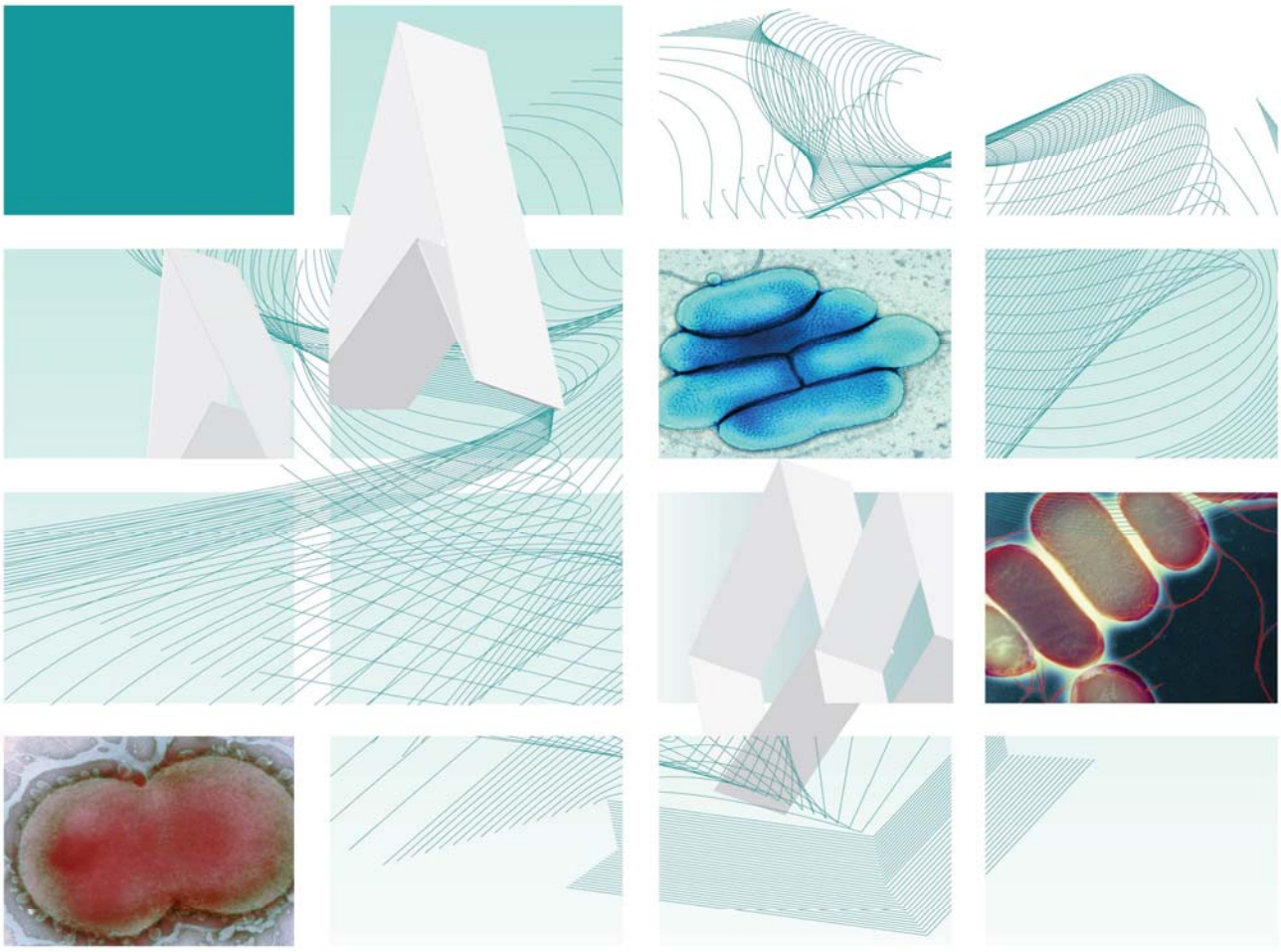
Public Health England

NHS

Protezione e miglioramento della salute nazionale

Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito

Identificazione di actinomiceti aerobi



NICE accredited
www.nice.org.uk/accreditation

Emesso da the Standards Unit, Microbiology Services Division,PHE

© Crown copyright 2015

Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Public Health England (PHE) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare https://www.gov.uk/government/groups/standards-for-microbiology-investigations-steering-committee).

Si ringraziano per contributi forniti i numerosi operatori dei laboratori clinici, gli specialisti e i laboratori di riferimento che hanno fornito informazioni e commenti durante lo sviluppo di questo documento. Si ringraziano i Revisori Medici per le modifiche apportate ai contenuti clinici.

Per ulteriori informazioni contattare:

Standards Unit
Microbiology Services
Public Health England
61 Colindale Avenue
London NW9 5EQ
E-mail: standards@phe.gov.uk

Website:https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories.

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

I loghi sono aggiornati al momento della pubblicazione

Contenuti

RINGRAZIAMENTI 2
TABELLA MODIFICHE 4
SCOPO DEL DOCUMENTO 8
INTRODUZIONE 8
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI 15
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA 17
2 MICRORGANISMI BERSAGLIO 17
3 IDENTIFICAZIONE 17
4 DIAGRAMMA DI FLUSSO PER IDENTIFICAZIONE DI ACTINOMICETI AEROBI 23
5 REFERTAZIONE 23
6 INVIO 23
7 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE 24
BIBLIOGRAFIA 25

NICE accredited
www.nice.org.uk/accreditation

NICE ha accreditato la procedura usata dalla Public Health England per elaborare gli Standards for Microbiology Investigations. L'accreditamento è valido per 5 anni dal Luglio 2011. Informazioni più dettagliate sull'accreditamento possono essere consultate: www.nice.org.uk/accreditation.

Per ulteriori informazioni sul nostro accreditamento consultare: : www.nice.org.uk/accreditation

Tabella delle Modifiche

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso la standards@phe.gov.uk.

I documenti nuovi o revisionati devono essere controllati in ciascun laboratorio in accordo con il sis Modifica No/Data. tema locale di gestione della qualità.

Modifica No/Data.	5/21.03.16
Emissione eliminata. no.	2
Emissione inserita no.	2.1
Sezione(i) interessate	**Modifica**
Documento intero	Corretti errori di ortografia. Modifiche minori di formattazione.

Modifica No/Data.	4/15.01.15
Emissione eliminata. no	1.3
Emissione inserita no.	2
Sezione(i) interessate	**Modifica**
Modifica	Collegamenti ipertestuali aggiornati a gov uk.
Pagina 2	Loghi aggiornati e aggiunti.
Documento intero	Documento presentato in nuovo formato. Riorganizzazione di parte un testo. Edito per chiarezza. Procedure dei test aggiornate. Aggiornate le informazioni per il di contatto con il Laboratorio di Riferimento .
Introduzione	Aggiornata tassonomia dei generi patogeni appartenenti agli Actinomiceti aerobi Aggiunte maggiori informazioni alla sezione Caratteristiche. Le specie clinicamente significative sono state raggruppate e sono state descritte le loro caratteristiche. Utilizzare l'aggiornamento bibliografico. Sono state rimosse informazioni sulla sezione Principi d'identificazione dalla sezione Informazione tecnica/limitazioni.

Informazione tecnica/limitazioni.	Alcune informazioni sono-stato rimosse da questa sezione e inserite nella sezione appropriata. Aggiornata l'informazione sui sistemi commerciali d'identificazione.
Microrganismi bersaglio.	La sezione sui microrganismi bersaglio è stata aggiornata e presentata in modo chiaro. Aggiornata bibliografia.
Identificazione.	Emendamenti e aggiornamenti eseguiti su 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4 sono-stati aggiornati per riflettere gli standard nella pratica. Anche la tabella 3.3 è stata modificata e aggiornata. La sottosezione 3.5 è-stato aggiornata per includere i Metodi Molecolari Rapidi.
Diagramma di flusso per identificazione.	Informazioni fornite per come identificare questi microrganismi che presentano costantemente una considerevole diversità morfologica tra i diversi generi.
Refertazione .	Le sottosezioni 5.1, 5.3, 5.5 e 5.6-sono-state aggiornate per riflettere la metodologia di segnalazione.
Invio.	Aggiornato l'indirizzo del laboratorio di riferimento.
Bibliografia.	Bibliografia in parte aggiornata

SMI del Regno Unito[#]: Scopo e Obiettivo

Utilizzatori delle SMI

Nel Regno Unito le SMI sono principalmente destinate come risorsa generale ai professionisti che operano nel campo della medicina di laboratorio e delle malattie infettive. Le SMI forniscono ai clinici informazioni in merito allo standard dei servizi di laboratorio riferibili alle ricerche per la diagnosi delle infezioni nei loro pazienti e le documentazioni forniscono indicazioni che facilitano la prenotazione elettronica di tests appropriati. Le SMI forniscono gli standard per le ricerche microbiologiche anche ai responsabili della sanità pubblica che devono considerarle come parte delle procedure da adottare per la salute (sia clinica che pubblica) per la propria popolazione.

Informazioni di base per le SMI

Le SMI comprendono algoritmi e procedure raccomandate che riguardano tutte le componenti del processo diagnostico dalla fase pre-analitica (sindrome clinica) alle diverse fasi analitiche (prove di laboratorio) e post-analitiche (interpretazione e comunicazione dei risultati).Gli algoritmi delle sindromi sono corredati da informazioni più dettagliate contenenti consigli sulle indagini per specifiche malattie e infezioni. Note orientative riguardano il contesto clinico, la diagnosi differenziale e indagini appropriate per particolari condizioni cliniche. Le note orientative descrivono metodologie di laboratorio essenziali che sono alla base della qualità, ad esempio la validazione della prova.

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

Collaborazione paritaria

La preparazione e stesura delle SMI è effettuata mediante collaborazione paritaria fra PHE, NHS, Royal College of Pathologists e le organizzazioni professionali.L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories. L'inclusione del logo di una organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del comitato direttivo e dei Gruppi di Lavoro che sviluppano le SMI. Le opinioni dei rappresentanti possono non essere rigorosamente conformi a quelle dei membri delle organizzazioni a cui appartengono né a quelle delle loro organizzazioni. I rappresentanti prescelti rappresentano uno strumento bidirezionale per la consultazione e dialogo. Le opinioni espresse sono ricercate con un processo di consultazione. Le SMI sono sviluppate, revisionate ed aggiornate con un ampio processo di consultazione

Assicurazione di qualità

Il NICE (National Institute for Health and Care Excellence) ha accreditato la procedura utilizzata dai Gruppi di Lavoro per produrre le SMI L'accreditamento è applicabile a tutte le linee guida prodotte dall'Ottobre del 2009. La procedura per lo sviluppo delle SMI è certificata dalla ISO 9001:2008. Le SMI rappresentano una procedura standard di buona qualità pratica alla quale si devono attenere per la propria attività tutti i laboratori di microbiologia clinica e di sanità pubblica del Regno Unito. Le

[#] Microbiologia è usato come termine generico per includere le due specialità di Microbiologia Medica riconosciute dal GMC (General Medical Council), (che comprende Batteriologia, Micologia e Parassitologia) e la Virologia Medica.

SMI sono accreditate dal NICE e non rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio disponibili nel Regno Unito. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche addizionali qualora opportune. Le SMI aiutano i laboratori a soddisfare i requisiti dell'accreditamento con la promozione di procedure d'elevata qualità che possono essere verificate. Le SMI forniscono inoltre un punto di riferimento per lo sviluppo del metodo. Le prestazioni della SMI dipendono dal personale ben addestrato e dalla qualità dei reagenti e delle attrezzature utilizzate. I laboratori dovrebbero assicurare che tutti i reagenti di tipo commerciale e quelli messi a punto in laboratorio siano stati validati e risultati idonei allo scopo. I laboratori devono partecipare a programmi di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

Coinvolgimento del paziente e della comunità

Nello sviluppo delle SMI i rispettivi Gruppi di Lavoro sono impegnati per favorire il coinvolgimento dei pazienti e dell'opinione pubblica. Grazie al coinvolgendo pubblico, di operatori sanitari, ricercatori e organizzazioni di volontariato la SMI risultante sarà strutturalmente valida e atta a soddisfare le esigenze dell'utente. L'opportunità di partecipazione per contribuire alla consultazione è estesa al pubblico con l'accesso libero al nostro sito web

Informazione della gestione e dei dati sensibili

La PHE è un'organizzazione che condivide le direttive Caldicott. Ciò significa prendere ogni possibile precauzione per prevenire la diffusione non autorizzata di informazioni sui pazienti e di garantire che le informazioni relative agli stessi siano mantenute in condizioni di sicurezza. Lo sviluppo di metodi SMI è assoggetto agli obiettivi PHE di Uguaglianza https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/equality-and-diversity.

I Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità di consultazione efficace con gli appartenenti al pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialistici coinvolti.

Dichiarazione legale

Mentre ogni cura è stata intrapresa per la preparazione delle SMI, PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, deve, per quanto possibile in base a qualunque legge vigente, escludere la responsabilità per tutte le perdite, costi, reclami, danni o spese derivanti da o connessi all'uso di una SMI o con qualsiasi informazione ivi contenuta. Se si apportano modifiche a una SMI, si deve porre in evidenza dove e da chi sono state effettuate tali modifiche.

Le conoscenze di base e la tassonomia microbica per la SMI sono le più complete possibili, al momento della pubblicazione. Eventuali omissioni e nuove informazioni saranno considerate nel corso della prossima revisione. Queste procedure standard (SMI) possono essere sostituite solo da revisioni dello standard, azione legislativa, o in seguito ad indicazioni da parte dell'ente accreditato NICE.

I diritti d'autore delle SMI sono della "Crown" e questi dovrebbero essere riconosciuti quando appropriato.

Citazione suggerita per questo documento

Public Health England. (6). Identification of Aerobic Actinomycetes. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 10 Emissione 2.1 https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories

Scopo del Documento

Questa SMI descrive la procedura d'identificazione dei bacilli Gram-positivi ramificati isolati da campioni clinici. Le colonie possono essere isolate su agar sangue o terreni contenenti uovo.

Questa SMI deve essere usata insieme alle altre SMI.

Introduzione

Tassonomia

La classificazione del gruppo che comprende i bastoncini Gram-positivi ramificati è complessa. Differenze morfologiche considerevoli sono presenti non solo nell'ambito dei generi ma anche fra i ceppi dello stesso taxon.

Caratteristiche[1]

La maggior parte degli attinomiceti è in genere Gram positiva, di aspetto filamentoso, parzialmente acido-resistente, i batteri sono ramificati e hanno molte caratteristiche microbiologiche in comune con gli appartenenti ai generi *Mycobacterium* e *Corynebacterium*. I principali gruppi dell'ordine *Actinomycetales*, sono actinoplanetes, maduromycetes, attinomiceti nocardiformi e streptomycetes[2].

Anche se gli actinomiceti aerobici sono raramente insolati nella pratica clinica, sono considerati importanti agenti potenziali di gravi infezioni umane e animali.

I generi patogeni compresi negli actinomiceti aerobici sono *Nocardia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella* e *Tropheryma whipplei*.

Specie Nocardia[2-5]

Al genere *Nocardia* attualmente appartengono 100 specie che sono state caratterizzate con metodi fenotipici e molecolari, e oltre 30 specie sono riscontrate nell'uomo. Poche di queste sono state recentemente assegnate ad altri generi. Il genere comprende diverse specie note per essere causa insolita di un ampio spettro di malattie cliniche nell'uomo e negli animali. Mentre la maggior parte delle infezioni da nocardia è stata attribuita a *Nocardia asteroides*, sono state descritte altre specie patogene di *Nocardia* quali *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia otitidiscaviarum* e *Nocardia transvalensis*. Una recente revisione tassonomica di *N. asteroides* taxon, ha separato questa in due nuove specie *N. farcinica* e *Nocardia nova*.

Le specie *Nocardia* producono ife vegetative da forme rudimentali ad ampiamente ramificate, con diametro di 0.5 - 1.2µm che crescono sulla superficie e penetrano nel'agar. Le ife spesso si frammentano in elementi a forma di bastoncino o coccoide. Sono spesso prodotte ife aeree. Sulle ife aeree possono essere trovate catene di conidi brevi o lunghi e occasionali ife sul substrato. Le cellule assumono colorazione da Gram positiva a Gram-variabile. Sono di solito parzialmente acido-resistenti per presenza nella loro parete cellulare di acidi micolici di lunghezza intermedia. La crescita è aerobia, producendo colonie gessose, opache o vellutate. Macroscopicamente, possono mancare ife aeree visibili, o possono essere sparse, o molto abbondanti. La morfologia delle colonie varierà in base al terreno o alla temperatura di incubazione. Le colonie possono assumere colore marrone, marrone chiaro, rosa, arancio, rosso, viola, grigio o bianco. Sui terreni solidi le colonie possono essere a superficie liscia e umida o granulare, irregolare, rugosa o addensate con superficie vellutata dovuta alla presenza di filamenti, o più frequentemente, con aspetto gessoso. Possono essere prodotti pigmenti solubili di colore marrone o giallo.

Le *Nocardia* sono catalasi positive e crescono su terreni agar Sabouraud glucosio, agar infuso cuore cervello e agar di Lowenstein-Jensen. L'aggiunta di anidride carbonica (10%) favorisce una crescita più rapida. Su agar Sabouraud destrosio, le colonie del complesso *N asteroides* variano dal colore rosa salmone all'arancione. Le colonie di *N. brasiliensis* sono di solito di colore arancione-marrone rossiccio. Le colonie *N. otitidiscavarum* sono marrone chiaro, mentre *N. transvalensis* può variare di colore dal marrone rossiccio chiaro al viola. Le colonie in coltura pura possono crescere dopo sole 48 ore di incubazione. Nelle culture miste, altri batteri a crescita rapida possono nascondere quelle piccole della specie *Nocardia* che possono richiedere alcune settimane per svilupparsi. Il terreno modificato di Thayer Martin o quello con agar carbone-estratto di lievito tamponato può migliorare l'isolamento delle specie *Nocardia*.

L'esame microscopico di campioni clinici alla colorazione Gram può fornire una diagnosi rapida e specifica. Sono caratteristici per specie *Nocardia* filamenti sottili, delicati, da debolmente a intensamente Gram positivi. Devono essere saggiati più campioni clinici con l'esame colturale. Le specie *Nocardia* non possono essere rilevate se non è esaminato il pus ottenuto dall'emissione del materiale di scarico di una fistola o da un ascesso. Gli strisci e le colture dei campioni sono spesso negativi tranne che per i campioni prelevati con biopsia. Le emocolture di routine non sono di solito positive. Molte specie *Nocardia* ottenute da materiale clinico sono variabilmente acido resistenti su isolamento primario. Questa caratteristica è rapidamente persa nelle colonie delle sottocolture. Può essere usata la colorazione modificata di Kinyoun che decolora con acido debole (1-2% di acido solforico in sostituzione di acido-alcool). Da un paziente con esordio clinico compatibile non dovrebbe mai essere ignorata anche una sola colonia di nocardia isolata da LCR o da sede normalmente sterile, quale ascesso dei tessuti molli, spazio pleurico o liquido articolare. Questi microrganismi sono raramente contaminanti di laboratorio e non fanno parte della normale flora del corpo umano. Le procedure di digestione dell'espettorato (ad esempio con N-acetil-L-cisteina o idrossido di sodio) possono produrre risultati falsi negativi su alcuni campioni di espettorato positivi per *Nocardia*. Attualmente non sono disponibili accertamenti sierodiagnostici rapidi per identificare i pazienti con nocardiosi attiva.

Le principali prove biochimice che differenziano le tre principali specie *Nocardia* patogene, *N. asteroides, N. brasiliensis*, e *N. otitidiscaviarum*, includono la digestione della caseina, xantina, tirosina, e ipoxantina. Tuttavia, questi metodi d'identificazione non differenziano il complesso *N. asteroides* dalle specie *Nocardia* non patogene, *Nocardia camea*, *Nocardia amarae*, e *Nocardia brevicatena* o dalle specie dei generi *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonia,* e *Tsukamurella*. In passato, l'uso di questi pochi test biochimici e la sola morfologia hanno definito il genere *Nocardia* caratterizzato da estrema eterogeneità. In particolare, la consistenza e la composizione del terreno possono influenzare la crescita e la stabilità delle ife aeree e quelle del substrato. Una caratteristica morfologica non coerente del genere *Nocardia* include conidi ben sviluppati in *N. brevicatena* e spore meno ben formate in alcuni ceppi di *N. asteroides*.

Poiché le specie *Nocardia* sono ubiquitarie in natura, l'isolamento di questi microrganismi dai campioni non può essere clinicamente significativo. La presenza di *Nocardia* nella cultura dell'espettorato non può essere sempre considerata un'infezione invasiva, ma può essere dovuta a contaminazione di laboratorio o a colonizzazione respiratoria.

Le difficoltà cliniche e microbiologiche comprendono l'esordio non specifico dell'infezione, la frequente richiesta di procedure bioptiche e diagnostiche invasive, difficoltà di isolare le specie *Nocardia* e problemi nell'identificazione e la classificazione tassonomica.

N. farcinica è spesso identificata erroneamente come *N. asteroides*, o *Rhodococcus* o specie *Gordonia*.

Specie *Streptomyces*[1,4,6]

Streptomyces è il genere più numeroso degli Actinobacteria ed è anche il genere tipo della famiglia delle *Streptomycetaceae*. Ora sono state descritte 600 specie e 38 sottospecie di batteri *Streptomyces*. Le specie *Streptomyces* sono Gram positive e producono ife vegetative con diametro di 0,5 - 2.0μm che formano un micelio ampiamente ramificato che raramente si frammenta. Questo matura per formare catene di tre o più spore non mobili. Poche specie producono spore sul micelio nel substrato. Le cellule non sono acido-alcol resistenti. La parete cellulare è priva di acidi micolici ma contiene grandi quantità di acido diaminopimelico L- (L-DAP). La crescita è aerobica obbligata e la temperatura di ottimale è di 25° C - 35° C, anche se alcune specie crescono a temperature comprese nell'intervallo degli psicrofili e dei termofili. Inizialmente le colonie prodotte sono di solito a superficie liscia, ma in seguito sviluppano micelio aereo che può apparire fioccoso, granulare, polverulento o vellutato. Le colonie sono isolate, lichenoidi, coriacee o butirrose. I miceli vegetativi e aerei sono talvolta pigmentati e possono essere prodotti pigmenti diffusibili. Il metabolismo è ossidativo. Sono anche positivi per la prova della catalasi e riducono i nitrati a nitriti, degradano esculina, caseina, gelatina, amido e L. tirosina.

Le specie *Streptomyces* sono le più diffusamente conosciute per la loro capacità di sintetizzare antibiotici. Oltre 50 differenti antibiotici sono stati isolati da specie *Streptomyces*, che fornisce al mondo la maggior parte di questi farmaci.

Le specie sono ampiamente distribuite e abbondanti nel suolo. Alcune sono patogene per l'uomo. *S. somaliensis* e *S. sudanensis* sono associate a infezioni quali il micetoma. In Sudan sono pure associati al micetoma *Aspergillus nidulans* e *Curvularia lunata*.

La differenziazione del genere *Streptomyces* rimane difficile perché la determinazione delle sue dimensioni fisiche non sembra praticabile e non è nota la composizione chimica dei pigmenti che determina i colori del micelio aereo.

Specie Rhodococcus[1,4,7,8]

Attualmente sono note 50 specie di *Rhodococcus* e 11 sono state ri-assegnate ad altri generi. Le specie *Rhodococcus* sono di solito Gram positive. Le cellule formano cocchi o corti bastoncini che crescono in lunghezza e possono formare un micelio vegetativo ampiamente ramificato che si può frammentare. Non sono generalmente prodotte ife aeree microscopiche e spore. Non sono mobili. Di solito sono parzialmente acido resistenti per presenza nelle loro pareti cellulari di acido micolico. Tutti i rodococchi isolati da campioni clinici sono debolmente acido resistenti. Le colonie di altri rodococchi possono essere ruvide, lisce o mucoidi e pigmentate di color crema, camoscio, gialle, corallo, arancio o rosse. Si possono osservare varianti incolori, in particolare di *Rhodococcus equi*. L'incubazione a 30° C aumenta il loro isolamento. La crescita si avviene in condizioni aerobiche.

Sebbene i test biochimici aiutino a differenziare i *Rhodococcus* dagli altri microrganismi, ciò può essere difficile per altri actinomiceti aerobi. La morfologia delle colonie e quella cellulare non possono essere utilizzate per differenziare *Rhodococcus*, *Gordonia* e le specie *Tsukamurella*. Le specie *Rhodococcus* reagiscono positivamente a catalasi, riduzione dei nitrati, e test di idrolisi dell'urea e negativamente a ossidasi, idrolisi della gelatina, e riduzione dei carboidrati. La loro incapacità a fermentare i carboidrati è un carattere importante per distinguerli dai Corynebacteria.

Tra le specie che sono rimaste nel genere riclassificato, *R. equi* sembra avere l'importanza clinica maggiore come potenziale causa di infezioni negli animali e nell'uomo. E 'stato identificato come agente di infezioni potenzialmente letali nei pazienti gravemente immunocompromessi, in particolare, in quelli con infezione da HIV ed è stato associato a infezioni polmonari e cutanee.

La morfologia microscopica di *R. equi* nelle culture è ciclica, variando da bacillare a coccoide, in funzione del tempo di incubazione e delle condizioni di crescita. Tutti i rodococchi da campioni clinici sono in genere debolmente acido resistenti quando colorati con metodo modificato di Kinyoun o con quello di Ziehl-Neelsen. La morfologia della colonia di *R. equi* è diversa e si presenta con tre varietà principali. La tipologia classica della colonia assume colore rosa pallido e viscida dopo 2 - 4 giorni su agar infusione di cuore cervello o agar infusione di cuore contenente sangue di coniglio 5% con incubazione aerobica a 35° C. Il secondo tipo di colonia più frequente assume colore corallo e non è viscida se coltivata sullo stesso terreno in condizioni di incubazione simili. Il terzo, meno frequente, sviluppa una colonia che assume colore giallo pallido, non viscosa, più opaca rispetto al classico tipo viscido, ed è identica a quella del ceppo tipo di *R. equi*.

Specie Oerskovia[1,4,9]

Sono attualmente note 5 specie. Le specie *Oerskovia* producono abbondante ramificazione di ife vegetative di circa 0.5μm di diametro che crescono in superficie e penetrano nell'agar. Le ife si frammentano in bastoncini mobili, flagellati. Possono essere osservati anche ceppi non mobili. Si forma un micelio aereo. Le cellule sono Gram positive, anche se parte del tallo può diventare Gram negativo con l'invecchiamento e possono essere osservate cellule corineiformi. La crescita si sviluppa in anaerobiosi facoltativa; il test della catalasi è positivo quando la cresciuta è aerobica e negativo in condizioni di sviluppo anaerobico. La maggior parte dei ceppi può essere pigmentata di colore giallo. Il glucosio è metabolizzato in via ossidativa e fermentativa.

La maggior parte delle infezioni da *Oerskovia* è associa a un dispositivo protesico permanente e si risolve dopo la sua rimozione.

Specie Actinomadura[1,4,10]

Attualmente di questo genere sono note 75 specie e 2 sottospecie, ma nella bibliografia solo 37 specie sono quelle denominate validamente, 20 sono state riclassificate in altri generi. Poiché la tassonomia delle specie di alcuni ceppi rimane incerta, sono necessari ulteriori studi comparativi.

Actinomadura madurae e *Actinomadura Pelletieri* sono le uniche due specie di importanza clinica appartenenti a questo genere.

Le specie *Actinomadura* producono abbondante ramificazione di ife vegetative che formano nel substrato un micelio fitto privo di frammentazioni. Il micelio aereo può essere assente o moderatamente sviluppato per formare catene di artrospore brevi o occasionalmente lunghe una volta giunto a maturazione. Le catene di spore formano spirali diritte, uncinate o irregolari. Il micelio aereo può essere di colore blu, marrone, crema, grigio, verde, rosa, rosso, bianco o giallo. Quando il micelio aereo è assente le colonie hanno aspetto coriaceo o cartilagineo. Le colonie sono solitamente mucoidi e assumo aspetto di un dente molare dopo 2 giorni di incubazione a 35° C. La crescita è aerobica e si realizza nell'intervallo di temperatura compreso fra 10° C - 60° C. Le cellule sono Gram positive e non acido-resistenti.

A. madurae può essere distinta in modo affidabile da *A. Pelletieri* sulla base delle prove biochimiche. Entrambe idrolizzano la caseina e possono idrolizzare ipoxantina e tirosina, ma solo *A. madurae* idrolizza l'esculina*. A. Pelletieri* sono asaccarolitiche, diversamente da *A. madurae*. Le prime producono acido solo da glucosio e trealosio, mentre *A. madurae* producono acido da

adonitolo, arabinosio, cellobiosio, mannitolo, trealosio, xilosio, glicerolo, mannosio, mannitolo e ramnosio.

Specie *Tsukamurella*[1,11,12]

Sono attualmente note 11 specie. *Tsukamurella* è costituita da bastoncini dritti o leggermente curvi di 0,5-0,8 x 1.0 - 5.0µm. Molti di loro possono anche essere presenti come brevi bastoncini. Le cellule sono Gram positive e debolmente o intensamente acido resistenti, si osservano in forma isolata, in coppia o associate. Non sono mobili, non sporigene e non producono ife aeree. La crescita è aerobia obbligata, producono colonie piccole, convesse di colore da bianco/crema ad arancio con diametro di 0,5 - 2,0 mm, bordo asciutto, a volte rizoide, sono facilmente emulsionabili. La temperatura di crescita ottimale è inferiore a 37° C. La morfologia della colonia e delle cellule non consente la possibilità di distinguere tra *Rhodococcus, Gordonia e Tsukamurella.*

Tutte le specie *Tsukamurella* sono resistenti al lisozima, sono positive alla catalasi, idrolisi con tween 80, ureasi, pirazinamidasi, assorbimento del ferro, e tolleranza al 5% di cloruro di sodio, negative alla riduzione dei nitrati e arilsulfatasi, tranne *Tsukamurella wratislaviensis*.

Le specie *Tsukamurella* causano malattia soprattutto nei soggetti immunocompromessi. Le infezioni da questi microrganismi sono state associate a malattie polmonari croniche, soppressione immunitaria (leucemie, tumori e infezione da HIV / AIDS) e infezioni post-operatorie della ferita.

Specie Gordonia[4,13-15]

Il genere *Gordonia* appartiene filogeneticamente al sottordine *Corynebacterineae*, gruppo acido micolico compreso nell'ordine *Actinomycetales*, e la sua classificazione è profondamente cambiata negli ultimi anni, con alcune specie che sono state riclassificate e molte nuove descritte. Allo stato attuale, il genere *Gordonia* comprende 36 specie validamente descritte, delle quali 9 sono note per aver causato infezioni nell'uomo.

Le cellule sono rappresentate da bastoncini corti o da cocchi che assomigliano a sottili perline coccobacillari. Sono Gram positive o Gram-variabili e di solito sono parzialmente acido-resistenti. Non generano spore. La morfologia della colonia delle specie *Gordonia* varia da viscida, liscia e lucida a irregolare e ruvida; può anche variare all'interno di una specie in funzione del terreno utilizzato per la crescita. Dopo 3-7 giorni di incubazione su agar sangue le colonie sono asciutte, rugose, rilevate e di colore beige, marrone, rosa o arancione e rosso. Nel periodo successivo di incubazione, le colonie possono assumere colore salmone, in modo particolare su agar cioccolato. La crescita è aerobica. L'aspetto delle colonie e la morfologia delle cellule non consentono il riconoscimento tra *Rhodococcus*, *Gordonia* e *Tsukamurella*. Sono dotate di metabolismo ossidativo per i carboidrati.

Le specie *Gordonia* possono essere distinte dalla specie *Nocardia* per la loro incapacità di produrre ife aeree e di crescere in presenza di lisozima.

Le infezioni da *Gordonia* sono piuttosto rare rispetto alle segnalazioni di quelle causate da altri batteri patogeni appartenenti ai generi correlati, quali *Rhodococcus* e *Nocardia.*

Specie *Tropheryma*[16,17]

Questo genere è filogeneticamente posizionato con gli Actinobacteria Gram positivi e *Tropheryma whippeli;* è l'unica specie validamente pubblicata. Questo causa la malattia Whipples, infezione sistemica con sintomi di febbre, perdita di peso, diarrea, poliadenopatia e poliartrite. Sono a volte responsabili di manifestazioni cardiache.

Sono rappresentate da bastoncini brevi non mobili, diametro 0.25- 0.3µm e lunghi 0.8-1.7µm, a volte più lunghi quando la divisione cellulare è compromessa. Al Gram, le strutture batteriche sono tutte mal colorate e appaiono sempre come Gram negative. Non cresce su terreni axenici o in terreni di coltura con cellule eucariote lisate. Per la crescita batterica appare necessaria la presenza di cellule intatte. Cresce bene in o associata alle cellule HEL e MRC-5 in terreno minimo essenziale con siero fetale di vitello al 10% e 2 mM di L-glutammina quando incubate a 37° C in un'atmosfera di CO_2 al 5%. Sono altrettanto ben conservate dal congelamento rapido e dalla conservazione a - 80° C.

Microrganismi morfologicamente simili

Specie *Amycolata* (ora specie *Pseudonocardia*)[1,18]

Erano note solo quattro specie validamente pubblicate ma queste sono state ora classificate nel genere modificato *Pseudonocardia* perché le sequenze delle specie appartenenti ai generi *Amycolata* e *Pseudonocardia* erano state sempre recuperate da un gruppo misto di alberi filogenetici e ciò è stato fortemente sostenuto dai risultati di precedenti pubblicazioni sui lipidi, proteine ribosomiali e di ultrastruttura.

Le specie *Amycolata* producono ife vegetative ramificate con diametro di 0.5 - 2.0µm che tendono a frammentarsi in elementi quadrati. Può essere prodotto un micelio aereo che può restare stabile o differenziarsi in lunghe catene di spore cilindriche ellissoidali con parete liscia. Le catene di spore sono prodotte sulle ife vegetative. Sono mesofile, ma alcuni ceppi sono autotrofi facoltativi. Queste specie non crescono in presenza di lisozima e tutte producono acido da galattosio, glucosio, mannitolo, maltosio, arabinosio, xilosio, trealosio e fruttosio ma non da lattosio, raffinosio, ramnosio e amido.

Specie Amycolatopsis[1,19]

Sono attualmente note 63 specie e 4 sottospecie. Le specie *Amycolatopsis* producono ife con ramificazione nel substrato di circa 0,5 - 2.0µm di diametro, frammentate in elementi quadrati. Può essere prodotto un micelio aereo e le ife aeree possono essere sterili o differenziarsi in lunghe catene di strutture simili a spore con parete liscia, a forma da quadrata a ellissoidale. Sulle ife vegetative possono essere prodotte spore. Le cellule sono Gram positive e non sono acido-resistenti.

Sono mesofile, ma alcuni ceppi sono autotrofi facoltativi. Non sono mobili, catalasi positive e non crescono in presenza di lisozima.

Dermatophilus congolensis[1,4]

Dermatophilus congolensis cresce solo su terreni complessi e il micelio aereo si sviluppa solo in atmosfera arricchita di anidride carbonica. Il micelio nel substrato è costituito da lunghi filamenti affusolati che si dipartono lateralmente ad angolo retto.
D. congolensis può essere facilmente riconoscibile al microscopio. I setti si formano in piani longitudinali trasversali, orizzontali e verticali producendo fino a otto file parallele di spore mobili. Le cellule sono Gram positive, ma non sono acido-resistenti. La crescita è aerobia e anaerobia facoltativa.

In funzione dell'età dell'isolato e del tipo di terreno utilizzato per la coltura, si possono osservare solo elementi a forma di cocchi, molti di loro dotati di flagelli o cellule irregolarmente disposte in pacchetti; spore germinanti; o ramificate e segmentate o filamenti non segmentati. La motilità è solitamente evidente in isolati da colture fresche. Se si osservano solo cocchi e si sospetta *D. congolensis*, esaminare colture più recenti per le ife. Dopo 24 ore, sull'agar infuso cuore cervello contenente sangue di cavallo, possono essere osservate piccole colonie (da 0,5 a 1,0 mm),

rotonde beta-emolitiche. Questa emolisi beta è anche più evidente sulle aree di terreno in cui le colonie sono maggiormente addensate. L'aspetto di queste colonie può variare, ma sono generalmente di colore grigio-bianco e aderenti e infossate nel terreno. In 2 - 5 giorni, sviluppano pigmento arancione. Non si sviluppa crescita su agar Sabouraud destrosio.

L'isolamento di *D. congolensis* può essere difficile a causa delle loro crescita relativamente lenta e la rapida sovra crescita di altri batteri. Il campione clinico, preferibilmente la parte sottostante di croste appena rimosse, deve essere seminata su una piastra di agar sangue incubata in aerobiosi o arricchita con anidride carbonica a 35° C - 37° C. Sono necessarie speciali tecniche di isolamento per i campioni contaminati. In alternativa, può essere usato il metodo di Haalstra[20]. Questo comporta la liberazione dei cocchi mobili di *D. congolensis* dalla crosta e la loro attrazione chemiotrofica verso l'atmosfera della giara ricca di anidride carbonica.

Sono positivi per catalasi, urea e idrolisi della caseina (può richiedere fino a 7 giorni). Sono anche negativi per la riduzione dei nitrati, tirosina, ipoxantina e idrolisi della xantina. Il metabolismo non è fermentativo ma da alcuni carboidrati è prodotto acido. La temperatura ottimale di crescita è di 37° C.

Le colonie possono essere differenziate da *Nocardia* sp e *Streptomyces* sp, nessuna delle quali produce filamenti con suddivisione in più righe di cocci mobili.

Specie *Nocardiopsis*

Le specie *Nocardiopsis* producono un micelio ben sviluppato nel substrato. Il colore del micelio aereo e di quello del substrato varia da arancio, marrone, blu, bianco, giallo, crema, grigio e incolore. Le ife sono lunghe e densamente ramificate e possono frammentarsi in forme coccoidi e bacillari. Il micelio aereo è ben sviluppato e abbondante e le ife aeree si frammentano completamente in spore di lunghezza variabile. L'intervallo della temperatura di crescita è da 10° C a 45° C.

Specie *Rothia* [21,22]

Le specie *Rothia* sono costituite da cocchi Gram-positivi con morfologia microscopica variabile. Le loro cellule si presentano isolate, in coppie, a grappolo o in catene. Sono debolmente catalasi positive e debolmente proteolitiche. Le specie *Rothia* sono positive per riduzione del nitrato a nitrito, liquefazione della gelatina e fermentazione degli zuccheri con produzione di acido; sono negative per motilità, ureasi e indolo. Sulla superficie dell'agar le colonie possono apparire ramificate e rapidamente si frammento in forme bacillari o coccoidi come gli *Actinomyces* o le specie *Nocardia*. Manifestano una buona crescita in condizioni aerobiche o microaerofile, scarsa o assente in anaerobiosi.

Le specie *Rothia* sono sensibili alla penicillina, ma rari isolati possono essere resistenti, e pertanto dovrebbe essere eseguita la prova di sensibilità.

Attualmente sono note 7 specie *Rothia* e 2 sono state riconosciute causa d'infezioni nell'uomo - *Rothia dentocariosa* e *Rothia mucilaginosa*.

Rothia dentocariosa[23-25]

R. dentocariosa è Gram positiva in modo irregolare, il microrganismo non forma spore e le cellule si presentano isolate, a coppie, a grappolo o in catene. Si può anche osservare pleomorfismo delle colonie. Al microscopio, la morfologia varia da coccoidi a difteroide (con estremità clavata) a filamentosa. Nelle brodocolture, le cellule possono essere coccoidi, ciò le distingue dalle specie *Actinomyces* e appaiono in forma filamentosa sulle piastre, ma possono essere riscontrate forme miste in qualsiasi tipo di coltura. Possono mostrare ramificazioni rudimentali e, dopo

invecchiamento, perdita della positività al Gram delle colture. *R. dentocariosa* cresce più rapidamente in aerobiosi che in condizioni anaerobiche, e la crescita non richiede CO_2 o lipidi. Cresce bene su terreni semplici (tranne che su agar Sabouraud destrosio) e le colonie possono essere cremose, secche, friabili o mucoidi, non emolitiche e possono aderire alla superficie dell'agar. Non sono mobili, sono catalasi positive e fermentano i carboidrati con prodotti terminali costituiti da acido lattico e acido acetico.

Sono stati segnalati ceppi di *R. dentocariosa* catalasi negativi e questi saranno più difficili da diagnosticare con i test tradizionali, poiché possono essere confusi con i rari *Bifidobacterium* che sono in grado di crescere in condizioni aerobiche, ed anche con gli *Actinomyces* e *Arcanobacterium* sp, *Propionibacterium propionicum* e con i ceppi di *Listeria* catalasi negativi.

R. dentocariosa si differenzia dalle specie *Dermabacter* in quanto è nitrati e piraminidasi positiva.

Rothia mucilaginosa[26-28]

(Già nota come *Stomatococcus mucilaginosus*, *Micrococcus mucilaginosus* o *Staphylococcus salivarius*).

Questo cocco Gram positivo si trova in formazioni a grappolo. Le cellule presentano reazione catalasi variabile che si manifesta come negativa, debolmente positiva, intensamente positiva, sono ossidasi negative, e possiedono metabolismo anaerobico facoltativo. Sono in grado di utilizzare il glucosio per via fermentativa. La temperatura ottimale di crescita è di 30-37° C. Le colonie sono bianco grigiastre non emolitiche e possono essere di consistenza mucoide, gommosa, o appiccicosa e aderire all'agar per produzione di materiale capsulare mucillaginoso. L'impossibilità di crescere in presenza di 5% di NaCl distingue *R. mucilaginosa* dai componenti dei generi *Staphylococcus* e *Micrococcus*.

Nell'uomo è stata dapprima isolata dalla cavità orale e dalle vie respiratorie, nei mammiferi è in grado di moltiplicarsi e sviluppare malattie quali endocarditi e meningite.

Principi di Identificazione

L'Identificazione affidabile di actinomadurae clinicamente significative, nocardiae, actinomiceti e streptomiceti è possibile solo ricercando marcatori chimici specifici. L'identificazione dovrebbe essere confermata da un Laboratorio di Riferimento. Le prove d'identificazione fenotipiche standard, forniscono solo un'identificazione presunta.

Informazione Tecnica/Limitazioni

Metodo di dimostrazione della micromorfologia delle colture

La coltura su vetrino dovrebbe essere eseguita con colonie inalterate coltivate su terreno minimo, come acqua di rubinetto o terreno con farina di mais senza destrosio. Le colture preparate sono incubate a 25° C ed esaminate periodicamente per 2 a 3 settimane. Esaminare al microscopio le culture su vetrino per riconoscere il micelio ramificato nel substrato, quello aereo e la sporulazione. La ife nel substrato delle specie *Nocardia* appaiono molto sottili, in filamenti ramificati dicotomicamente. Fochettando su diversi piani si riveleranno le ife aeree. La presenza di ife aeree differenzia il genere *Nocardia* da altri generi affini (*Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella, Corynebacterium* e *Mycobacterium*). Solo le specie *Nocardia* in questo gruppo di organismi presenta ife aeree. I micobatteri a rapida crescita, che fenotipicamente assomigliano alle nocardiae, sono dotati di semplici ife substrato, relativamente brevi che ramificano ad angolo

acuto. Al contrario, il complesso substrato ife delle nocardiae ramifica ad angolo retto e solitamente ha ramificazioni secondarie. I Rodococchi crescono come coccobacilli assemblati in formazione a zigzag.

A. pelletieri differisce da *A. madurae* in quanto quest'ultima idrolizza l'esculina e *A pellettieri* no.

In coltura la morfologia microscopica di *D. congolensis* è simile a quella che si evidenzia nei campioni clinici. La presenza di tipici filamenti ramificati divisi secondo piani trasversali e longitudinali consente la definizione diagnostica. Colorare con blu di metilene o con Giemsa i preparati umidi delle colonie o strisci ottenuti dalle stesse o dal campione clinico. La colorazione Gram non è idonea a visualizzare questi microrganismi per presenza di fondo un scuro che maschera i rilievi morfologici più importanti. Si possono osservare elementi a forma tipica di cocco, molti dei quali dotati di flagello o cellule assemblate in raggruppamenti irregolari. Si possono pure osservare spore germinanti e filamenti segmentati e non. Gli isolati da colture recenti sono di solito mobili. Se si osservano solo forme a cocco e si sospetta un *D. congolensis*, preparare una coltura più recente ed esaminare per presenza di ife. Dopo 24 ore di incubazione si possono osservare su agar infuso di cuore cervello addizionato di sangue colonie tondeggianti molto piccole (0.5 - 1.0 mm).

I Rodococchi possono essere facilmente differenziati dalla maggior parte delle specie *Corynebacterium*, tranne che da *Corynebacterium aquaticum*; *Corynebacterium minutissimum* e dal Centers for Disaease Control and Prevention (CDC) gruppo B-1, dotato di metabolismo fermentativo.

Sistemi di identificazione commerciali

I sistemi commerciali non forniscono un'identificazione certa delle specie *Rhodococcus* e gli isolati clinicamente importanti dovrebbero essere inviati al Laboratorio di Riferimento[8].

1 Considerazioni sulla Sicurezza[29-45]

Microrganismi del Gruppo di Rischio 2.

Fare riferimento alle attuali linee guida sulla sicurezza della manipolazione di tutti i microrganismi appartenenti al gruppo di rischio 2 presentati in questo Metodo Nazionale Standard.

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

E' essenziale il rispetto delle regolamentazioni di spedizione postale e di trasporto.

2 Microrganismi Bersaglio

Specie *Norcardia* che sono state associate a infectione[2,3] - *N. asteroides, N. brasiliensis*, *N. abscessus, N. africana, N. anaemia, N. aobensis, N. araoensis, N. arthritidis, N. asiatica, N. beijingensis, N. blacklockiae, N. brevicatena, N. carnea, N. concave, N. cyriacigeorgica, N. elegans, N.exalbida, N. farcinica, N. higoensis, N. inohanensis, N. kruczakiae, N. Mexicana, N. mikamii, N. niigatensis, N. ninae, N. niwae, N. nova, N. otitidiscaviarum, N. paucivorans, N. pseudobrasiliensis, N. pneumoniae, N. puris, N. sienata, N. terpenica, N. testacea, N. thailandica, N. transvalensis, N. vermiculata, N. veteran, N. vinacea, N. wallacei, N. yamanashiensis*

Altre specie che sono state associate a infezione nell'uomo[4,8,12,18,46-48]
Actinomadura madurae, Actinomadura pelletieri, Streptomyces somaliensis, Tsukamurella paurometabola, *Rhodococcus equi, Rhodococcus erythropolis, Rhodococcus rhodochrous, Streptomyces sudanensis, Tsukamurella strandjordii, Tsukamurella inchonensis, Tsukamurella pulmonis, Tsukamurella tyrosinosolvens, Gordonia terrae, Gordonia sputi, Gordonia bronchialis, Gordonia polyisoprenivorans, Gordonia rubripertincta, Gordonia otitidis, Gordonia effuse, Gordonia araii, Gordonia aichiensis, Nocardiopsis dassonvillei, Dermatophilus congolensis, Pseudonocardia autotrophica (*formerly *Amycolata autotrophica), Amycolatopsis orientalis*

3 Identificazione

3.1 Aspetto microscopico

(TP 39 - Staining Procedures)

Colorazione Gram

Gram-positivi, possono essere Gram variabili in funzione dell'età della coltura.

Specie *Norcardia* - Negli strisci diretti appaiono al Gram come bastoncini ramificati molto lunghi, sottili Gram-positivi finemente perlati. Quando preparati dalle culture, gli strisci possono mostrare catene simili a streptococco o piccoli filamenti ramificati.

Rhodococcus, Gordonia, Tsukamurella: sono simili ai difteroidi con ramificazione ridotta o sono a forma coccobacillare.

Le specie *Streptomyces*: sono diffusamente ramificate e presentano catenelle di spore; non si frammentano facilmente

Le specie *Actinomadura*:sono moderatamente ramificate, sottili, intrecciate, formano corte catene di spore.

Specie *Dermatophilus*: - filamenti ramificati divisi secondo piani trasversali e longitudinali; sono datate di forme filamentose sottili ed affusolate.

Specie *Norcardiopsis*: - ramificazione con spore interne.

Specie *Oerskovia* - ramificazione diffusa; le ife si frammentano in elementi bastoncellari mobili.

Specie *Rothia* - pleiomorfe; forma coccoide predominante e forma bacillare (in brodo) e forme filamentose ramificate (terreno solido).

Colorazione ZN modificata

Se la colorazione è positiva l'isolato è probabilmente un actinomicete aerobico parzialmente acido resistente. Con questa colorazione le specie *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia* e *Tsukamurella* sono generalmente negative

Colorazione rapida per acido-resistenza (Metodo Modificato di Kinyoun)

Le specie *Nocardia* sono acido resistenti in modo variabile.

Le specie *Rhodococcus e Gordonia* sono di solito parzialmente acido resistenti.

La maggior parte dei ceppi di specie *Tsukamurella* sono acido-resistenti alla colorazione con metodo Kinyoun.

Le specie *Actinomadura* non sono acido resistenti.

3.2 Terreno di primo isolamento

Agar cioccolato incubato in 5 - 10% CO_2 a 35°C - 37°C per 16 - 48 ore.

Agar sangue incubato in 5 - 10% CO_2 a 35°C - 37°C per 16 - 48 ore.

Agar per anaerobi esigenti o equivalente, con o senza neomicina (alcuni microrganismi anaerobi possono essere inibiti dalla neomicina), incubazione anaerobica per 40 – 48 ore a 35°C - 37°C.

Nota: le piastre dovrebbero essere incubate per 2 -3 settimane. La maggior parte delle specie *Streptomyces* cresce meglio a 25-35° C.

3.3 Aspetto delle colonie

Genere	**Caratteristiche di crescita degli anaerobi esigenti dopo incubazione a 35-37°C per 40-48 ore**
Specie *Nocardia*	Rugose, spesso asciutte, friabili, colore da bianco gessato ad arancio - rossiccio pigmentato
Specie *Streptomyces*	Colonie ammucchiate di aspetto ceroso a morfologia variabile
Specie *Oerskovia*	Giallo pigmentata, estesa ramificazione con sviluppo superficiale ed all'interno dell'agar
Specie *Gordonia, Rhodococcus,* e *Tsukamurella*	Non-emolitica, tondeggiante, spesso mucosa di colore rosa/rosso salmone, sviluppo in 4 -7 giorni.
Dermatophilus congolensis	Colonie rotonde adese grigio-bianche, successiva produzione di pigmento colore arancio; spesso beta emolitiche. Le colonie possono aderire all'agar
Specie *Actinomadura*	Colonie di colore da bianco a rosa, di solito mucose, assumono l'aspetto di

	un dente molare
Specie *Rothia*	Colonie piccole lisce – rugose di aspetto asciutto
Specie *Nocardiopsis*	Grossolanamente rugose e pieghettate con micelio aereo ben sviluppato

3.4 Procedure di prova

3.4.1 Differenziazione dei bastoncini Gram-positivi ramificati

Colorare con Gram e metodo modificato di Kinyoun gli strisci (in duplicato) delle colonie e del campione clinico. Gli isolati delle specie *Streptomyces* possono presentare forme coccoidi acido resistenti ed ife non-acido resistenti, ma questi microrganismi sono considerati non-acido resistenti. Deve manifestarsi contrasto fra la carbol fucsina e la contro colorazione. La dimostrazione dell'acido-resistenza degli isolati deve essere supportata da altre prove in quanto non ha valore diagnostico assoluto.

Le specie *Nocardia* e *Streptomyces* (β-galattosidasi positive) possono essere differenziate dal gruppo IV dei micobacteri (β-galattosidasi negativi) e rodococchi (β-galattosidase variabili).

3.4.2 Identificazione con Sistemi commerciali[12]

L'Identificazione con sistemi commerciali, quando usata, fornisce risultati riproducibili nei saggi ripetuti per l'assimilazione degli zuccheri.

Questa prova è particolarmente utile per differenziare *T. paurometabola* e *T. pulmonis* dalle altre specie di *Tsukamurella*. I test di identificazione commerciale, associati a quelli biochimici standard per i micobatteri, condizioni termiche e modificazioni degli agar, consentono di identificare le Tsukamurellae a livello di specie.

3.4.3 Matrix-assisted laser desorption/ionisation - time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry

Il metodo Matrix-assisted laser desorption ionisation - time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), può essere utilizzato per analizzare la composizione proteica della cellula batterica ed è emerso come una tecnologia nuova per l'Identificazione delle specie. Ha dimostrato di essere uno strumento rapido e potente per riproducibilità sensibilità e velocità analitica. Il vantaggio fornito dal MALDI-TOF consiste nella disponibilità dei risultati delle analisi in poche ore rispetto a diversi giorni richiesti dagli altri metodi. La velocità e semplicità della preparazione dei campioni, associata all'acquisizione dei risultati e al costo ridotto dei materiali necessari, rende questo metodo particolarmente adatto all'uso di routine[49].

L'uso di questa tecnologia per l'Identificazione dei microrganismi esigenti a crescita lenta, quali le specie *Nocardia*, notoriamente difficili da identificare con le prove convenzionali, è risultato veramente utile e particolarmente interessante nella routine di laboratorio[50].

Il MALDI-TOF è stato utilizzato con successo per riclassificare le specie *Streptomyces* e per nell'identificazione delle specie *Oerskovia* così morfologicamente simili alle specie *Rothia*[51,52].

L'unico fattore limitante l'uso di MALDI-TOF MS rimane la ridotta disponibilità dei dati di riferimento per microrganismi raramente isolati da campioni clinici, ed è stato precedentemente dimostrato che l'assenza o la disponibilità di solo un numero ridotto di isolati di determinate specie

nell'archivio determina nella maggior parte dei casi l'impossibilità dell'identificazione con il metodo MALDI-TOF MS[53].

E' chiaramente auspicabile una successiva espansione dell'archivio con un numero maggiore di isolati, comprendendo le specie *Nocardia* meno frequentemente riscontrate.

3.4.4 Nucleic acid amplification tests (NAATs) e PCR-RFLP molecular analysis (PRA)

La PCR è generalmente considerata un buon metodo di rilevazione batterica perché semplice, sensibile e specifica. La base per le applicazioni diagnostiche della PCR in microbiologia è la rivelazione degli agenti infettivi e la possibilità di differenziare ceppi non patogeni dai patogeni, tramite la rilevazione di geni specifici.

Questo metodo è stato-utilizzato per la caratterizzare gli isolati appartenenti al genera *Nocardia* o per l'identificazione della specie *Nocardia* da appartenenti ad altri generi degli actinomiceti[54]. La PCR utilizza primer caratterizzati da sequenze specie specifiche del gene 16S rRNA, sviluppati con successo per *Rhodococcus globerulus*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus opacus* e *Rhodococcus ruber*[55]. Ciò ha contribuito a facilitare la diagnosi rapida e l'inizio precoce di chemioterapia appropriata ed è utilizzata anche per studi epidemiologici.

Le tecniche PRA implicano l'amplificazione della PCR di parti del gene *hsp*65 o 16S rRNA e la successiva digestione con endonucleasi di restrizione, specifiche per ciascun gene. La tecnica PRA ha il vantaggio di riconoscere la presenza delle variazioni nelle sequenze di un gene nell'ambito della specie e la presenza o assenza delle sedi di riconoscimento delle endonucleasi di restrizione all'interno delle regioni variabili del gene. Questa è stata utilizzata con successo per differenziare isolati di *Nocardia* da quelli del genere *Mycobacterium* e ha consentito pure la differenziazione della maggior parte delle specie *Nocardia* frequentemente isolate da campioni clinici[56].

3.5 Identificazione successiva

Metodi Molecolari Rapidi

I metodi molecolari hanno avuto un enorme impatto sulla tassonomia degli actinomiceti aerobi. L'analisi delle sequenze geniche ha aumentato la comprensione delle relazioni filogenetiche degli attinomiceti aerobici e microrganismi correlati e ha comportato il riconoscimento di numerose nuove specie. Le tecnologie molecolari hanno reso l'identificazione di molte specie più rapide e precise di quanto fosse stato possibile con le tecniche fenotipiche.

Per gli isolati da campioni clinici sono-stati sviluppati diversi tipi di metodi rapidi; questi includono tecniche molecolari quali la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multilocus Sequence Analysis (MLSA), e la 16S rRNA gene sequencing. Tutti questi approcci consentono la sottotipizzazione di ceppi non correlati, ma con diverso grado di accuratezza, potere discriminante, e riproducibilità.

Tuttavia, alcuni di questi metodi rimangono disponibili solo per i laboratori di riferimento e non sono facilmente implementabili per l'identificazione batterica di routine in un laboratorio clinico.

16S rRNA gene sequencing

Il metodo di identificazione genotipico, noto come sequenziamento del gene 16S rRNA usato per studi filogenetici è stato in grado di riclassificare i batteri in modo completo in nuove specie, o

anche generi. E' stato anche usato per descrivere nuove specie che non-sono mai state coltivate con successo.

La disponibilità del sequenziamento del gene ha rivoluzionato la tassonomia degli actinomiceti aerobi ed è divenuto uno prezioso strumento per l'identificazione degli isolati clinici. Con la rapida evoluzione della tassonomia delle *Nocardia*, le specie associate ad alcune sequenze possono non avere una corretta definizione tassonomica in base agli standard attuali e si è manifestata una critica significativa nei confronti della banca dati GenBank in quanto le sequenze in essa conservate nell'archivio non sono controllate con accuratezza o la classificazione appropriata delle specie è inadeguata[2]. Esiste un elevato grado di divergenza nelle sequenze di molte specie e molti taxa delle specie *Nocardia* sono prive di classificazione[57].

Il sequenziamento 16SrRNA non può essere un metodo definitivo per differenziare *G sputi* e *G. aichiensis*. Comunque, contribuisce all'identificazione degli isolati con risultati fenotipici o PRA indeterminati[57].

Questo metodo e stato pure utilizzato per identificare un nuovo batterio, *Tsukamurella strandjordii* come pure *Tropheryma whipple*i[12,17].

Multilocus sequence analysis (MLSA)

La MLSA è-stata utilizzata come metodo per studiare la tassonomia dei procarioti per la sua facilità d'uso, precisione e potere discriminante.

La difficoltà dell'identificazione della specie *Nocardia* è dovuta alle caratteristiche della complessa e rapidamente mutevole tassonomia, al fallimento delle analisi con 16S rRNA e dello studio degli acidi grassi cellulari come discriminanti di molte specie, e all'inaffidabilità delle prove biochimiche. Comunque, l'identificazione delle specie *Nocardia* può essere ottenuta con la Multilocus Sequence Analysis (MLSA) delle girasi B della β subunità del DNA topoisomerasi (*gyrB*), 16S rRNA (*16S*), subunità A SecA preproteina traslocasi (*secA1*), 65 kDa heat shock protein (*hsp65*) e RNA polimerasi (*rpoB*) e questo metodo sarebbe più adatto per uso di routine in una laboratorio microbiologico di riferimento clinico[58].

L'identificazione e la classificazione di specie all'interno del genere *Streptomyces* è difficile, ma questa tecnica ha aiutato la classificazione tassonomica ed è stata di grande aiuto nel chiarimento delle relazioni interspecie fra l'rRNA di *Streptomyces griseus* e il clade genetico[59,60].

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

La PFGE rileva la variazione genetica tra ceppi con rari tagli ottenuti con enzimi di restrizione e successiva separazione su gel di agarosio dei grandi frammenti genomici ottenuti. La PFGE è nota per avere un'elevata capacità discriminante ed è frequentemente utilizzata per le indagini di epidemie avendo acquisito una vasta applicazione nella caratterizzazione degli isolati epidemiologicamente correlati. Tuttavia, la stabilità della PFGE può essere insufficiente per un'applicazione affidabile in studi epidemiologici a lungo termine. Inoltre, in funzione delle sue caratteristiche, richiede tempo (30 ore o più per l'esecuzione) e attrezzature speciali; la PFGE non è diffusamente usata se non nei laboratori di riferimento[61,62].

E'-stata utilizzata per differenziare gli isolati epidemiologicamente correlati di *Nocardia farcinica* nei casi di nocardiosi endemici o epidemici[63]. Questa osservazione è stata utile per comprendere la diffusione della malattia negli ospedali e nelle comunità.

3.6 Conservazione e invio

Se appropriato, eseguire sottocolture su agar sangue e trasferire l'isolato su agar sangue a becco di clarino per l'invio al Laboratorio di Riferimento.

4 Identificazione di actinomiceti aerobi: diagramma di Flusso

A causa della notevole diversità morfologica osservata tra generi e anche tra ceppi dello stesso taxon, fare riferimento alle pubblicazioni recenti.

5 Refertazione

5.1 Identificazione presunta

L'identificazione presunta può essere raggiunta se sono disponibili appropriate caratteristiche di crescita e morfologiche delle colonie, colorazione Gram e i risultati di tipo biochimico o di tecniche molecolari.

5.2 Conferma identificazione

La conferma dell'identificazione può essere eseguita dall'appropriato laboratorio di riferimento.

5.3 Medico microbiologo

Informare il medico microbiologo quando il modulo di richiesta riporta informazioni particolari.

5.4 CCDC

Fare riferimento al Memorandum locale d'Informazione .

5.5 Public Health England[64]

Fare riferimento alle linee guida attuali del CDSC e alle indicazioni del COSURV.

5.6 Gruppo controllo infezione

N/D

6 Invio

6.1 Laboratorio di riferimento

Per informazioni su accertamenti disponibili, tempi di risposta, procedure di trasporto ed altre informazioni riguardanti l'invio del campione al laboratorio di riferimento rivolgersi all'appropriato : laboratorio di riferimento nazionale

Molecular Identification Service Unit (MISU)
Microbiology Services
Public Health England
61 Colindale Avenue
London
NW9 5EQ

Contattare il centralino della PHE: Tel. +44 (0) 20 8200 4400

Inghilterra e Galles

https://www.gov.uk/specialist-and-reference-microbiology-laboratory-tests-and-services

Scozia

http://www.hps.scot.nhs.uk/reflab/index.aspx

Irlanda del Nord

http://www.belfasttrust.hscni.net/Laboratory-MortuaryServices.htm

7 Notifica al PHE[64,65] o Equivalente[66.67]

Le Norme di Denuncia del 2010 rendono obbligatorio ai laboratori diagnostici di denunciare alla Public Health England (PHE) tutti i casi nei quali s'identificano gli agenti causali elencati nella Scheda 2 della Direttiva. Le denunce devono pervenire per scritto, su carta o per via elettronica, entro sette giorni. I casi urgenti devono essere notificati il più presto possibile verbalmente: si raccomanda entro le 24 ore. Questi stessi devono essere in seguito denunciati in forma scritta entro sette giorni.

Secondo la Notification Regulations il laboratorio ricevente la notifica è l'ufficio locale della PHE. Se il caso è già stato notificato da un professionista medico abilitato, al laboratorio diagnostico è ancora richiesta la denuncia del caso qualora si riscontrino evidenze d'infezione imputabili ad agenti causali soggetti a tale disposizione.

La denuncia secondo la Direttiva dell'Health Protection (Notification) Regulations 2010 non sostituisce l'informazione volontaria alla PHE. La maggior parte dei laboratori del NHS segnala spontaneamente al PHE gran parte delle diagnosi di laboratorio sostenute da vari agenti eziologici e molte sezioni della PHE hanno definito accordi con i laboratori locali per segnalazioni urgenti di alcuni tipi d'infezione. Queste iniziative devono continuare.

Nota: La linea guida dell'Health Protection Legislation Guidance (2010) include la segnalazione per Human Immunodeficiency Virus HIV & Sexually Transmitted Infections STIs, Healthcare Associated Infections e HCAIs e Creutzfeldt–Jakob disease CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non al 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories'.

https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/our-governance#health-protection-regulations-2010

Esistono accordi diversi in Scotland[66,67], Wales[68] and Northern Ireland[69].

Traduzione a cura di Roberto Rescaldani, già primario del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori – Monza.

Collaboratori: Roberto Rossetti, già Primario del Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Civile di Pistoia ASL 3
Monica Raggi, Dirigente di primo livello del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori di Monza

I testi originali e le traduzioni sono disponibili sul Web APSI – www.apsi.it
- Webmaster Sergio Malandrin, Dirigente di primo livello del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori di Monza

Bibliografia

1. Holt JG, Krieg N R, Sneath P H A, Staley J T, Williams S T, editors. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994. p. 625-703

2. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ, Jr. Clinical and laboratory features of the Nocardia spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev 2006;19:259-82.

3. Euzeby,J. List of Prokaryotic names with standing in Nomenclature- Genus *Nocardia*.

4. McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin Micobiol Rev 1994;7:357-417.

5. Lerner PI. Nocardiosis. Clin Infect Dis 1996;22:891-905.

6. Euzeby,J. List of Prokaryotic names with standing in Nomenclature- Genus Streptomyces.

7. Euzeby,JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Rhodococcus*. 2013.

8. Bell KS, Philip JC, Am DWJ, Christophi N. The genus Rhodococcus. J Appl Microbiol 1998;85:195-210.

9. Euzeby,JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Oerskovia*. 2013.

10. Euzeby,J. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - Genus *Actinomadura*.

11. Euzeby,JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Tsukamurella*. 2013.

12. Kattar MM, Cookson BT, Carlson LD, Stiglich SK, Schwartz MA, Nguyen TT, et al. Tsukamurella strandjordae sp. nov., a proposed new species causing sepsis. J Clin Microbiol 2001;39:1467-76.

13. Euzeby,JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Gordonia*. 2013.

14. Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. International Journal of Systematic Bacteriology 2013;47:479-91.

15. Arenskotter M, Broker D, Steinbuchel A. Biology of the metabolically diverse genus Gordonia. Appl Environ Microbiol 2004;70:3195-204.

16. Euzeby,JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus Tropheryma. 2013.

17. La SB, Fenollar F, Fournier PE, Altwegg M, Mallet MN, Raoult D. Description of Tropheryma whipplei gen. nov., sp. nov., the Whipple's disease bacillus. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:1471-9.

18. Warwick S, Bowen T, McVeigh H, Embley TM. A phylogenetic analysis of the family Pseudonocardiaceae and the genera Actinokineospora and Saccharothrix with 16S rRNA sequences and a proposal to combine the genera Amycolata and Pseudonocardia in an emended genus Pseudonocardia. Int J Syst Bacteriol 1994;44:293-9.

19. Euzeby,J. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - Genus *Amycolatopsis*.

20. Haalstra R. Isolation of *D. congolensis* from skin lesions in the diagnosis of streptothricosis. Vet Rec 1965;77:824-5.

21. Georg LK, Brown JM. Rothia, Gen. Nov. an aerobic genus of the family actinomycetaceae. International Journal of Systematic Bacteriology 1967;17:79-88.

22. Euzeby,JP. List of prokaryotic names with standing in Nomenclature- Genus *Rothia*. 2013.

23. Fontana C, Cellini L, Dainelli B. Twelve aberrant strains of Staphylococcus aureus subsp. aureus from clinical specimens. J Clin Microbiol 1993;31:2105-9.

24. Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE, III, Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. Clin Microbiol Rev 1997;10:125-59.

25. von GA. Rothia dentocariosa: taxonomy and differential diagnosis. Clin Microbiol Infect 2004;10:399-402.

26. van Tiel FH, Slangen BF, Schouten HC, Jacobs JA. Study of Stomatococcus mucilaginosus isolated in a hospital ward using phenotypic characterization. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14:193-8.

27. Collins MD, Hutson RA, Baverud V, Falsen E. Characterization of a Rothia-like organism from a mouse: description of Rothia nasimurium sp. nov. and reclassification of Stomatococcus mucilaginosus as Rothia mucilaginosa comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2000;50 Pt 3:1247-51.

28. Ruoff KL. Miscellaneous catalase-negative, gram-positive cocci: emerging opportunists. J Clin Microbiol 2002;40:1129-33.

29. European Parliament. UK Standards for Microbiology Investigations (SMIs) use the term "CE marked leak proof container" to describe containers bearing the CE marking used for the collection and transport of clinical specimens. The requirements for specimen containers are given in the EU in vitro Diagnostic Medical Devices Directive (98/79/EC Annex 1 B 2.1) which states: "The design must allow easy handling and, where necessary, reduce as far as possible contamination of, and leakage from, the device during use and, in the case of specimen receptacles, the risk of contamination of the specimen. The manufacturing processes must be appropriate for these purposes".

30. Official Journal of the European Communities. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. 7-12-1998. p. 1-37.

31. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.

32. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.

33. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.

34. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).

35. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32

36. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.

37. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.

38. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological Agents: Managing the Risks in Laboratories and Healthcare Premises. Appendix 1.2 Transport of Infectious Substances - Revision. Health and Safety Executive. 2008.

39. 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.

40. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed. HSE Books; 2002.

41. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.

42. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.

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

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

45. British Standards Institution (BSI). BS 5726:2005 - Microbiological safety cabinets. Information to be supplied by the purchaser and to the vendor and to the installer, and siting and use of cabinets. Recommendations and guidance. 24-3-2005. p. 1-14

46. Doig C, Gill MJ, Church DL. Rhodococcus equi an easily missed opportunistic pathogen. Scand J Infect Dis 1991;23:1-6.

47. Brust JC, Whittier S, Scully BE, McGregor CC, Yin MT. Five cases of bacteraemia due to Gordonia species. J Med Microbiol 2009;58:1376-8.

48. Kageyama A, Iida S, Yazawa K, Kudo T, Suzuki S, Koga T, et al. Gordonia araii sp. nov. and Gordonia effusa sp. nov., isolated from patients in Japan. Int J Syst Evol Microbiol 2006;56:1817-21.

49. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl Environ Microbiol 2008;74:5402-7.

50. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang TD, Wauters G, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nocardia species. J Clin Microbiol 2010;48:4015-21.

51. Tamura T, Ishida Y, Otoguro M, Hatano K, Labeda D, Price NP, et al. Reclassification of Streptomyces caeruleus as a synonym of Actinoalloteichus cyanogriseus and reclassification of Streptomyces spheroides and Streptomyces laceyi as later synonyms of Streptomyces niveus. Int J Syst Evol Microbiol 2008;58:2812-4.

52. Schumann P, Kampfer P, Busse HJ, Evtushenko LI. Proposed minimal standards for describing new genera and species of the suborder Micrococcineae. Int J Syst Evol Microbiol 2009;59:1823-49.

53. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La SB, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis 2009;49:543-51.

54. Laurent FJ, Provost F, Boiron P. Rapid identification of clinically relevant Nocardia species to genus level by 16S rRNA gene PCR. J Clin Microbiol 1999;37:99-102.

55. Bell KS, Kuyukina MS, Heidbrink S, Philp JC, Aw DW, Ivshina IB, et al. Identification and environmental detection of Rhodococcus species by 16S rDNA-targeted PCR. J Appl Microbiol 1999;87:472-80.

56. Wilson RW, Steingrube VA, Brown BA, Wallace RJ, Jr. Clinical application of PCR-restriction enzyme pattern analysis for rapid identification of aerobic actinomycete isolates. J Clin Microbiol 1998;36:148-52.

57. Patel JB, Wallace RJ, Jr., Brown-Elliott BA, Taylor T, Imperatrice C, Leonard DG, et al. Sequence-based identification of aerobic actinomycetes. J Clin Microbiol 2004;42:2530-40.

58. McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX. Phylogeny and identification of Nocardia species on the basis of multilocus sequence analysis. J Clin Microbiol 2010;48:4525-33.

59. Labeda DP. Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus Streptomyces. Int J Syst Evol Microbiol 2011;61:2525-31.

60. Guo Y, Zheng W, Rong X, Huang Y. A multilocus phylogeny of the Streptomyces griseus 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. Int J Syst Evol Microbiol 2008;58:149-59.

61. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of Listeria monocytogenes, an important foodborne pathogen. J Med Microbiol 2006;55:645-59.

62. Brosch R, Brett M, Catimel B, Luchansky JB, Ojeniyi B, Rocourt J. Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of listeria monocytogenes via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Int J Food Microbiol 1996;32:343-55.

63. Blumel J, Blumel E, Yassin AF, Schmidt-Rotte H, Schaal KP. Typing of Nocardia farcinica by pulsed-field gel electrophoresis reveals an endemic strain as source of hospital infections. J Clin Microbiol 1998;36:118-22.

64. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.

65. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.

66. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).

67. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.

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

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