed accreditation of the process used by **Public Health England (PHE)** to produce **UK Standards for Microbiology Investigations**. The renewed accreditation is valid until **30 June 2021** and applies to guidance produced using the processes described in **UK standards for microbiology investigations (UKSMIs) Development process, S9365', 2016**. The original accreditation term began in **July 2011.**"

Questa pubblicazione è stata creata dalla Public Health England (PHE) in collaborazione con il NHS.

Emesso da Standards Unit, National Infection Service, PHE



© Crown copyright 2021

# Ringraziamenti

Gli Standard del RU per le indagini sulla microbiologia (SMI del RU) sono sviluppati sotto gli auspici di PHE in collaborazione con il Servizio sanitario nazionale (NHS), la Sanità Pubblica del Galles e le organizzazioni professionali i cui loghi sono visualizzati di seguito ed elencati su the UK SMI website. Le SMI UK sono sviluppate, controllate e riviste da vari gruppi di lavoro che sono supervisionati da uno the steering committee page on GOV.UK).

Si ringraziano per i contributi dei numerosi operatori dei laboratori clinici, specialistici e 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.

Numero di accesso alle pubblicazioni PHE: GW-8348

Le SMI del RU per le indagini microbiologiche sono prodotte in associazione con:

# Contenuti

**Ringraziamenti** ..... 2

**Tabella delle modifiche** ..... 4

**1 Informazioni generali** ..... 5

**2 Informazioni scientifiche** ..... 5

**3 Scopo del documento** ..... 5

**4 Introduzione** ..... 5

**5 Informazione tecnica e limitazioni** ..... 14

**6 Considerazioni sulla sicurezza** ..... 15

**7 Microrganismi bersaglio** ..... 15

**8 Identificatzone** ..... 16

**9 Refertazione** ..... 21

**10 Invio ai laborarori di riferimento** ..... 23

**Appendice 1: Identificazione di specie *Streptococcus*, specie *Enterococcus* e specie di microrganismi morphologicamente simili** ..... 24

**Bibliografia** ..... 25

NICE accredited
www.nice.org.uk/accreditation

"NICE has renewed accreditation of the process used by **Public Health England (PHE)** to produce **UK Standards for Microbiology Investigations**. The renewed accreditation is valid until **30 June 2021** and applies to guidance produced using the processes described in **UK standards for microbiology investigations (UKSMIs) Development process, S9365', 2016**. The original accreditation term began in **July 2011.**"

# Tabella delle modifiche

Ogni metodo SMI del Regno Unito ha una registrazione individuale delle modifiche. Gli emendamenti attuali sono elencati in questa pagina. La cronologia delle modifiche è disponibile

Each UK SMI method has an individual record of amendments. The current amendments are listed on this page. The amendment history is available from standards@phe.gov.uk.

New or revised documents should be controlled within the laboratory in accordance with the local quality management system.

| | |
|---|---|
| Modifica numero/data | 11 / 22 September 2021 |
| Numerodi edizione eliminato | 3 |
| Numerodi edizione inserito | 4 |
| Data prevista per la prossima revisione* | 22 September 2024 |
| **Sezione(i) coinvolte** | **Modifica** |
| Intero documento | Documento presentato in un nuovo formato.<br>Riorganizzazione di parti del testo. |
| Sezione 4.1 | Tassonomia di *Streptococcus*, *Enterococcus* e specie correlate aggiornate |
| Sezione 4.1 | Raggruppamento di specie Lancefield aggiunte alla tabella 1 e rimosse dal testo principale.. |
| Sezione 4.1 | Tabella "Riepilogo dei risultati del test" rimossa a causa della duplicazione con la sezione 4.1 e l'appendice 1 |
| Sezione 8.5 | Aggiunte informazioni sul sequenziamento dell'intero genoma |
| Appendce 1 | Appendice 1 modificata |
| Bibliografia | Bibliografia aggiornata |

*Le revisioni possono essere protratte a 5 anni in funzione delle risorse disponibili

# 1 Informazioni generali

View general information Visualizza informazioni generali relative alle SMI del RU .

# 2 Informazioni scientifiche

View scientific information Visualizza informazioni scientifiche relative alle SMI del RU.

# 3 Scopo del documento

Questo documento UK Standards for Microbiology Investigations (UK SMI) descrive l'identificazione di specie di *Streptococcus* ed *Enterococcus* isolate da materiale clinico a livello di genere o specie mediante metodi fenotipici e molecolari. Sono inclusi anche microrganismi morfologicamente simili agli streptococchi, che possono essere trovati in campioni clinici.

In considerazione della tassonomia in continua evoluzione di questo gruppo di organismi, i metodi fenotipici da soli potrebbero non identificare adeguatamente gli organismi a livello di specie. Questa SMI britannica adotta un approccio semplificato basato sul raggruppamento di organismi con attributi fenotipici simili (1). Può essere necessaria un'ulteriore identificazione ove indicato clinicamente o epidemiologicamente.

Questa SMI del Regno Unito include sia test biochimici che metodi automatizzati per l'identificazione dei microrganismi. Alcuni test biochimici potrebbero non essere eseguiti di routine in laboratorio, tranne nei casi in cui è richiesta la conferma con una tecnica alternativa o non sono disponibili metodi automatizzati.

Questa SMI del Regno Unito dovrebbe essere utilizzata insieme ad altre SMI del Regno Unito pertinenti

# 4 Introduzione

## 4.1 Tassonomia e caratteristiche

Il nome del genere Enterococcus, precedentemente chiamato *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*, è stato ripreso nel 1984 quando altri batteri sono stati trasferiti al genere. Ci sono ora più di 50 specie riconosciute del genere *Enterococcus*. *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* sono gli enterococchi più comuni isolati da infezioni umane(1,2).

Il nome del genere Enterococcus, precedentemente chiamato Streptococcus faecalis e *Streptococcus faecium*, è stato ripreso nel 1984 quando altri batteri sono stati trasferiti al genere. Ci sono ora più di 50 specie riconosciute del genere *Enterococcus*. *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* sono gli enterococchi più comuni isolati da infezioni umane(1,2).

Il genere Streptococcus comprende un gran numero di specie commensali e patogene. Con l'aiuto del recente rapido sviluppo di metodi per la fenotipizzazione microbica e l'identificazione molecolare, il genere *Streptococcus* ha subito una significativa espansione e revisione (3). Attualmente esistono oltre 100 specie riconosciute di *Streptococcus*, molte delle quali sono patogene o commensali nell'uomo e negli animali (2,4,5).

Gli streptococchi sono batteri Gram positivi e catalasi negativi che sono anaerobi facoltativi ma alcuni richiedono $CO_2$ per la crescita. Le cellule sono generalmente a forma di cocco (sferiche o ovoidali) e disposte in catene e/o coppie. Le cellule non sono mobili e hanno un diametro inferiore a 2 µm. Le endospore non si formano. I carboidrati vengono metabolizzati in modo fermentativo l'acido lattico è il principale metabolita. Gli streptococchi producono l'enzima leucina

aminopeptidasi (LAP), che è stato anche chiamato leucina arilamidasi. La temperatura di crescita varia tra le specie, ma la temperatura ottimale è solitamente di circa 37 ° C (1, 2, 6).

La crescita degli streptococchi su terreni solidi può essere migliorata con l'aggiunta di sangue, siero o glucosio. Su agar sangue, le specie mostrano vari gradi di emolisi, che possono essere utilizzati come primo passo nell'identificazione degli isolati clinici. L'emolisi prodotta da colonie su agar sangue e il raggruppamento sierologico di Lancefield sono fattori importanti nell'identificazione presuntiva, tuttavia ci sono molte caratteristiche che si sovrappongono quindi l'analisi genetica è un metodo più definitivo per l'identificazione (1,2).

## Emolisi su agar sangue:

La crescita degli streptococchi su terreni solidi può essere migliorata con l'aggiunta di sangue, siero o glucosio. Su agar sangue, le specie mostrano vari gradi di emolisi, che possono essere utilizzati come primo passo nell'identificazione degli isolati clinici. L'emolisi prodotta da colonie su agar sangue e il raggruppamento sierologico di Lancefield sono fattori importanti nell'identificazione presuntiva, tuttavia ci sono molte caratteristiche che si sovrappongono quindi l'analisi genetica è un metodo più definitivo per l'identificazione (1,2).

## Raggruppamento di Lancefield

Gli streptococchi -emolitici sono ulteriormente caratterizzati tramite la sierotipizzazione di Lancefield, che si avvale dell'antigene dei carboidrati gruppo-specifico presente sulla parete cellulare batterica. Sono noti 20 sierotipi descritti, denominati gruppi di Lancefield da A a V (esclusi I e J), quelli clinicamente significativi sono A, B, C, D, F e G (gruppo D composto da organismi alfa emolitici). La sierotipizzazione di Lancefield è utile nell'identificazione di *Streptococcus*; tuttavia, dovrebbe essere usata insieme ad altri test per ottenere un'identificazione accurata (7,8). Il raggruppamento di Lancefield può essere utilizzato per convalidare i risultati di altri metodi di identificazione.

**Tabella:1 Gruppo e specie di Lancefield(1,6)**

| **Specie** | **Gruppo Lancefield** |
|---|---|
| *Streptococcus pyogenes* | A |
| *Streptococcus agalactiae* | B |
| *Streptococcus canis* | G |
| *Streptococcus dysgalactiae subspecies dysgalactiae* | C |
| *Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis* | C, G, A e L |
| *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* | C |
| *Streptococcus equi subsp. equi* | C |
| *Streptococcus* gruppo *anginosus* | A, C, F e G<br>o non raggruppabile |

| | |
|---|---|
| *Streptococcus* gruppo *bovis* | D |
| *Streptococcus suis* | R, S e T o non raggruppabile |
| *Enterococcus specie* | D |

Altre specie *di Streptococcus* come *S. Pneumoniae* e Viridans streptococchi sono classificati come "Non-Lancefield Streptococchi".

### *Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus pyogenes o Streptococcus di* gruppo A *(GAS) sono* β-emolitici e sono una delle specie *di Streptococcus* più virulente, causando infezioni della pelle, faringite, impetigine e altre malattie invasive (2,6)

Le cellule sono cocchi Gram positivi e sonodisposte in catene. Dopo 18-24 ore di incubazione a 35-37°C su agar sangue le colonie hanno un diametro di circa 0,5-1,0 mm, a forma di cupola, con una superficie liscia o umida, di colore da bianco a grigio e con margini chiari. Alcuni ceppi possono produrre colonie mucoidi. Il tipo di colonia dipende in gran parte dalle condizioni di crescita e dalla produzione di acido ialuronico. La crescita è potenziata dall'aggiunta di brodo con sangue e siero. L'emolisi si osserva meglio coltivando la coltura in condizioni anaerobiche perché le emolisine sono più stabili in assenza di ossigeno (1,9).

*S. pyogenes* non cresce a 10°C, 45°C, in presenza di 6,5% NaCl, a pH 9,6 o in presenza di 40% di bile(1).

GAS può essere differenziato da altri streptococchi β-emolitici (BHS) dalla sensibilità alla bacitracina e dalla rilevazione dell'enzima pirrolidonil arilamidasi (PYR) (nota anche come pirrolidonil aminopeptidasi). La sensibilità alla bacitracina è stata utilizzata da molti laboratori come test di screening presuntivo, ma può dare risultati falsi positivi con gli streptococchi di gruppo C e G(8). PYR è risultata più specifico per l'identificazione di *S.pyogenes* rispetto alla sensibilità alla bacitracina. Questo test è positivo per gli streptococchi di gruppo A ed è negativo per la maggior parte degli altri streptococchi di gruppo di Lancefield, sebbene alcuni ceppi umani dei gruppi C e G possano essere positivi. Anche gli enterococchi sono PYR positivi (1,10).

*Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis*è stato identificato per possedere l'antigene del gruppo A di Lancefield. È stato scoperto che causa gravi infezioni nell'uomo, quindi è essenziale differenziare questo microrganismo *da S. pyogenes*(11).

### *Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus agalactiae* sono cocchi Gram-positivi anaerobi facoltativi, ossidasi negativi, catalasi negativi, che si presentano in catene. Le cellule sono sferiche o ovoidali e da 0,6 a 1,2 µm di diametro, piatte, bianco-grigiastre e da traslucide a opache. Alcuni ceppi hanno pigmenti gialli, arancioni o rosso mattone. Dopo 18-24 ore di incubazione a 35-37°C le colonie tendono ad essere leggermente più grandi degli altri streptococchi (circa 1 mm) e hanno una zona di -emolisi meno distinta, sebbene una percentuale molto piccola di ceppi non sia emolitica. Crescono facilmente su agar sangue e alcuni ceppi possono crescere su terreni contenenti il 40% di bile(1).

*S. agalactiae* può produrre molte malattie, queste possono essere invasive e non invasive.
*S. agalactiae* è una delle principali cause di infezioni neonatali che si presentano come sepsi e

polmonite a esordio precoce e meningite e sepsi a esordio tardivo(6). Causa anche aborto settico spontaneo e sepsi puerperale.

Lo *Streptococcus* di gruppo A può essere differenziato da *S. agalactiae* utilizzando i test CAMP (Christie, Atkinson, Munch, Peterson), bacitracina, PYR e SXT (sulfametossazolo-trimetoprim). La reazione CAMP si riferisce alla lisi sinergica degli eritrociti da parte dell'emolisina di *Staphylococcus aureus* e del fattore CAMP extracellulare di *S. agalactiae*(7).

*Streptococcus porcinus* è un agente patogeno suino che è stato segnalato per reagire in modo incrociato con i reagenti commerciali dello streptococco di gruppo B quando si utilizzano kit commerciali. Entrambi gli Streptococcus possono essere differenziati dal test PYR. *S. porcinus* è PYR positivo e *lo Streptococcus* di gruppo B è PYR negativo(12).

*Streptococcus halichoeri* non è emolitico, originariamente identificato nelle foche, ma ora causa infezioni zoonotiche nell'uomo. *S. halichoeri* risulta positivo per l'antigene del gruppo B di Lancefield ma può essere identificato mediante il sequenziamento del gene MALDI-TOF MS e 16S rRNA(13).

### *Streptococcus dysgalactiae* subspecie *equisimilis*

*Streptococcus dysgalactiae sottospecie equisimilis* sono grandi colonie (≥0,5 mm) β-streptococchi emolitici. Le cellule sono cocchi Gram-positivi, disposti in catene. Le malattie causate da questi microrganismi assomigliano alle infezioni causate da *S. pyogenes*. Altri ceppi di grandi colonie si trovano principalmente negli animali e causano zoonosi, questi possono essere alfa, beta o non emolitici. Ad esempio, *S. canis* provoca infezioni negli animali e occasionalmente nell'uomo(14). Altre specie veterinarie di streptococco di gruppo C strettamente correlate sono *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* e *Streptococcus equi subsp*. *equi*, è stato riscontrato che entrambe le specie causano infezioni nell'uomo(1,6). Inoltre, *Streptococcus dysgalactiae* sottospecie *dysgalactiae* sono isolati alfa o non emolitici da bovini, ma raramente possono causare infezioni nell'uomo (15,16).

*Streptococcus porcinus è un agente patogeno suino che è stato segnalato per rispondere in modo incrociato con i reagenti commerciali dello streptococco di gruppo B quando si utilizzano kit commerciali. Entrambi gli Streptococcus possono essere differenziati dal test PYR. S. porcinus è PYR positivo e lo Streptococcus di gruppo B è PYR negativo(12).*

### *Streptococcus anginosus* group:

### *Streptococcus anginosus, Streptococcus anginosus subspecies whileyi, Streptococcus constellatus* subspecie *constellatus*, *Streptococcus constellatus* subspecie *pharyngis, Streptococcus constellatus* subspecie *viborgensis* e *Streptococcus intermedius* (in precedenza "*Streptococcus milleri*" gruppo)[17]

Il gruppo *Streptococcus anginosus* (SAG) che forma piccole colonie (dimensioni 0,5 mm) è costituito da 3 specie distanti, *S. anginosus*, *S. constellatus* e *S. intermedius*. La specie *S. constellatus* è stata suddivisa nella sottospecie *S. constellatus subsp. costellatus, S. costellatus subsp. pharyngis e S. constellatus subsp. viborgensis.* A queste specie appartengono cocchi Gram positivi, catalasi negativi, immobili, non sporigeni, che si presentano in piccole catene o coppie di varie lunghezze. Le colonie su agar sangue hanno un diametro compreso tra 0,5 e 2,0 mm, bianche o traslucide, convesse ebordo continuo. Possono presentare aspetto di emolisi variabili: o nessuna emolisi dopo 16-24 ore a 35-37°C. Ad esempio, S. constellatus è generalmente β-emolitico o non emolitico, mentre *S. intermedius* è per lo più non emolitico o α-emolitico su agar sangue. La considerazione delle condizioni di incubazione può essere di qualche valore per l'identificazione presuntiva del gruppo *S. anginosus* poiché la crescita è ridotta in condizioni aerobiche e frequentemente potenziata dall'aggiunta di $CO_2$. Gli organismi di questo gruppo colonizzano normalmente il tratto respiratorio superiore, l'apparato digerente e l'apparato

riproduttivo. Gli streptococchi in questo gruppo crescono su terreni contenenti bile sebbene non siano tolleranti al sale (1,6,18).

L'identificazione di un isolato da un campione clinico come componente di questo gruppo è potenzialmente clinicamente significativo, a causa della propensione di questo gruppo ad essere associato a infezioni piogene invasive, come infezioni dei tessuti molli superficiali o profonde e coinvolgere più organi(18 ).

*Streptococcus anginosus e Streptococcus constellatus sottospecie constellatus* possono reagire in modo incrociato con l'antigene di gruppo A e G di Lancefield*. Streptococcus anginosus* e *Streptococcus constellatus sottospecie pharyngis* possono reagire in modo incrociato con l'antigene del gruppo C di Lancefield.

### *Specie Enterococcus*

Gli enterococchi sono cocchi Gram positivi anaerobi facoltativi, ma alcune specie sono $CO_2$ dipendenti. Non sono sporigeni. L'attività emolitica è variabile e per lo più dipendente dalla specie. Le specie *Enterococcus* possono crescere a 45°C, idrolizzare l'esculina in presenza del 40% di bile e la maggior parte delle specie cresce in presenza di 6,5% di NaCl. Alcuni ceppi possono essere mobili come *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*. Le cellule sono ovoidali, possono presentarsi singolarmente, di solito in coppia, o in corte catene di diversa lunghezza e sono frequentemente allungate nella direzione della catena. La temperatura di crescita ottimale per la maggior parte delle specie è compresa tra 35 e 37 °C, tuttavia, alcune specie sono in grado di crescere a 45 °C e a 10°C. Gli enterococchi sono molto resistenti all'essiccazione. Le colonie dopo 24 ore di incubazione su agar sangue hanno un diametro da 1 a 2 mm, sono di colore crema, grigio o bianco e sono regolari e circolari con superficie liscia. Gli enterococchi sono ossidasi negativi e fermentano i carboidrati. La maggior parte delle specie è catalasi negativa, tuttavia è necessario prestare attenzione quando si utilizza sangue contenente agar perché alcuni ceppi possono produrre una pseudocatalasi. Ciò può essere evitato testando su MacConkey o altri supporti non contenenti sangue. Sono leucina aminopeptidasi (LAPasi) e PYR positivi. Gli enterococchi possono crescere e sopravvivere in condizioni difficili, possono essere trovati nel tratto gastrointestinale di esseri umani e animali, piante, suolo, acqua, ambiente e prodotti fermentati. Le specie più comuni sono *E. faecalis* (specie tipo) ed *E. faecium* a causa della sua crescente resistenza agli antibiotici (1,7,19-21).

La maggior parte degli enterococchi possiede l'antigene di gruppo D, sebbene alcuni ceppi possano reagire in modo incrociato con l'antisiero di gruppo D e G di Lancefield(22).

Gli enterococchi dimostrano resistenza sia intrinseca che acquisita a numerosi antibiotici, come gli antibiotici β-lattamici, gli aminoglicosidi, la vancomicina e il cloramfenicolo(19).

## Gruppo *Streptococcus bovis*

### *Gruppo Streptococcus bovis*

Il gruppo *S. bovis* ha subito molti cambiamenti tassonomici a causa di studi di riassociazione DNA-DNA, risultando in 4 cluster di DNA. Il cluster di DNA I contiene *S. bovis* e *S. equinus*; che ora sono combinati in un'unica specie chiamata *S. equinus*. Il cluster II comprende *S. gallolyticus*, con tre sottospecie: subsp*. galloliticus*, subsp. *pasteurianus* e subsp. *macedonicus*. Il cluster III comprende *S. infantarius*, con 2 sottospecie: subsp. i*nfantarius* e sottospecie *coli*. Il cluster IV include *S. alactolyticus*. I membri del gruppo *S. bovis* sono emolitici alfa o non emolitici su sangue in condizioni aerobiche(2,5,6).

Il gruppo S. bovis può essere differenziato dagli enterococchi per una reazione negativa sia al test PYR che a quello dell'arginina, mentre gli enterococchi sono generalmente positivi per entrambi.

Ulteriori test biochimici e di identificazione dovrebbero essere eseguiti per una differenziazione confermata tra gli organismi del gruppo D di Lancefield (1,7,21).

Queste specie formano piccole colonie, cocchi Gram positivi, catalasi negativi e si presentano in catene. I membri del gruppo *S. bovis* sono associati a batteriemia, sepsi ed endocardite. Il gruppo *S. bovis* e i ceppi di *S. mutans* hanno caratteristiche fenotipiche simili come fermentazione del mannitolo e produzione di glucano. Maggior parte dei ceppi di *S. bovis* crescono in agar bile-esculina e non sono in grado di crescere in brodo NaCl al 6,5% (6,23).

### *Streptococcus suis*

Le cellule sono Gram positive, catalasi negative, coccoidi e si presentano singolarmente, in coppia o (raramente) in catene corte, alcune possono raramente apparire in catene corte. Gli *S. suis* sono incapsulati, appaiono come alfa emolitici su agar sangue di pecora, ma alcune specie possono apparire come β-emolitici su agar sangue di cavallo. Alcuni ceppi sono resistenti alla bile e tutti sono resistenti all'optochina e PYR negativi. Non crescono a 10 o 45°C, in 6,5% NaCl o 0,04% in tellurito. Alcuni ceppi sono in grado di crescere in presenza del 40% di bile e tutti sono in grado di idrolizzare l'esculina. *S. suis* è un importante patogeno zoonotico, isolato anche da casi umani di meningite e batteriemia (1,6,24).

Sulla base dei risultati fenotipici e filogenetici, il riassortimento di *S. suis* ha portato a nuove specie: *Streptococcus parasuis* (ex *S. suis* sierotipo 20, 22 e 26)(25) *e Streptococcus ruminantium* (ex *S. suis* sierotipo 33)(26).

### *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* (“pneumococchi”) sono Gram positivi, diplococchi o catene di cocchi, cellule tipicamente lanceolate che si presentano in coppie, che possono essere capsulate. Con l'invecchiamento delle colonie, la reazione Gram positiva può trasformarsi in Gram variabile e alcune cellule possono apparire come Gram negative. Le colonie sono da 1 a 2 mm, appaiono piccole, grigiastre, mucose, luccicanti e a forma di cupola con un bordo intero dopo 24 ore di incubazione a 35-37°C. Con l'età, si verifica l'autolisi e la colonia collassa. Su agar sangue, l'emolisi α apparirà in condizioni aerobiche e β-emolisi in condizioni anaerobiche. *S. pneumoniae* può essere differenziato da altri streptococchi viridans mediante 2 test: sensibilità all'optochina e solubilità della bile. Gli *S. pneumoniae* sono generalmente sensibili all'optochina (etilidrocupreina cloridrato), che consente una rapida identificazione dell'organismo; sebbene sia stata descritta una resistenza. Gli *S. pneumoniae* sono anche solubili in soluzione di sali biliari. *S. pneumoniae* può essere identificato anche con metodi sierologici. La "reazione Quellung" (gonfiore capsulare) può essere utilizzata per identificare i tipi specifici di *S. pneumoniae* microscopicamente. Sono disponibili anche test di agglutinazione commerciali per la rilevazione rapida di antigeni pneumococcici, ma questi devono essere usati con cautela poiché possono verificarsi reazioni crociate con i gruppi *S. oralis* e *S. mitis* (1,7,27,28).

### Streptococchi Viridans

Gli streptococchi viridans comprendono 5 gruppi fenotipici: gruppo *S. mutans*, gruppo *S. salivarius*, gruppo *S. anginosus*, gruppo S. mitis e gruppo *S. bovis*. Questi sono cocchi catalasi negativi e Gram positivi, che appaiono in catene. Sebbene la parola "viridans" o "greening" si riferisca all'α-emolisi, alcune specie possono essere β emolitiche o non emolitiche. La maggior parte degli streptococchi viridans manca dell'antigene di Lancefield distinto. Questi organismi possono essere sia flora commensale che patogeni nell'uomo. L'identificazione degli streptococchi nei casi di sospetta endocardite ha un certo valore nella conferma della diagnosi e a fini epidemiologici.

Alcune specie di streptococchi, come *S. sanguinis* e *S. oralis* (ex *mitior*), possono rappresentare fino all'80% di tutti i casi di endocardite streptococcica (1,7,29).

Nel sottogruppo *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pseudopneumoniae* è stato scambiato per *S. pneumoniae* ma presenta una serie di caratteristiche che gli consentono di distinguerlo da *S. pneumoniae:*

- non è presente una capsula pneumococcica (e quindi non è tipizzabile)
- non è solubile nella bile
- è sensibile all'optochina quando incubato in aria ambiente, ma sembra resistente o avere una suscettibilità indeterminata in caso di aumento della $CO_2$
- I test di ibridazione delle sonde di DNA commerciali forniscono falsi positivi (1,30)

### *Abiotrophia* e *Granulicatella*

*Abiotrophia* e *Granulicatella (*precedentemente indicati come streptococchi nutrizionalmente varianti e simili a streptococchi viridans) sono cocchi Gram-positivi che crescono come colonie "satellite" attorno ad altri organismi. Specie clinicamente importanti sono *A. difettoso*, *G. adiacens*, *G. balaenopterae* e *G. elegans*. Sono catalasi e ossidasi negative, anaerobi facoltativi, non mobili e non sporulanti. Non si verifica crescita a 10 o 45°C (7,31-33).

Queste specie fanno parte della normale flora del tratto urogenitale e intestinale umano e sono state isolate da sangue, ascessi, ulcere orali e campioni uretrali. Il riconoscimento di queste specie è importante per le infezioni profonde (in particolare l'endocardite) per garantire la terapia antimicrobica più appropriata. Sono spesso associati a emocolture negative(32,34).

### Generi strettamente correlato a Streptococchi

### Specie *di Aerococcus*.

Esistono 7 specie di Aerococcus, di cui 5 patogene e causano sia infezioni del tratto urinario che infezioni invasive (compresa l'endocardite infettiva) nell'uomo. Questi sono *A. christensenii, A. sanguinicola*, *A. urinae*, *A. urinaehominis* e *A. viridans*. Le specie *Aerococcus* sono Gram positive, catalasi negative (alcuni ceppi possono dare una debole reazione della catalasi o pseudocatalasi), ossidasi negative, cocchi non mobili, non sporigeni e anaerobi facoltativi. Su agar sangue dopo 24 ore di incubazione a 37°C le colonie appaiono piccole (1 mm o meno), non pigmentate (occasionalmente produziono pigmento giallo da parte dei ceppi di A. viridans) e mostrano α emolisi. Tutti i microrganismi possono crescere bene con il 6,5% di NaCl e *A. viridans* cresce con il 10% di NaCl. Le specie Aerococcus sono state precedentemente erroneamente identificate a causa di somiglianze tra stafilococchi, streptococchi ed enterococchi. Ad esempio, gli aerococchi assomigliano agli streptococchi per ls morfologia della colonia simile a quella degli streptococchi "viridans" e appaiono con α emolisi in coltura, ma differiscono a livello microscopico per presentarsi caratteristicamente come coppie, tetradi o gruppi. Test come PYR, LAP, MALDI TOF MS, 16s rRNA e altri test convenzionali possono essere utilizzati per differenziare le specie di *Aerococcus* da altri organismi. La maggior parte dei ceppi di *A. viridans* e *A. anguinicola* presentano una reazione positiva all'esculina biliare e sono PYR positivi. *A. urinae* è bile esculina negativo e PYR negativo. La crescita avviene sia in condizioni aerobiche che anaerobiche (1,35).

I In alcuni sistemi di identificazione commerciale, *Helcococcus kunzii* può essere erroneamente ide ntificato come *A. viridans*. *A. sanguinicola* può anche essere erroneamente identificato

come *A. viridans.* Ciò rende problematiche le segnalazioni di infezioni causate da *A. viridans* quando l'identificazione si basa su questi metodi. La maggior parte degli aerococchi è sensibile ai β-lattamici e a diversi altri gruppi di antibiotici. Le specie *Aerococcus* sono sensibili alla vancomicina sebbene siano state riportate MIC elevate(36)

### Specie *Facklamia*

Esistono 6 specie di cui 4 patogene per l'uomo: *F. hominis*, *F. languida*, *F. sourekii* e *F. ignava*. La specie umana più comune è *Facklamia hominis*. Le specie *Facklamia* assomigliano agli streptococchi "viridans" in coltura. Sono Gram positivi anaerobi facoltativi, catalasi negativi, ossidasi negativi, LAP positivi, non sporigeni, cocchi non mobili che si presentano come coppie, gruppi o catene. Le specie *Facklamia* sono spesso erromramente identificate come streptococchi viridans, la differenza chiave tra i due mogrorganismi è che le specie *Facklamia* sono positive per PYR. Crescono bene in NaCl al 6,5% a 37 °C ma non crescono a 10 o 45 °C. *Facklamia* l*anguida* non idrolizza l'ippurato ma tutte le altre specie sì, e questa è una caratteristica differenziante tra loro. L'acido non viene prodotto dal glucosio e da altri zuccheri e il nitrato non viene ridotto (1,37).

### Specie *Gemella*

Attualmente sono presenti 6 specie *Gemella*: *G. haemolysans* (specie tipo), *G. morbillorum* (ex *Streptococcus morbillorum*), *G. bergeriae*, *G. sanguinis*, *G. palaticanis* e *G. cuniculi*. Le specie *Gemella* sono a crescita lenta, sono catalasi negative, immobili, non sporigene, anaerobie facoltative, cocchi Gram variabili, disposti in coppie, tetradi, grappoli e talvolta brevi catene. Alcuni ceppi si decolorano facilmente alla colorazione di Gram, presentandosi come Gram negativi. Inoltre, alcuni ceppi possono richiedere condizioni strettamente anaerobiche per l'isolamento primario e diventare aerotolleranti dopo il trasferimento in terreni di laboratorio. Sono α-emolitici o non emolitici su agar sangue e assomigliano a colonie di streptococchi viridans. Le colonie sono piccole e da grigiastre a incolori. Crescono meglio a 35 e 37°C ma non riescono a crescere a 10 o 45°C. Di solito sono PYR e LAP positivi. In alcuni sistemi di identificazione commerciale, gli streptococchi "viridans" possono essere erroneamente identificati come specie *Gemella* (1,37-39).

### Specie *Globicatella*

Esistono 2 specie di *Globicatella*, ma la specie implicata nelle infezioni umane è *G. sanguinis*. Le specie *Globicatella* crescono su agar sangue al 5% di cavallo o pecora formando piccole colonie viridans simili a *Streptococcus* sulla piastra di agar sangue e producono una debole reazione α-emolitica. Sono Gram positivi (ma a volte si colorano in Gram negativi), non mobili, non sporigeni, anaerobi facoltativi, catalasi negativi, cocchi che si presentano singolarmente, in coppia o in corte catenelle. La crescita avviene in brodo contenente il 6,5% di NaCl. Non riescono a crescere a 10 o 45°C. Le specie *Globicatella* possono essere distinte dagli aerococchi per morfologia cellulare. Gli aerococchi formano coppie e tetradi mentre le specie *Globicatella* formano brevi catene di cocchi (1,40).

### Specie *Helcococcus*

Esistono attualmente 6 specie di Helcococcus: Helcococcus kunzii (specie tipo), H. pyogenes, H. ovis, H. sueciensis. H. seattlensis e H. massiliensis(41,42).

Le specie Helcococcus sono cocchi Gram positivi che sono catalasi negativi, non mobili e anaerobi facoltativi. Sono disposti in gruppi o coppie irregolari, tetradi e grappoli e formano piccole colonie puntiformi non emolitiche su agar sangue dopo 48 ore di incubazione a 35 e 37°C. Sono a crescita lenta e appaiono come streptococchi viridans su piastra di agar sangue e possono essere difficili da coltivare su un terreno non contenente sangue, il che suggerisce

che questa specie è lipofila. Di solito non sono emolitici. Questo li differenzia dagli aerococchi che formano colonie più grandi circondate da un'ampia zona di α emolisi dopo l'incubazione. L'acido è prodotto, ma non il gas, dal glucosio e da altri zuccheri. Non c'è crescita sull'agar bile-esculina. Queste specie sono sensibili alla vancomicina. H. kunzii produce minuscole colonie grigie, non emolitiche; la crescita è stimolata dall'aggiunta di siero o Tween 80 al terreno di base. In alcuni sistemi di identificazione commerciale, Aerococcus viridans può essere erroneamente identificato come Helcococcus kunzii, entrambi possono essere differenziati in base alla dimensione della colonia e all'emolisi (1,39,43).

### Specie *Lactococcus*

Le specie *Lactococcus* sono fisiologicamente simili alle specie *Enterococcus* e sono state erroneamente identificate a causa delle caratteristiche simili sia agli streptococchi che agli enterococchi. Sono cocchi Gram-positivi anaerobi facoltativi, o non emolitici, catalasi negativi, non mobili che si presentano singolarmente, in coppia o in catene, le colonie sono piccole, da traslucide a biancastre. Sono ospiti di animali e piante e prodotti derivati. Raramente sono stati isolate da casi umani del tratto urinario, infezioni di ferite e da pazienti con endocardite. La crescita avviene tra 10 e 40°C ma non a 45°C (1,39).

### Specie *Leuconostoc*

Le specie *Leuconostoc* sono cocchi lenticolari Gram-positivi che si presentano in coppie e catene e sono caratteristicamente resistenti alla vancomicina e producono $CO_2$ dal glucosio. Sono catalasi negative, non mobili e le colonie sono spesso α-emolitiche su agar sangue. Sono anaerobe facoltativi e possono essere confuse con gli enterococchi perché la maggior parte delle specie *Leuconostoc* sono bile esculina positive e alcune possono cross-reagire con gli antisieri del gruppo D. La temperatura ottimale di crescita è compresa tra 20 e 30°C, ma la crescita può avvenire a 5°C. Le specie *Leuconostoc* sono state coinvolte in una varietà di infezioni opportunistiche come meningite e batteriemia (1,39).

### Specie *Pediococcus*

Le specie Pediococcus possono assomigliare agli streptococchi viridans in coltura, ma microscopicamente sono simili agli stafilococchi. Sono cocchi Gram-positivi che compaiono in coppie, gruppi e tetradi e sono intrinsecamente resistenti alla vancomicina e moderatamente sensibili agli agenti antimicrobici β- lattamici. Sono anaerobi facoltativi e catalasi negativi. Tutti i ceppi non sono mobili e appaiono come non emolitici o α-emolitici su piastra di agar sangue. La temperatura di crescita ottimale è compresa tra 25 e 35 °C, ma dipende dalla specie. Sono leucina aminopeptidasi positivi, che li distingue dalle specie *Leuconostoc*. Possono essere confusi con gli enterococchi perché sono bile esculina positivi e cross-reagiscono con gli antisieri del gruppo D (1,39,44).

### Specie *Vagococcus*

Le specie Vagococcus sono Gram positive, non sporigene, non pigmentate, catalasi negative, ossidasi negative e anaerobie facoltative. Le cellule sono cocchi o di forma ovale che si presentano singolarmente, in coppia o in catene. La maggior parte dei ceppi cresce a 10°C ma non a 45°C. La maggior parte dei ceppi è mobile. La specie tipo è *Vagococcus fluvialis* che sembra reagire con gli antisieri del gruppo N di Lancefield. Inoltre, alcuni isolati possono dare una debole reazione con l'antisiero di gruppo D di Lancefield e possono essere confuse

con alcuni enterococchi. I *Vagococcu*s sono isolati da fonti diverse, principalmente da prodotti e habitat animali o correlati agli animali e molto raramente da campioni clinici umani (1,45).

## Principi d'identificazione

Gli isolati dalla coltura primaria sono identificati dall'aspetto delle colonie, dalla colorazione di Gram, dal tipo e dall'aspetto di emolisi, dal raggruppamento di Lancefield e dalle divisioni fisiologiche come la divisione piogenica che include *S. pyogenes*. Un'ulteriore identificazione può essere possibile mediante l'uso di test biochimici utilizzando kit disponibili in commercio e test fisiologici per distinguere tra le specie.

In alcuni casi, sulla base della morfologia delle colonie, dei dettagli clinici e dell'esperienza dell'operatore, può essere possibile omettere le prime fasi di identificazione (come la colorazione di Gram e la catalasi) e procedere ad altri test. Tutti i test di identificazione dovrebbero idealmente essere eseguiti da agar non selettivo.

Se l'identificazione primaria non fornisce un'identificazione sufficiente per la gestione clinica, è possibile ottenere un'identificazione completa utilizzando un sistema di identificazione commerciale come MALDI-TOF MS e metodi basati su NAAT, insieme ai risultati dei test di sensibilità.

Un'attenta considerazione dovrebbe essere data agli isolati che danno un'identificazione insolita.

Se è richiesta la conferma dell'identificazione, gli isolati devono essere inviati a un laboratorio di riferimento dove è disponibile un servizio di identificazione tassonomica per streptococchi e altri generi correlati Gram positivi e catalasi negativi

# 5 Informazione tecnica e limutazioni

## 5.1 Commercial identification systems

Alcuni kit commerciali possono dare risultati inaffidabili con l'identificazione di streptococchi $\alpha$-emolitici. C'è anche una scarsa discriminazione tra *S. pneumoniae* e il gruppo *S. mitis* in quanto geneticamente inseparabili, per cui le specie *Streptococcus mitis/oralis* possono essere erroneamente identificate come *S. pneumoniae*(46).

Le specie appartenenti ai gruppi *S. mitis* e *S. sanguinis*, spesso considerate come un unico gruppo, sono difficili da differenziare e possono dare risultati discordanti a causa della scarsa qualità di alcuni sistemi di identificazione utilizzati.

È stato riportato che lo Streptococcus porcinus, un agente patogeno dei suini, reagisce in modo incrociato con i reagenti commerciali dello streptococco di gruppo B quando si utilizzano kit commerciali.

È stato riportato che lo *Streptococcus porcinus*, un agente patogeno suino, reagisce in modo incrociato con i reagenti commerciali dello streptococco di gruppo B quando si utilizza un kit commerciale

## 5.2 Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

I sistemi di identificazione batterica basati su MALDI-TOF MS hanno limitazioni con diverse specie di streptococchi, inclusa la distinzione di Streptococcus pneumoniae da altri membri del gruppo Streptococcus mitis; tuttavia, la combinazione del test di solubilità della bile con i risultati degli spettri MALDI-TOF può fornire un'identificazione accurata di S. pneumoniae (47). Fare riferimento a UK SMI TP 40 – Matrix-assisted laser desorption/ionisation - time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) test procedure per ulteriori informazioni sulle limitazioni tecniche.

## 5.3 Test della catalasi

A volte le specie *Aerococcus* e *Enterococcus* producono una debole reazione della catalasi o pseudocatalasi, che può essere evitata testando MacConkey o altri terreni non contenenti sangue.

# 6 Considerazioni sulla sicurezza

Microrganismi del gruppo di rischio 2.

View current guidance Visualizza le linee guida attuali sulla manipolazione sicura di tutti i microrganismi documentati nella sezione sulle considerazioni sulla sicurezza delle informazioni scientifiche SMI del Regno Unito.

I dispositivi di protezione individuale (DPI) appropriati e le tecniche progettate per ridurre al minimo l'esposizione degli operatori di laboratorio devono essere indossati e rispettati in ogni momento.

Le procedure di laboratorio che danno luogo ad aerosol infettivi devono essere condotte in cabina microbiologica di sicurezza.

I datori di lavoro dovrebbero garantire che il personale in stato di gravidanza, immunocompromesso o immunodepresso non possa svolgere lavori con questi microrganismi altamente infettivi o maneggiare isolati per l'identificazione di questi microrganismi e, in alcune situazioni, essere limitato a un laboratorio a basso rischio(48).

Sono state segnalate infezioni acquisite in laboratorio.

La guida di cui sopra dovrebbe essere integrata con COSHH locale e valutazioni del rischio specifiche per attività. Il rispetto delle normative sugli imballaggi postali e di trasporto è essenziale (49-70).

# 7 Microrganismi bersaglio

## 7.1 Specie di *Streptococcus* segnalate per aver causato l'infezione umana

I seguenti streptococchi sono causa di infezioni nell'uomo (1,5,39). Da rilevare che questa non è una lista esaustiva:

*Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*

*Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*

*Streptococcus equi subsp. equi*

***Streptococcus bovis* group**: *S. gallolyticus* subspecies*. gallolyticus, S. infantarius*, con 2 subspecies: *subsp. infantarius* and *subspecies coli. Streptococcus lutetiensis Streptococcus pasteurianus*

**Streptococchi "viridans"**

Questi sono divisi in 5 sottogruppi. Sono i seguenti:

***Streptococcus anginosus* group**

*Streptococcus constellatus* subspecies *constellatus*, *Streptococcus constellatus* subspecies *pharyngis*, *Streptococcus intermedius*

***Streptococcus mutans* group** - *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus*

***Streptococcus mitis* group** - *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis, Streptococcus sanguinis, Streptococcus gordonii, Streptococcus parasanguinis, Streptococcus cristatus, Streptococcus pneumoniae**, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus infantis*, *Streptococcus sinensis*

***Streptococcus salivarius* group -** *Streptococcus salivarius, Streptococcus vestibularis*

***Streptococcus suis***

**Abiotrophia and Granulicatella** - *Granulicatella adjacens, Granulicatella elegans, Granulicatella balaenopterae* and *Abiotrophia defectiva.*

***Taxonomically, this is shown to be within the mitis cluster but could be separated from all other species.*

## 7.2 Specie *Enterococcus* segnalate per aver causato l'infezione umana

*Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus casseliflavus, Enterococcus dispar, Enterococcus durans, Enterococcus flavescens, Enterococcus gallinarum, Enterococcus raffinosus*

## 7.3 Altri generi segnalati per aver causato infezioni umane

*Aerococcus* species, specie *Facklamia* , specie *Gemella* , specie *Globicatella* , specie *Helcococcus* , specie *Lactococcus*, specie *Leuconostoc*, specie *Pediococcus* e specie *Vagococcus*

# 8 Identificazione

## 8.1 Aspetto microscopico

**Colorazione Gram (TP 39 – Staining Procedures)**

Le specie *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactococcus* sono cellule Gram positive, rotonde o ovoidali che si presentano in coppie, catene corte o lunghe o talvolta in gruppi.

Gli *Streptococcus pneumoniae* sono cellule Gram positive, lanceolate, che si presentano in coppia, spesso con una capsula visibile.

Le specie *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Facklamia e Helcococcus* sono cocchi Gram-positivi in grappolo o tetradi.

Le specie *Gemella*, *Leuconostoc* e *Vagococcus* sono cocchi Gram-positivi che si presentano in coppie, grappoli e corte catenelle (la *Gemella* può essere facilmente decolorate)

## 8.2 Terreni di primo isolamento

Agar sangue incubato in $CO_2$ dal 5 al 10% a 35-37°C per 16-24 ore, o in anaerobiosi a 35-37°C per 16-24 ore per i tamponi faringei B 9 – Investigation of Throat Swabs).

Agar Staph/Strep incubato in aerobiosi a 35-37°C per 16-48 ore.

Agar CLED incubato in aerobiosi a 35-37°C per 16-24 ore.

## 8.3 Colonial appearance

| **Microrganismo "gruppo"** | **Emolysi** | **Caratteristiche di crescita su agar sangue** |
|---|---|---|
| streptococci β-haemolytic | β | Aspetto diverso della colonia: vedere tutti i dettagli nella sezione 4.1 |
| "*S. anginosus*" | α,β o non | Le colonie sono piccole (≤0,5 mm), l'emolisi è variabile. Alcuni ceppi hanno una colonia bianca "ammassata" . |
| Enterococci | α,β or non | Le colonie sono più grandi di quelle degli streptococchi, di solito da 1 a 2 mm, con aspetto umido. L'emolisi è variabile. |
| Gruppo S. bovis group | α o non | Le colonie sono piccole 1mm, non-pigmentate. |
| *S. pneumoniae* | α | Le colonie sono da 1 a 2 mm, piccole, crema, grigie o bianche e possono apparire come colonie "disegnatrici"?. Dopo l'incubazione anaerobica le colonie possono essere più grandi e mucose.. |
| Streptococchi "viridans" | α o non | Colonies are tiny, non-pigmented, grey, smooth or matte, 0.5 to 1.0mm, entire edged. |
| *Abiotrophia* e *Granulicatella* | α or non | Le colonie sono piccole (□0,5 mm), richiedono piridossale o cisteina per la crescita.. |
| Specie *Aerococcus* | α | Simile a streptococci "viridans". |
| *Facklamia* species | α or non | Simile a streptococci "viridans". |
| *Gemella* species | α or non | Simile a streptococci "viridans". |
| Specie *Globicatella* | α | Simile a specie *Aerococcus*. |
| Specie *Helcococcus* | non | Simile a streptococci "viridans". |
| Specie *Lactococcus* | α o non | Simile a enterococci. |
| Specie *Leuconostoc* | α o non | Simile a streptococci "viridans". |
| Specie *Pediococcus* | α o non | Simile a streptococci "viridans". |

## 8.4 Procedure dei test

### 8.4.1 Test biochimici

Per la caratterizzazione degli streptococchi è disponibile un'ampia gamma di test biochimici, alcuni dei più comuni sono elencati di seguito. I kit di identificazione dei test disponibili in commercio

progettati specificamente per gli streptococchi sono stati sviluppati per includere la fermentazione dei carboidrati e altri test biochimici tradizionali, tuttavia questi kit potrebbero non identificare specie più recentemente riconosciute (1).

**Catalase test** (TP 8 – Catalase Test)

Streptococchi e organismi morfologicamente simili sono generalmente catalasi negativi.Le specie Enterococcus sono catalasi negative, ma alcuni ceppi rivelano attività pseudocatalasi se coltivati su terreni agar contenenti sangue

**Test di idrolisi dell'esculina biliare (TP 2 – Aesculin Hydrolysis Test)**

Enterococchi, streptococchi di gruppo D di Lancefield e Lactococchi idrolizzano l'esculina in presenza del 40% di bile, altri streptococchi no.

Alcuni ceppi di specie *Aerococcus* e *Leuconostoc* possono idrolizzare l'esculina

Some strains of *Aerococcus* and *Leuconostoc* species can hydrolyse aesculin.

**Sensibilità al test dell'Optochin sensitivity test (TP 25 – Optochin Test)**

*S. pneumoniae* è solitamente sensibile all'optochina, altri streptococchi ed enterococchi sono solitamente resistenti

Ceppi occasionali di *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* sono sensibili all'optochina..

**Pyrrolidonyl arylamidase /PYR-aminopeptidase (PYR)**

Enterococchi e *S. pyogenes* sono positivi; Il gruppo *S. bovis* e il gruppo *S. anginosus* sono negativi(10).

**Bile solubility test** (opzionale) **(TP 5 – Bile Solubility Test)**

*S. pneumoniae* è solubile nel 10% di sali biliari, *S. pseudopneumoniae* è parzialmente solubile e altri streptococchi $\alpha$-emolitici sono insolubili..

**Test della bacitracina**

Test di sensibilità utilizzato per differenrenziare lo *Streptococcus* β-haemolytico.

## 8.4.2 Raggruppamento di streptococchi (kit di identificazione commerciale)

Istituito da Lancefield nel 1933 ha scoperto che la maggior parte degli streptococchi patogeni possiede antigeni carboidrati specifici, che consentono la classificazione degli streptococchi in gruppi. Questi antigeni del gruppo streptococcico possono essere estratti dalle cellule utilizzando l'acido, la formammide o il metodo enzimatico (71-73). L'uso di una procedura di estrazione enzimatica riduce notevolmente il tempo necessario per l'estrazione dell'antigene e migliora notevolmente la resa dell'antigene, in parte per gli streptococchi di gruppo D

Più recentemente sono disponibili kit commerciali per il raggruppamento di streptococchi basati sull'agglutinazione al lattice per la diagnosi di routine. La reazione positiva è visualizzata dall'aggregazione delle particelle. I laboratori devono seguire le istruzioni del produttore e i test rapidi e i kit devono essere convalidati e dimostrati idonei allo scopo prima dell'uso (1).

## 8.4.3 Rilevazione diretta dell'antigene di *S. pyogenes*

I test di rilevamento rapido dell'antigene possono essere utilizzati in ambito clinico per il rilevamento di *S. pyogenes* in pazienti con mal di gola. Questi test sono facili da usare, a basso

costo e migliorano i tempi di risposta con un'elevata specificità ma variano in termini di sensibilità. A causa della bassa sensibilità, è buona norma confermare i risultati negativi del test dell'antigene diretto con la coltura, specialmente nei bambini e negli adolescenti. In alternativa, i metodi di amplificazione del DNA per il rilevamento diretto sono molto più sensibili del rilevamento dell'antigene (6,74)

### 8.4.4 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS è uno strumento di identificazione semplice, rapido, accurato e altamente affidabile per la caratterizzazione di una collezione diversificata di agenti patogeni. Combina i vantaggi dei saggi fenotipici con la rapidità e l'accuratezza dei saggi molecolari. Negli ultimi anni questa tecnica è stata sempre più utilizzata dai laboratori diagnostici per la sua elevata riproducibilità, velocità e sensibilità di analisi e tempi di risposta migliorati rispetto ai metodi fenotipici e ad altri metodi commerciali (75).

MALDI-TOF MS è stato sviluppato e convalidato per determinare specie e linee di cocchi Gram-positivi clinicamente rilevanti: specie *Streptococcus*, *Aerococcus* e *Enterococcus*. Una limitazione di MALDI-TOF MS è che non può distinguere facilmente tra specie strettamente correlate come *Streptococcus pneuomoniae* da altri membri del gruppo *Streptococcus mitis*. È difficile differenziare tra gli streptococchi del gruppo viridans e tra *Streptococcus dysgalactiae*, *S. pyogenes* e *S. canis*. Tuttavia, la cura dei database MALDI-TOF MS continua a migliorare l'identificazione (28,76,77). MALDI TOF MS è una tecnica di identificazione efficace per le specie di enterococchi rispetto ad altri metodi automatizzati che sono meno efficienti nel rilevare specie di *Enterococcus* non *faecalis* e non *faecium*(20). Questo metodo è stato utilizzato anche per l'identificazione di aerococchi a livello di specie, tuttavia, l'accuratezza di MALDI-TOF MS nell'identificazione di specie batteriche non comuni nei campioni clinici, come gli aerococchi, deve essere ulteriormente valutata (78).

### 8.4.5 Test di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT)

I NAAT basati su PCR in tempo reale sono test rapidi e affidabili per l'identificazione delle specie *Streptococcus* ed *Enterococcus*. Per le specie *Streptococcu*s, ci sono varie PCR per i diversi gruppi e i loro geni bersaglio e, a seconda dei dettagli clinici, dovrebbe essere eseguita la PCR appropriata. Sono stati sviluppati diversi NAAT per l'identificazione di *S. agalactiae*, che possono essere eseguiti dopo l'arricchimento della coltura o direttamente su campioni clinici (79). Sono state inoltre sviluppate PCR in tempo reale per l'identificazione di *S. pneumoniae* da colture isolate e campioni di siero (6,80).

La PCR è stata utilizzata anche per il rilevamento simultaneo di genotipi di resistenza ai glicopeptidi e l'identificazione a livello di specie di enterococchi clinicamente rilevanti (*Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* ed *E. casseliflavus*) (81). Inoltre, sono stati sviluppati anche metodi basati sulla PCR per migliorare l'individuazione e la sorveglianza degli enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE), che sono gravi patogeni nosocomiali legati a mortalità e costi elevati; tuttavia, la sensibilità e la specificità possono variare(82).

## 8.5 Ulteriore identificazione e tipizzazione

Dopo le caratteristiche di crescita, morfologia delle colonie, test della catalasi, colorazione di Gram della coltura, risultati sierologici e risultati di identificazione biochimica, se è necessaria un'ulteriore identificazione, inviare l'isolato al laboratorio di riferimento.

Sono stati sviluppati vari metodi di tipizzazione per isolati da campioni clinici; questi includono tecniche molecolari come l'elettroforesi su gel in campo pulsato (PFGE), il sequenziamento del gene dell'rRNA 16S, l'analisi della sequenza del gene atpA e la tipizzazione della sequenza multilocus (MLST). Tutti questi approcci consentono la sottotipizzazione di ceppi non correlati, ma lo fanno con diversi livelli di accuratezza, potere discriminatorio e riproducibilità..

Tuttavia, alcuni di questi metodi rimangono accessibili solo ai laboratori di riferimento e sono difficili da implementare per l'identificazione batterica di routine in un laboratorio clinico.

## Elettroforesi su gel in campo pulsate (PFGE)

La Il PFGE era un metodo di tipizzazione molecolare epidemiologica riproducibile, discriminatoria ed efficace per identificare e classificare streptococchi ed enterococchi in sottotipi(83). La PFGE è risultata superiore per l'interpretazione delle relazioni tra ceppi tra gli enterococchi, ma non ha prodotto bande di DNA discriminanti specie-specifiche(84). A causa della sua natura dispendiosa in termini di tempo (30 ore o più per l'esecuzione) e della necessità di attrezzature speciali, la PFGE non è ampiamente utilizzato al di fuori dei laboratori di riferimento.

## Tipizzazione Multi-locus sequence typing (MLST)

La tipizzazione in sequenza multi-locus (MLST) è una procedura di tipizzazione basata su sequenza robusta e non ambigua per caratterizzare isolati di specie batteriche utilizzando le sequenze di frammenti interni di (solitamente) 7 geni house-keeping(85).

Uno dei principali vantaggi dell'MLST, rispetto alla maggior parte delle procedure di tipizzazione, è che i dati di sequenza sono univoci e lo scambio di dati può essere facilmente confrontato tra diversi laboratori via Internet. È possibile accedere a database e strumenti basati sul web adeguati su PubMLST, che contengono schemi PubMLST per molte specie di streptococchi ed enterococchi come *S. pyogenes* (86), *S. pneumoniae* (87) ed E. *faecalis* (88).

## Sequenziamento dell’intero genoma (WGS)

Questa tecnica determina la sequenza completa del DNA del genoma di un organismo in una sola volta. Il WGS sta diventando una tecnica ampiamente utilizzata nella ricerca, nella diagnostica clinica e nei laboratori di sanità pubblica. Esistono diverse tecniche ad alto rendimento che sono disponibili e utilizzate per sequenziare un intero genoma come il pirosequenziamento, la tecnologia dei nanopori e la tecnologia di sequenziamento per sintesi (SBS).

WGS è uno strumento di genotipizzazione rapido, conveniente e accurato che fornisce informazioni sul rilevamento, l'identificazione, la tipizzazione epidemiologica e la suscettibilità ai farmaci dei patogeni. Il WGS è stato utilizzato nello studio di cluster ospedalieri di infezione invasiva da *Streptococcus agalactiae* di gruppo B nel Regno Unito e in Irlanda (89). Inoltre, il sequenziamento completo del genoma di agenti patogeni come *S. pyogenes* fornisce preziosi riferimenti tassonomici e genomici per la diagnostica delle malattie infettive, nonché riferimenti per studi e applicazioni futuri all'interno del genere *Streptococcus*(90). Anche specie di Enterococcus come *E. faecium* sono state studiate utilizzando il WGS per tracciare gli eventi di trasmissione tra pazienti nei reparti ospedalieri e tra ospedali (91).

## Sequenziamento

**La tipizzazione emm basata sul sequenziamento** mediante l'uso di oligonucleotidi che prendono di mira il terminale N del gene codificante della proteina M è il metodo più pratico di tipizzazione del gruppo A perché il gene che codifica per la proteina M dello *Streptococcus di gruppo* A

contiene una regione ipervariabile soggetta a molti polimorfismi a singolo nucleotide, che serve come base per la tipizzazione emm degli isolati di *S. pyogenes*(92).

**L'analisi della sequenza genica *atpA*** viene utilizzata per differenziare tutte le specie di *Enterococcus* attualmente note sulla base delle loro sequenze atpA e il gene 16S rRNA è molto utile per discriminare i principali gruppi di enterococchi, ad esempio *E. avium*, *E. casseliflavus, E. cecorum*, *E. faecalis* e gruppi di specie *E. faecium*; ma non riesce a discriminare una specie strettamente correlata, inclusi i membri dei gruppi di specie *E. faecalis* ed *E. faecium*. Le specie

Streptococcus non sono facilmente identificabili mediante il sequenziamento del gene dell'rRNA 16S (84,93).

## 8.6 Conservazione e invio

Se necessario, eseguire una subcoltura dell'isolato puro su un becco di agar sangue per l'invio al laboratorio di riferimento

# 9 Reporting

## 9.1 Specialista per infezioni

Informare lo specialista perle infezioni di tutte le colture presunte e confermate di specie *Streptococcus* ed *Enterococcus* e di microrganismi morfologicamente simili isolati da campioni provenienti da sedi normalmente sterili.

A causa del potenziale invasivo della malattia e dello sviluppo di sequele immunologicamente mediate o mediate da tossine, "nuovi" isolati probabilii di *Streptococcus pyogenes* dovrebbero essere portati all'attenzione dello specialista per le infezione in conformità con i protocolli locali, insieme a "grandi colonie ” isolati che possiedono antigeni di gruppo C o G di Lancefield.

Alcune condizioni cliniche devono essere notificate allo specialista per le infezioni associate al laboratorio. In genere, quando la richiesta contiene informazioni pertinenti o aggiuntive che suggeriscono un'infezione streptococcica invasiva o grave come:

- Fenomeni mediati da tossine (Sindrome da Shock Tossico o Scarlattina)
- Fascite o miosite (necrotizzante), sepsi puerperale
- endocardite
- indagine su possibili focolai o apparenti infezioni crociate all'interno di un ospedale o di un'altra istituzione
- modelli insoliti di resistenza antimicrobica, tra cui la vancomicina o altre specie di *Enterococcus* resistenti ai glicopeptidi e *S. pneumoniae* resistente alla penicillina

Secondo i protocolli locali, lo specialista in infezione deve essere informato degli isolati di streptococchi β-emolitici di Lancefield Gruppo B quando:

- l la paziente è gravida,, subito dopo il parto
- neonato

Seguire i protocolli locali per la segnalazione ai medici dei pazienti

.

## 9.2 Identificazione preliminare

L'identificazione presuntiva può essere effettuata se appropriate caratteristiche di crescita, aspetto delle colonie, colorazione di Gram della coltura; catalasi e risultati sierologici sono dimostrati

## 9.3 Conferma dell'identificazione

La conferma dell'identificazione e la tipizzazione epidemiologica per Streptococcus pneumoniae sono effettuate dalla Respiratory and Vaccine Preventable Bacteria Reference Unit (RVPBRU) PHE Colindale

La conferma dell'identificazione e la tipizzazione epidemiologica per GAS, GBS, streptococchi di gruppo G e streptococchi di gruppo C sono effettuati dalla Sezione di riferimento per Staphylococcus and Streptococcus (SSRS) AMRHAI, PHE Colindale.

## 9.4 Health Protection Team (HPT)

Fare riferimento agli accordi locali nelle amministrazioni

## 9.5 Public Health England

Fare riferimento alle attuali linee guida sulla segnalazione SGSS(94).

## 9.6 Infection prevention and control team

Il gruppo di controllo delle infezioni ospedaliere deve essere informato degli streptococchi di gruppo A, delle specie *Enterococcus* resistenti ai glicopeptidi e degli pneumococchi resistenti alla penicillina isolati dai pazienti ricoverati in conformità con i protocolli locali. Dovrebbe essere presa in considerazione la possibilità di informare il personale addetto al controllo delle infezioni di tali isolati da pazienti attualmente nella comunità (comprese le case di cura) in conformità con le disposizioni locali, in particolare se si sospetta una trasmissione incrociata

# 10 Invio ai laboratori di riferimento

Tutti i GAS, GBS, streptococchi di gruppo G e streptococchi di gruppo C da malattia invasiva devono essere inviati alla sorveglianza. Dovrebbero essere segnalati anche quelli provenienti da infezioni superficiali associate a un controllo delle infezioni o un'indagine a grappolo. Si prega di informare il laboratorio di riferimento dei dettagli dell'indagine.

Per informazioni sui test offerti, i tempi di consegna, la procedura di trasporto e gli altri requisiti del laboratorio di riferimento consultare la Specialist and reference microbiology: laboratory tests and services page su GOV.UK per manuali utente e moduli di richiesta

I microrganismi con resistenza insolita o inaspettata, o associati a un problema di laboratorio o clinico, o un'anomalia che richiede indagini devono essere inviati al laboratorio di riferimento appropriato.

Contattare il laboratorio nazionale di riferimento decentrato appropriato per informazioni sui test disponibili, tempi di consegna, procedura di trasporto e qualsiasi altro requisito per l'invio del campione:

## Sezione di riferimento per Staphylococcus e Streptococcus Reference Section

Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections Reference Unit (AMRHAI)
National Infection Service
Public Health England
61 Colindale Avenue
London
NW9 5EQ

## Enterococchi

Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections Reference Unit (AMRHAI)
Microbiology Services
Public Health England
61 Colindale Avenue
London
NW9 5EQ

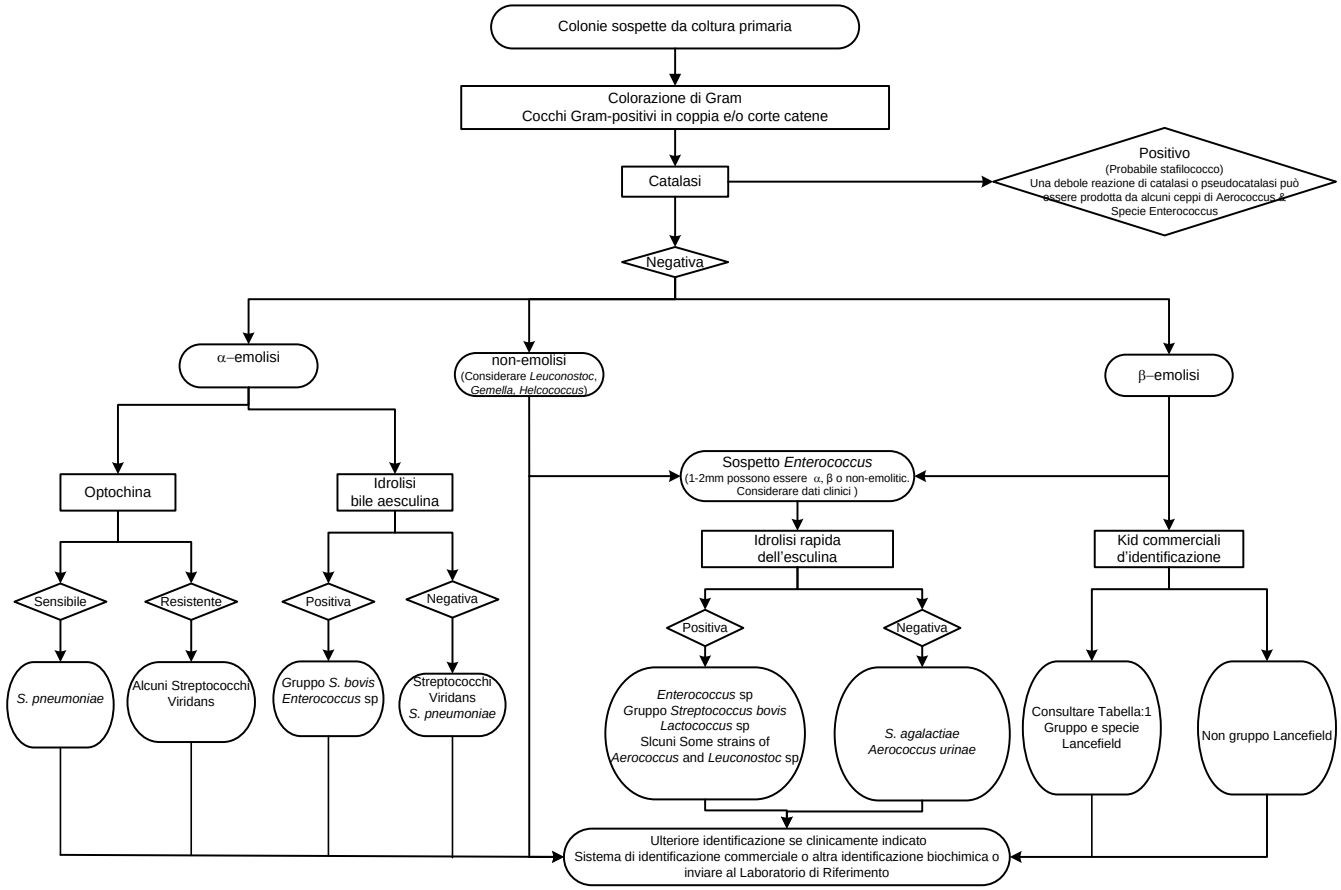
England and Wales

Scotland

Northern Ireland

# Appendice 1: Identificazione di specie *Streptococcus*, specie *Enterococcus* e microrganismi morfologicamente simili

Una descrizione accessibile di questo diagramma di flusso è fornita in questo documento




Il diagramma di flusso è solo indicativo e per l'identificazione delle specie nei casi in cui è richiesta la conferma con una tecnica alternativa o non sono disponibili metodi automatizzati

1 Alcuni *S. pneumoniae* possono essere resistenti all'optochina: se c'è un sospetto clinico di infezione pneumococcica, confermare eseguendo il test di solubilità della bile

2 Ceppi occasionali di *S. oralis*, *S. mitis* e *S. pseudopneumoniae* possono essere sensibili all'optochina:

*S. pseudopneumoniae* optochina resistente quando incubato in un eccesso di $CO_2$

3 Alcuni ceppi di *Aerococcus* and *Leuconostoc* spp posssono idrolizzare l'esculina

# Bibliografia

Per le informazioni relative alle valutazioni del grado di evidenza fornite, fare riferimento al scientific information section on the UK SMI website.


1. Whiley RA, Hardie JM Genus, *Streptococcus*, *Enterococcus* and related species: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 1st ed.: Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust; 2015. **++**

2. De la Maza LM Color atlas of medical bacteriology. Washington, DC, Hoboken, NJ: ASM Press, Wiley; 2020. **++**

3. Tian Z, Lu S, Jin D, Yang J, Pu J, Lai XH et al. *Streptococcus chenjunshii* sp. nov. isolated from feces of Tibetan antelopes. International journal of systematic and evolutionary microbiology 2019;69:1237-43.**2+** 10.1099/ijsem.0.003303

4. Foster G, Kirchner M, Muchowski J, Duggett N, Randall L, Knight HI et al. *Streptococcus caledonicus* sp. nov., isolated from sheep. International journal of systematic and evolutionary microbiology 2020;70:2611-5.**2+** 10.1099/ijsem.0.004081

5. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clinical microbiology reviews 2002;15:613-30.**+** 10.1128/cmr.15.4.613-630.2002

6. Carroll KC, Pfaller MA Manual of clinical microbiology. Washington, DC: ASM Press; 2019. **++**

7. Delost MD Introduction to Diagnostic Microbiology for the Laboratory Sciences. Burlington, UNITED STATES: Jones & Bartlett Learning, LLC; 2020. **++**

8. Abraham T, Sistla S. Identification of *Streptococcus pyogenes* - Phenotypic Tests vs Molecular Assay (spy1258PCR): A Comparative Study. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR 2016;10:Dc01-3.**3+** 10.7860/jcdr/2016/20053.8093

9. Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA. *Streptococcus pyogenes*: Basic Biology to Clinical Manifestations Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016 2016.**+**

10. Facklam RR, Thacker LG, Fox B, Eriquez L. Presumptive identification of streptococci with a new test system. J ClinMicrobiol 1982;15:987-90.**2+**

11. Brandt CM, Haase G, Schnitzler N, Zbinden R, Lütticken R. Characterization of blood culture isolates of *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* possessing Lancefield's group A antigen. Journal of clinical microbiology 1999;37:4194-7.**3+** 10.1128/JCM.37.12.4194-4197.1999

12. Thompson T, Facklam R. Cross-reactions of reagents from streptococcal grouping kits with *Streptococcus porcinus* 1997;35:1885-6.**2+**

13. Shakir SM, Gill R, Salberg J, Slechta ES, Feldman M, Fritsche T et al. Clinical Laboratory Perspective on *Streptococcus halichoeri*, an Unusual Nonhemolytic, Lancefield Group B *Streptococcus* Causing Human Infections. Emerging infectious diseases 2021;27:1309-16.**2+** 10.3201/eid2705.203428

14. Pinho MD, Foster G, Pomba C, Machado MP, Baily JL, Kuiken T et al. *Streptococcus canis* Are a Single Population Infecting Multiple Animal Hosts Despite the Diversity of the Universally

Present M-Like Protein SCM. Frontiers in microbiology 2019;10:631-.**2+** 10.3389/fmicb.2019.00631

15. Matsue M, Ogura K, Sugiyama H, Miyoshi-Akiyama T, Takemori-Sakai Y, Iwata Y et al. Pathogenicity Characterization of Prevalent-Type *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Strains. Frontiers in microbiology 2020;11:97.**2++** 10.3389/fmicb.2020.00097

16. Alves-Barroco C, Roma-Rodrigues C, Raposo LR, Brás C, Diniz M, Caço J et al. *Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae* isolated from milk of the bovine udder as emerging pathogens: In vitro and in vivo infection of human cells and zebrafish as biological models. Microbiologyopen 2019;8:e00623-e.**2+** 10.1002/mbo3.623

17. Jensen A, Hoshino T, Kilian M. Taxonomy of the Anginosus group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. whileyi subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov. IntJSystEvolMicrobiol 2012.**2+** ijs.0.043232-0 [pii];10.1099/ijs.0.043232-0 [doi]

18. Jiang S, Li M, Fu T, Shan F, Jiang L, Shao Z. Clinical Characteristics of Infections Caused by *Streptococcus Anginosus* Group. Scientific Reports 2020;10:9032.**2++** 10.1038/s41598-020-65977-z

19. Růžičková M, Vítězová M, Kushkevych I. The Characterization of *Enterococcus* Genus: Resistance Mechanisms and Inflammatory Bowel Disease. Open Med (Wars) 2020;15:211-24.**2++** 10.1515/med-2020-0032

20. Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Ozenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. EurJClinMicrobiolInfectDis 2012;31:3073-7.**2+** 10.1007/s10096-012-1667-x [doi]

21. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. ClinMicrobiolRev 2000;13:686-707.**+**

22. Birch BR, Keaney MG, Ganguli LA. Antibiotic susceptibility and biochemical properties of *Streptococcus faecalis* strains reacting with both D and G antisera. J ClinPathol 1984;37:1289-92.**3+**

23. Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PAD, Bouvet A. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and S. *gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 2003;53:631-45.**2+** 10.1099/ijs.0.02361-0

24. Rayanakorn A, Goh B-H, Lee L-H, Khan TM, Saokaew S. Risk factors for *Streptococcus suis* infection: A systematic review and meta-analysis. Scientific reports 2018;8:13358-.**2++** 10.1038/s41598-018-31598-w

25. Nomoto R, Maruyama F, Ishida S, Tohya M, Sekizaki T, Osawa R. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22 and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 2015;65:438-43.**2+** 10.1099/ijs.0.067116-0

26. Tohya M, Arai S, Tomida J, Watanabe T, Kawamura Y, Katsumi M et al. Defining the taxonomic status of *Streptococcus suis* serotype 33: the proposal for *Streptococcus ruminantium* sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 2017;67:3660-5.**2+** 10.1099/ijsem.0.002204

27. Reller LB, Weinstein MP, Werno AM, Murdoch DR. Laboratory Diagnosis of Invasive Pneumococcal Disease. Clinical Infectious Diseases 2008;46:926-32.**+** 10.1086/528798 %J Clinical Infectious Diseases

28. Harju I, Lange C, Kostrzewa M, Maier T, Rantakokko-Jalava K, Haanperä M. Improved Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* and Other S. mitis Group Streptococci by MALDI Biotyper Using an Improved MALDI Biotyper Database Content and a Novel Result Interpretation Algorithm. Journal of clinical microbiology 2017;55:914-22.**2+** 10.1128/JCM.01990-16

29. Doern CD, Burnham C-AD. It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. Journal of clinical microbiology 2010;48:3829-35.**+** 10.1128/JCM.01563-10

30. Keith ER, Podmore RG, Anderson TP, Murdoch DR. Characteristics of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolated from purulent sputum samples. JClinMicrobiol 2006;44:923-7.**2+** 44/3/923 [pii];10.1128/JCM.44.3.923-927.2006 [doi]

31. Téllez A, Ambrosioni J, Llopis J, Pericàs JM, Falces C, Almela M et al. Epidemiology, Clinical Features, and Outcome of Infective Endocarditis due to *Abiotrophia* Species and *Granulicatella* Species: Report of 76 Cases, 2000-2015. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2018;66:104-11.**1+** 10.1093/cid/cix752

32. Collins MD, Lawson PA. The genus *Abiotrophia* (Kawamura et al.) is not monophyletic: proposal of *Granulicatella* gen. nov., *Granulicatella adiacens* comb. nov., *Granulicatella elegans* comb. nov. and *Granulicatella balaenopterae* comb. nov. Int J Syst EvolMicrobiol 2000;50 Pt 1:365-9.**+**

33. Cargill JS, Scott KS, Gascoyne-Binzi D, Sandoe JA. *Granulicatella* infection: diagnosis and management. J Med Microbiol 2012;61:755-61.**2+** jmm.0.039693-0 [pii];10.1099/jmm.0.039693-0 [doi]

34. Giuliano S, Caccese R, Carfagna P, Vena A, Falcone M, Venditti M. Endocarditis caused by nutritionally variant streptococci: a case report and literature review. InfezMed 2012;20:67-74.**2+**

35. Rasmussen M. *Aerococcus*: an increasingly acknowledged human pathogen. Clinical Microbiology and Infection 2016;22:22-7.**+** https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.09.026

36. M R. Aerococci and aeococcal infections. Journal of Infection 2013:1-8.**+**

37. Parvataneni KC, Iyer S, Khatib R, Saravolatz LD. *Facklamia Species* and *Streptococcus pneumoniae* Meningitis: A Case Report and Review of the Literature. Open Forum Infect Dis 2015;2:ofv029-ofv.**2+** 10.1093/ofid/ofv029

38. Elsayed S, Zhang K. *Gemella bergeriae* endocarditis diagnosed by sequencing of rRNA genes in heart valve tissue. J ClinMicrobiol 2004;42:4897-900.**3+** 42/10/4897 [pii];10.1128/JCM.42.10.4897-4900.2004 [doi]

39. Facklam R, Elliott JA. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. ClinMicrobiolRev 1995;8:479-95.**+**

40. Miller AO, Buckwalter SP, Henry MW, Wu F, Maloney KF, Abraham BK et al. Globicatella sanguinis Osteomyelitis and Bacteremia: Review of an Emerging Human Pathogen with an Expanding Spectrum of Disease. Open Forum Infect Dis 2017;4:ofw277-ofw.**2+** 10.1093/ofid/ofw277

41. Fall NS, Raoult D, Sokhna C, Lagier JC. '*Helcococcus massiliensis*' sp. nov., a new bacterial species isolated from the vaginal sample of a woman with bacterial vaginosis living in Dielmo, Senegal. New microbes and new infections 2018;25:27-9.**2+** 10.1016/j.nmni.2018.06.002

42. Collins MD, Facklam RR, Rodrigues UM, Ruoff KL. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from clinical sources: description of *Helcococcus kunzii* gen. nov., sp. nov. IntJSystBacteriol 1993;43:425-9.**2+**

43. Chow S-K, Clarridge JE, 3rd. Identification and clinical significance of *Helcococcus* species, with description of *Helcococcus seattlensis* sp. nov. from a patient with urosepsis. Journal of clinical microbiology 2014;52:854-8.**2+** 10.1128/JCM.03076-13

44. Facklam R, Hollis D, Collins MD. Identification of gram-positive coccal and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. JClinMicrobiol 1989;27:724-30.**2+**

45. Altintas I, Andrews V, Larsen MV. First reported human bloodstream infection with Vagococcus lutrae. New microbes and new infections 2020;34:100649.**2+** https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100649

46. Ikryannikova LN, Filimonova AV, Malakhova MV, Savinova T, Filimonova O, Ilina EN et al. Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. ClinMicrobiolInfect 2012.**3+** 10.1111/1469-0691.12113 [doi]

47. Slotved HC, Facklam RR, Fuursted K. Assessment of a novel bile solubility test and MALDI-TOF for the differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from other mitis group streptococci. Sci Rep 2017;7:7167.**2+** 10.1038/s41598-017-07772-x

48. Sewell DL. Laboratory-associated infections and biosafety. ClinMicrobiolRev 1995;8:389-405.**+**

49. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive 2021. 1-39. **++**

50. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets 2000. **++**

51. 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. 2005. 1-14. **++**

52. 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.**+**

53. Department for Transport, Maritime and Coastguard Agency, HSENI, Civil Aviation Authority. Transport of infectious substances UN2814, UN2900 and UN3373 Guidance note number 17/2012 (revision 7). 2013. **++**

54. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 1-112. 2010. **++**

55. Gizzie N, Adukwu E. Evaluation of Liquid-Based Swab Transport Systems against the New Approved CLSI M40-A2 Standard. J Clin Microbiol 2016;54:1152-6.**2+** 10.1128/JCM.03337-15

56. Health and Safety Executive. Managing risks and risk assessment at work (accessed 28/07/2021). https://www.hse.gov.uk/simple-health-safety/risk/index.htm. **++**

57. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 2009. **++**

58. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002 (as amended). Approved Code of Practice and guidance L5 (sixth edition). HSE Books. 2013. **++**

59. Health and Safety Executive. Risk assessment: A brief guide to controlling risks in the workplace. HSE. 2014. **++**

60. Health and Safety Executive, Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Management and operation of microbiological containment laboratories. HSE. 2019. **++**

61. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books 2003. **++**

62. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967. **++**

63. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001. **++**

64. 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 1998. 1-37. **++**

65. Public Health England. Laboratory reporting to Public Health England: a guide for diagnostic laboratories. PHE. 2020. 1-31. **++**

66. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008. **++**

67. The Royal College of Pathologists. The retention and storage of pathological records and specimens (5th edition). 1-59. 2015. **++**

68. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010. **++**

69. Tyrrell KL, Citron DM, Leoncio ES, Goldstein EJ. Comparison of the Copan eSwab System with an Agar Swab Transport System for Maintenance of Fastidious Anaerobic Bacterium Viability. J Clin Microbiol 2016;54:1364-7.**2+** 10.1128/JCM.03246-15

70. World Health Organization. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019-2020. WHO. 2019. **++**

71. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. JExpMed 1933;57:571-95.**2+**

72. Fuller AT. The formamide method for the extraction of polysaccharides from haemolytic streptococci. BrJExpPathol 1938:130-9.**3+**

73. Maxted WR. Preparation of streptococcal extracts for Lancefield grouping. Lancet 1948;2:255.**3+**

74. Pritt BS, Patel R, Kirn TJ, Thomson RB, Jr. Point-Counterpoint: A Nucleic Acid Amplification Test for *Streptococcus pyogenes* Should Replace Antigen Detection and Culture for Detection of Bacterial Pharyngitis. Journal of clinical microbiology 2016;54:2413-9.**2+** 10.1128/JCM.01472-16

75. Oviaño M, Bou G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Rapid Detection of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Beyond. Clinical microbiology reviews 2018;32:e00037-18.**+** 10.1128/CMR.00037-18

76. Nybakken EJ, Oppegaard O, Gilhuus M, Jensen CS, Mylvaganam H. Identification of *Streptococcus dysgalactiae* using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; refining the database for improved identification. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2021;99:115207.**2+** https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115207

77. Schulthess B, Brodner K, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. Journal of clinical microbiology 2013;51:1834-40.**2+** 10.1128/JCM.02654-12

78. Senneby E, Nilson B, Petersson AC, Rasmussen M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry is a sensitive and specific method for identification of aerococci. JClinMicrobiol 2013;51:1303-4.**2+** JCM.02637-12 [pii];10.1128/JCM.02637-12 [doi]

79. Shin JH, Pride DT. Comparison of Three Nucleic Acid Amplification Tests and Culture for Detection of Group B *Streptococcus* from Enrichment Broth. Journal of clinical microbiology 2019;57:e01958-18.**2+** 10.1128/JCM.01958-18

80. Ganaie FA, Govindan V, Ravi Kumar KL. Standardisation and evaluation of a quantitative multiplex real-time PCR assay for the rapid identification of *Streptococcus pneumoniae*. Pneumonia 2015;6:57-66.**2+** 10.15172/pneu.2015.6/559

81. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. JClinMicrobiol 1995;33:1434.**2+**

82. Seo JY, Kim PW, Lee JH, Song JH, Peck KR, Chung DR et al. Evaluation of PCR-based screening for vancomycin-resistant enterococci compared with a chromogenic agar-based culture method. Journal of medical microbiology 2011;60:945-9.**2+** 10.1099/jmm.0.029777-0

83. Patterson J, Kelly C. Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool for enterococci and streptococci. Methods in cell science 1998;20:233-9.**2+**

84. Naser S, Thompson FL, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I et al. Phylogeny and identification of Enterococci by atpA gene sequence analysis. Journal of Clinial Microbiology 2005;43:2224-30.**2+** 10.1128/jcm.43.5.2224-2230.2005

85. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res 2018;3:124-.**2++** 10.12688/wellcomeopenres.14826.1

86. Enright MC, Spratt BG, Kalia A, Cross JH, Bessen DE. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone. InfectImmun 2001;69:2416-27.**2+** 10.1128/IAI.69.4.2416-2427.2001 [doi]

87. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. Microbiology 1998;144 ( Pt 11):3049-60.**3+**

88. Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJM, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic

complexes in a background of high rates of recombination. Journal of clinical microbiology 2006;44:2220-8.**2+** 10.1128/JCM.02596-05

89. Collin SM, Groves N, O'Sullivan C, Jauneikaite E, Patel D, Cunney R et al. Uncovering Infant Group B Streptococcal (GBS) Disease Clusters in the United Kingdom and Ireland Through Genomic Analysis: A Population-based Epidemiological Study. Clinical Infectious Diseases 2021;72:e296-e302.**2++** 10.1093/cid/ciaa1087

90. Salvà-Serra F, Jaén-Luchoro D, Jakobsson HE, Gonzales-Siles L, Karlsson R, Busquets A et al. Complete genome sequences of *Streptococcus pyogenes* type strain reveal 100%-match between PacBio-solo and Illumina-Oxford Nanopore hybrid assemblies. Scientific Reports 2020;10:11656.**2+** 10.1038/s41598-020-68249-y

91. Bayjanov JR, Baan J, Rogers MRC, Troelstra A, Willems RJL, van Schaik W. *Enterococcus faecium* genome dynamics during long-term asymptomatic patient gut colonization. Microbial Genomics 2019;5.**2+** https://doi.org/10.1099/mgen.0.000277

92. Beall B, Facklam R, Thompson T. Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. JClinMicrobiol 1996;34:953-8.**2+**

93. Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S et al. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. PLoS One 2015;10:e0117617.**2+** 10.1371/journal.pone.0117617

94. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. Public Health England 2016. 1-29. **++**