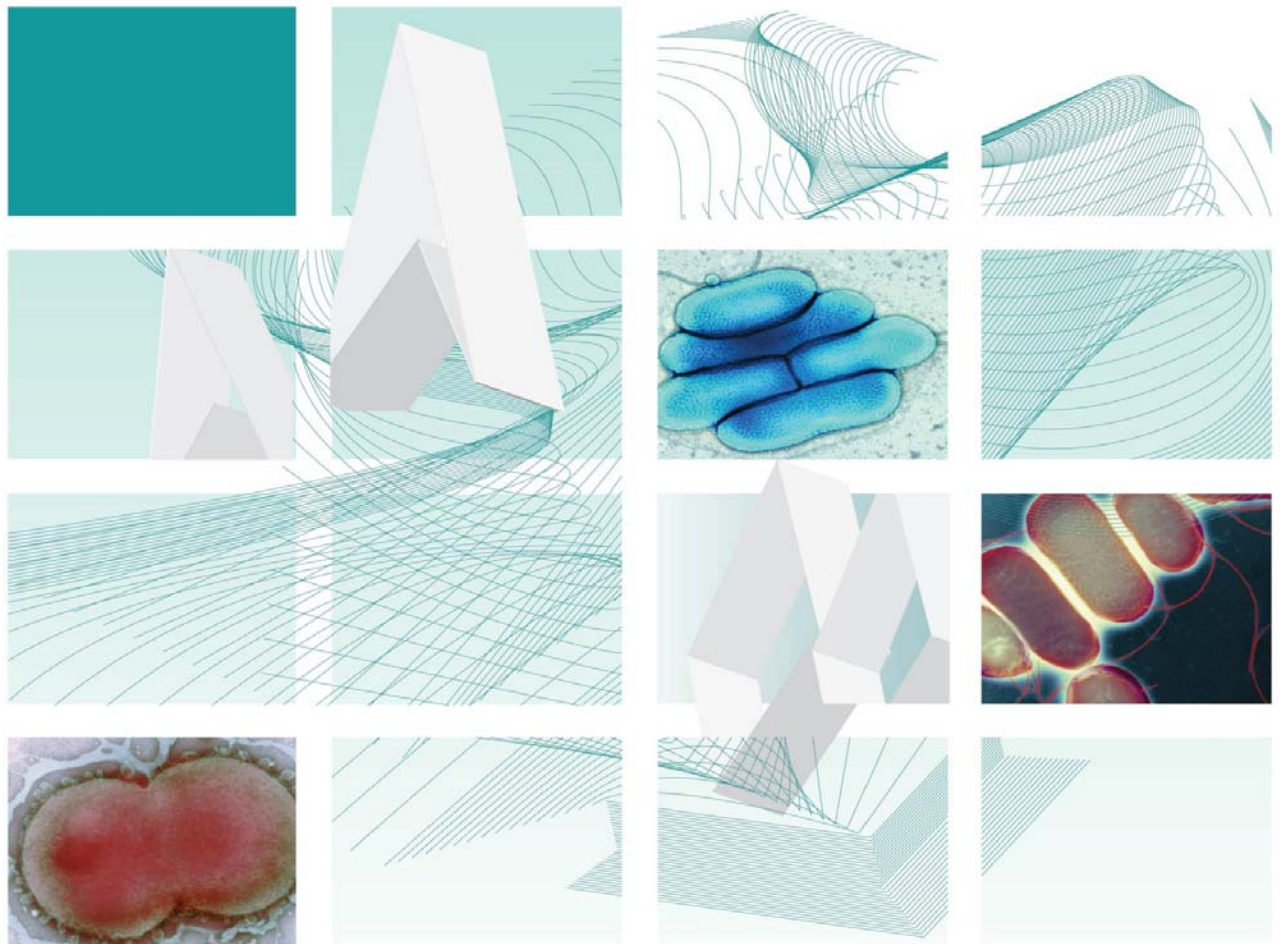




Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito

Identificazione di Bastoncini Gram Negativi Non Fermentanti il Glucosio

IN REVISIONE



Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Public Health England (PHE) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <http://www.hpa.org.uk/SMI/WorkingGroups>).

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

Per ulteriori informazioni contattare:

Standards Unit
Microbiology Services
Public Health England
61 Colindale Avenue
London NW9 5EQ

E-mail: standards@phe.org.uk

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

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



Contenuti

RINGRAZIAMENTI.....	2
TABELLA MODIFICHE	4
RICERCHE MICROBIOLOGICHE STANDARD DEL REGNO UNITO: SCOPO E OBIETTIVO.....	5
SCOPO DEL DOCUMENTO	8
INTRODUZIONE.....	8
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI.....	14
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA	15
2 MICROORGANISMI BERSAGLIO	15
3 IDENTIFICAZIONE	15
4 IDENTIFICAZIONE BASTONCINI GRAM NEGATIVI NON FERMENTANTI	
GLUCOSIO	17
5 REFERTAZIONE	18
5 INVIO	19
9 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE	19
BIBLIOGRAFIA	21



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.org.uk.

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

Modifica No/Data.	4/11.03.14
Emissione eliminata. no	2.1
Emissione inserita no.	2.2
Sezione(i) interessate/Pagina no.	Modifica.
Documento intero .	<p>Il documento è stato inserito in un nuovo formato che evidenzia il passaggio della Health Protection Agency alla Public Health England.</p> <p>Prima pagina ridisegnata.</p> <p>Rinominata la pagina di “Stato come Scopo” e Obiettivo ed aggiornata in modo appropriato.</p> <p>I loghi delle organizzazioni professionali sono stati revisionati ed aggiornati.</p> <p>Revisionati e aggiornati Standard di sicurezza e referenti delle denunce</p> <p>Il contenuto scientifico rimane invariato.</p>

Modifica No/Data.	3/21.10.11
Emissione eliminata. no	2
Emissione inserita no.	2.1
Sezione(i) interessate.	Modifica.
Intero documento	Documento presentato in nuovo formato.
Bibliografia	Bibliografia aggiornata.

Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito[#]: Scopo e Obiettivo

Utilizzatori delle SMI

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

Informazioni di Base per le SMI

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

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

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

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 <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>. L'inclusione del logo di una organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del comitato direttivo e dei Gruppi di Lavoro che sviluppano le SMI. Le opinioni dei rappresentanti possono non essere rigorosamente conformi a quelle dei membri delle organizzazioni a cui appartengono né a quelle delle loro organizzazioni. I rappresentanti prescelti rappresentano uno strumento bidirezionale per la consultazione e dialogo. Le opinioni espresse sono ricercate con un processo di consultazione.

Le SMI sono sviluppate, revisionate ed aggiornate con un ampio processo di consultazione

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

Assicurazione di Qualità

Il NICE (National Institute for Health and Care Excellence) ha accreditato la procedura utilizzata dai Gruppi di Lavoro per produrre le SMI. L'accREDITAMENTO è applicabile a tutte le linee guida prodotte dall'Ottobre del 2009. La procedura per lo sviluppo delle SMI è certificata dalla ISO 9001:2008.

Le SMI rappresentano una procedura standard di buona qualità pratica alla quale si devono attenere per la propria attività tutti i laboratori di microbiologia clinica e di sanità pubblica del Regno Unito. Le SMI sono accreditate dal NICE e non rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio disponibili 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. Queste stesse devono essere utilizzate in associazioni con altre SMI.

Le prestazioni della SMI dipendono dal personale ben addestrato e dalla qualità dei reagenti e delle attrezzature utilizzate. I laboratori dovrebbero assicurare che tutti i reagenti di tipo commerciale e quelli messi a punto in laboratorio siano stati validati e risultati idonei allo scopo. I laboratori devono partecipare a programmi di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

Coinvolgimento del Paziente e della Comunità

Nello sviluppo delle SMI i rispettivi Gruppi di Lavoro sono impegnati per favorire il coinvolgimento dei pazienti e dell'opinione pubblica. Grazie al coinvolgimento pubblico, di operatori sanitari, ricercatori e organizzazioni di volontariato la SMI risultante sarà strutturalmente valida e atta a soddisfare le esigenze dell'utente. 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 http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317133470313. I Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità di consultazione efficace con gli appartenenti al pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialistici coinvolti.

Dichiarazione Legale

Mentre ogni cura è stata intrapresa per la preparazione delle SMI, PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, deve, per quanto possibile in base a qualunque legge vigente, escludere la responsabilità per tutte le perdite, costi, reclami, danni o spese derivanti da o 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 Suggestita per questo Documento

Public Health England. (2014). Identification of Glucose Non-Fermenting Gram Negative Rods. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 17 Emissione 2.2. <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>.

IN REVISIONE

Scopo del Documento

Questa SMI descrive l'identificazione delle specie *Pseudomonas*, *Burkholderia* e di altri bacilli Gram negativi non fermentanti il glucosio che sono stati associati ad infezione umana¹. E' descritta l'identificazione di *Pseudomonas aeruginosa* e del *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) da terreno selettivo, e dei componenti di questo complesso gruppo di microrganismi isolati da diversi terreni di primo isolamento.

I batteri descritti in questa SMI sono aerobi non sporulanti. Ossidano il glucosio e sono catalasi positivi. Alcune specie si sviluppano in anaerobiosi in presenza di nitrati e molti di loro producono pigmenti solubili in acqua².

Sul terreno d'isolamento primario le colonie sono identificate in modo preliminare per: aspetto, colorazione Gram, prova dell'ossidasi e produzione di pigmento. L'ossidasi è un'importante per la differenziazione. Bacilli Gram negativi, non fermentanti il glucosio ed ossidasi positivi come *Pseudomonas aeruginosa* possono essere definiti "pseudomonadi". L'identificazione successiva è eseguita con altre prove fenotipiche e/o con l'invio ad un appropriato Laboratorio di Riferimento. Tutte le prove d'identificazione devono essere eseguite preferibilmente da agar non selettivo.

I bacilli Gram-negativi non fermentanti sono associati ad un ampio spettro di infezioni, principalmente di origine nosocomiale. Queste si manifestano di solito in pazienti con deficienze documentabili dell'immunità locale e/o sistemica. Questi batteri possono essere isolati da numerose fonti ambientali e sono in grado di causare infezione tramite dispositivi medici contaminati o con "pseudo-infezione", per loro capacità di sopravvivenza / moltiplicazione nelle provette di campionamento del sangue o nei terreni di laboratorio.

Questa SMI deve essere usata congiuntamente con le altre SMI.

Introduzione

Tassonomia^{1,3,4}

La posizione tassonomica di molti ceppi di questo vasto ed eterogeneo gruppo di microrganismi è in continua revisione. Microrganismi in precedenza classificati nel genere *Pseudomonas* (omologia per rRNA gruppi I-V) sono ora suddivisi nei generi *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* e *Stenotrophomonas*. Molti ceppi identificati non appartengono a specie definite. I sistemi commerciali d'identificazione non sono in grado di assegnare una definitiva classificazione di specie a molti bacilli Gram negativi non fermentanti il glucosio clinicamente significativi. E' opportuno inviare gli isolati al Laboratorio di Riferimento per situazioni cliniche nelle quali è importante la precisa identificazione eziologica. Questa consente infatti l'assegnazione della migliore terapia, la definizione della prognosi e degli interventi adeguati al controllo delle infezioni (come nel caso d'interpretazione dubbia dopo il primo isolamento di un microrganismo appartenente al complesso *Burkholderia cepacia* in campione respiratorio da paziente con fibrosi cistica); di solito è appropriato l'invio di questo isolato al Laboratorio di Riferimento.

Caratteristiche

*Pseudomonas aeruginosa*¹

P. aeruginosa è un bastoncino Gram-negativo non-fermentante il glucosio spesso associato ad infezione nell'uomo. Produce odore caratteristico di aminoacetofenone. E' aerobio stretto e si sviluppa a temperatura compresa fra 5°C - 42°C. La maggior parte delle altre pseudomonadi non

si sviluppa a 42°C (con alcune eccezioni, in particolare *Burkholderia pseudomallei*). L'aspetto caratteristico blu-verde del pus infetto/ colonizzato o della coltura del microrganismo, è dovuto alla presenza contemporanea di piocianina (blu) e pioverdina (fluoresceina, gialla). La produzione di pigmento blu-verde è indicativa di *P. aeruginosa*⁵. Alcuni ceppi producono altri pigmenti, quali la piorubina (rossa) o la piomelanina (scura).

Dopo incubazione aerobica su agar nutriente a 37°C per 24 ore, *P. aeruginosa* produce almeno sei tipi di colonie. Il più comune, il tipo 1, forma colonie larghe, non rilevate, ovali, convesse e rugose, talvolta circondate da crescita seghettata. La variazione dell'aspetto fra un tipo e l'altro di colonia non indica necessariamente la presenza di più di un ceppo. Molti stipiti microbici presentano iridescenza metallica per lisi della colonia; questa assomiglia a quella da batteriofago, ma non è associata ad attività fagica.

Le colonie isolate su *Pseudomonas* agar selettivo o agar sangue possono essere identificate in modo preliminare come '*P. aeruginosa*' per positività all'ossidasi e per la caratteristica produzione di pigmento. Alcuni ceppi di *P. aeruginosa*, particolarmente quelli mucosi, possono non produrre piocianina, presentare una debole positività alla prova dell'ossidasi e richiedere le successive prove di conferma per identificazione. Colonie isolate su altri agar selettivi (quale il Bcc) possono essere identificate per l'aspetto della colonia e con sistema di identificazione commerciale. Altre specie, isolate da terreni contenenti sangue o da agar selettivi, ed i ceppi di *P. aeruginosa* e del *B. cepacia* complex che richiedono la successiva caratterizzazione, devono essere saggiate con un sistema commerciale d'identificazione o inviati ad un Laboratorio di Riferimento. Ricordare che gli isolati da pazienti con fibrosi cistica possono essere atipici/stressati e devono essere incubati a 30°C, od a temperatura ambiente per 48 ore, per poter esprimere le loro caratteristiche fenotipiche in modo affidabile.

Altre specie *Pseudomonas*

L'infezione causata da questi microrganismi è relativamente rara. Si manifesta di solito in paziente con difesa(e) immunologica compromessa o associata a dispositivi medici contaminati⁶. Un riconoscimento accurato del microrganismo infettante può essere importante perché la sensibilità agli agenti antimicrobici può essere molto variabile. Sono state segnalate anche pseudo-infezioni.

Pseudomonas putida e *Pseudomonas fluorescens* sono membri del gruppo fluorescente delle pseudomonadi. Diversamente da *P. aeruginosa*, non si sviluppano a 42°C e non producono piocianina. *P. putida* può essere differenziata da queste due specie per l'impossibilità di liquefare la gelatina⁶.

Quando si sviluppa su agar nutriente, *Pseudomonas stutzeri* produce colonie lisce, con caratteristiche intermedie e rugose (talvolta pigmentate di giallo)⁷. Quest'ultime possono essere simili alle colonie di *Burkholderia pseudomalli* o a specie *Bacillus*.

Pseudomonas alcaligenes e *Pseudomonas pseudoalcaligenes* sono entrambe prive di pigmento.

La coltura primaria delle specie *Pseudomonas* deve essere eseguita su agar sangue e/o su agar selettivo per *Pseudomonas*. L'aspetto di queste specie *Pseudomonas* è descritto nella Sezione 3.3. Gli isolati clinicamente significativi possono richiedere l'invio al Laboratorio di Riferimento per successiva caratterizzazione.

***Burkholderia cepacia* complex**

Recenti ricerche hanno determinato numerosi cambiamenti nella tassonomia del *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). In breve, l'analisi delle sequenze nucleotidiche del gene *recA* suggerisce la

suddivisione del Bcc in nove genomovar⁸. La maggior parte di loro è stata ora classificata come singola specie (*B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. ambifaria*, *B. athina*, *B. pyrrocinia*). Ciò è importante in quanto alcuni genomovars/specie sono stati più strettamente associati ad epidemie ospedaliere ed a manifestazioni cliniche in pazienti recettivi (ad esempio, *B. cepacia* genomovar III in epidemie di polmonite fulminante nei reparti di ricovero per “FC” fibrosi cistica)^{9,10}. Ceppi di Bcc possono essere isolati da dispositivi medici contaminati, come analizzatori per emogas-analisi, nebulizzatori o disinfettanti¹¹⁻¹³.

La coltura primaria per i componenti del Bcc deve essere eseguita su agar selettivi per *B. cepacia*. Questi includono il *Burkholderia cepacia* selective agar (BCSA), il *Burkholderia cepacia* agar (BCA, già denominato PCA, *Pseudomonas cepacia* agar), e l'Oxidation-Fermentation Polymyxin Bacitracin Lactose agar (OFPBL). Recenti valutazioni segnalano che il BCSA è più selettivo e sviluppa le colonie del Bcc più rapidamente rispetto agli altri terreni^{14,15}. Tutti contengono antibiotici per migliorare la loro selettività. I terreni devono essere incubati a 35°C – 37°C per due giorni. Alcuni ceppi possono svilupparsi solo se le piastre sono di nuovo incubate a 30°C fino a 5 giorni. L'aspetto delle colonie varia in funzione del terreno usato. È importante che gli isolati, classificati in modo preliminare come *B. cepacia*, siano identificati il più rapidamente possibile per migliorare la qualità di trattamento del paziente. I ceppi del Bcc possono essere nitrati negativi e ONPG positivi; *B. cepacia* manifesta varia intensità alla reazione dell'ossidasi. Gli isolati possono risultare non vitali se conservati per alcuni giorni a temperatura ambiente o a 4°C. I microrganismi del Bcc identificati in modo preliminare da pazienti con fibrosi cistica devono essere saggiati con sistemi commerciali, anche se la conferma può essere inattendibile^{16,17}. Tutti i Bcc isolati per la prima volta ed identificati in modo preliminare devono essere inviati ad un Laboratorio di Riferimento per la conferma dell'identificazione, classificazione di specie e definizione del genomovar.

Altre specie *Burkholderia*

Burkholderia mallei è un patogeno del Gruppo di Rischio 3. È un piccolo bacillo Gram negativo, non mobile, solitamente ossidasi negativo. La cellula batterica può essere diritta o lievemente ricurva con estremità arrotondate e margini ondulati. I bacilli si presentano isolati, accoppiati all'estremità, in fasci paralleli o a palizzata. Questi microrganismi sono di raro isolamento e non identificabili con le confezioni commerciali.

Anche *Burkholderia pseudomallei* appartiene ai patogeni del Gruppo di Rischio 3. Diversamente dalla precedente, è un bacillo Gram negativo, ossidasi-positivo, mobile. All'osservazione si presentano come fasci allungati, ora considerati come catene di microrganismi densamente ammassati. Nel materiale clinico la colorazione può essere distribuita in modo irregolare con colorazione di tipo bipolare. *B. pseudomallei* è nitrati positiva e ONPG negativa. È l'agente eziologico della melioidosi.

La diagnosi definitiva di melioidosi si avvale dell'isolamento colturale di *B. pseudomallei*, ma i risultati possono essere ottenuti troppo tardi per influenzare il trattamento clinico. Su agar nutriente si possono sviluppare colonie rugose, raggrinzite, simili a quelle di *P. stutzeri*; le colture sono spesso perlacee, rilucenti, con notevoli variazioni nell'aspetto delle colonie. Alcuni ceppi possono produrre colonie asciutte e rugose, altre sono chiaramente mucose, di solito prive di colore, ma occasionalmente producono pigmento giallo. Il battere si sviluppa normalmente a 42°C. Gli isolati di *B. pseudomallei* possiedono resistenza costitutiva a polimixina ed aminoglicosidi, sono sensibili a co-amoxiclavulanico. Le colonie di *P. Stutzeri* e *B. pseudomallei* possono essere simili. Consultare [HPA website](#) per la morfologia delle colonie. Le colonie sospette devono essere inviate al Laboratorio di Riferimento. La melioidosi può essere diagnosticata anche con metodo sierologico, ma i risultati possono essere di difficile interpretazione per presenza di elevati livelli anticorpali basali nelle zone endemiche.

Nei pazienti con polmonite, setticemia o ascessi che hanno compiuto viaggi nel sud est Asiatico o nell'Australia del nord, deve essere considerata la possibile infezione da *B. pseudomallei*, in modo particolare in quelli che presentano malattie associate a diabete mellito.

Burkholderia gladioli cresce rapidamente su terreni che contengono polimixina. Diversamente dal Bcc, è ossidasi negativa e non ossida maltosio e lattosio. *B. gladioli* è occasionalmente isolata dalle vie respiratorie di pazienti con FC ma, diversamente dai microrganismi del Bcc, la sua importanza clinica in questi pazienti rimane incerta. Per confermare l'identificazione possono essere richiesti metodi di biologia molecolare¹⁸.

***Stenotrophomonas maltophilia*¹⁹**

Negli isolati dei laboratori clinici *S. maltophilia*, dopo *P. aeruginosa*, occupa il secondo posto fra gli isolati non fermentanti il glucosio. Causa un'ampia varietà d'infezioni (batteriemie associate a cateteri intravascolari e polmoniti nosocomiali) nei pazienti con condizioni predisponenti, preferibilmente in quelli con malattia ematologia maligna. In altre occasioni gli isolati rappresentano spesso solo colonizzazione superficiale. *S. maltophilia* è ossidasi-negativa e mobile. Si presenta come bastoncino non sporulante, dritto o lievemente ricurvo. Rari ceppi possono essere ossidasi debolmente positivi. Su agar sangue le colonie possono apparire gialle o verdi. La resistenza in vitro all'imipenem è un indicatore utile per sospettare *S. maltophilia*. Alcuni ceppi possono produrre moderata beta-emolisi. E' stata segnalata crescita compresa fra 5°C e 40°C, ma la temperatura ottimale è a 35°C. La maggior parte delle confezioni commerciali d'identificazione sono in grado di riconoscere il batterio.

***Acinetobacter species*²⁰**

Studi recenti d'ibridizzazione DNA-DNA hanno posto in evidenza almeno 19 diverse specie genomiche di *Acinetobacter*. Sette di queste sono state classificate: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, e *A. radioresistens*. Nella pratica clinica, *A. baumannii* è l'isolato di maggior riscontro, in modo particolare nelle unità di terapia intensiva, e spesso è multi-resistente agli antimicrobici. Altre specie di comune isolamento sono *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii*, *A. johnsonii* ed *A. haemolyticus*.

Le specie *Acinetobacter* sono costituite da batteri corti, Gram negativi, a forma di bastoncino/coccobacillo con dimensione di 1.0 - 1.5 per 1.5 - 2.5 µm, spesso assumono forma coccoide e si presentano come diplococchi. La decolorazione Gram non è completa per ritenzione variabile di colorante associata a pleiomorfismo delle dimensione e della disposizione cellulare. Molti ceppi sono dotati di capsula²¹. Le colonie sono di solito lisce, talvolta mucose, colore da giallo tenue a grigio bianco ed alcuni ceppi ambientali possono produrre pigmento scuro diffusibile. La dimensioni delle colonie sono simili a quelle delle Enterobacteriaceae, dalle quali devono essere differenziate. *A. lwoffii* ed alcune altre specie sono lunghe meno di 0,5 µm dopo 24-48 ore, La temperatura ottimale della maggior parte dei ceppi è compresa fra 30°C - 35°C, si sviluppano bene a 37°C, ma alcuni ceppi non crescono a questa temperatura.

Le specie *Acinetobacter* sono aerobie strette, ossidasi-negative, catalasi-positive, non-mobili e non fermentanti. Alcuni isolati clinici, in modo particolare *Acinetobacter haemolyticus*, possono essere emolitici su agar sangue. La maggior parte delle confezioni commerciali d'identificazione è in grado di differenziare le specie *Acinetobacter* dagli altri non fermentanti e dalle Enterobacteriaceae. I metodi d'identificazione fenotipica delle specie *Acinetobacter* possono non essere attendibili – perertanto gli isolati di particolare rilievo clinico o epidemiologico devono essere inviati ad un Laboratorio di Riferimento.

Altri non-fermentanti

Sono noti molti altri bacilli Gram negativi non fermentanti il glucosio che occasionalmente sono stati isolati da campioni clinici. Di solito sono riscontrati come contaminanti dei dispositivi medici o in pazienti noti per condizione immunologica compromessa. Alcuni possono essere isolati occasionalmente dal tratto respiratorio di pazienti con infezioni polmonari croniche, quali fibrosi cistica o portatori di bronchiectasie. La conferma dell'identificazione con confezione commerciale di alcuni di questi microrganismi è talvolta difficile e può essere richiesta la tipizzazione molecolare^{22,23}. In questi casi è opportuno l'invio degli isolati al Laboratorio di Riferimento.

I bastoncini non-fermentanti, Gram-negativi, isolati occasionalmente da campioni clinici, includono:

Achromobacter (Alcaligenes) xylooxidans

Alcaligenes xylooxidans dal 1998 è classificata come *Achromobacter xylooxidans*²⁴. Occasionalmente è stata isolata dalle secrezioni delle vie respiratorie in pazienti con FC ed ha causato sepsi negli immuno-depressi^{25,26}. E' catalasi ed ossidasi positiva.

Specie *Alcaligenes*

Alcaligenes faecalis è il microrganismo di riferimento per la specie²⁷. Le colonie hanno margine sottile che diffonde in modo irregolare. E' catalasi negativa, ossidasi positiva e mobile.

Specie *Bordetella*

Per informazioni sulle specie *Bordetella* consultare [ID 5 - Identification of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis from selective agar.](#)

Specie *Brevundimonas*

Brevundimonas vesicularis e *Brevundimonas diminuta* crescono lentamente sui comuni terreni nutrienti²⁸. Diversamente da *B. diminuta*, *B. vesicularis* fornisce debole reazione all'ossidasi. Produce un pigmento carotenoidico che conferisce alle colonie colore giallo o arancio.

Specie *Elizabethkingia*

Elizabethkingia (in precedenza *Chryseobacterium*) *meningosepticum* è la specie più frequentemente associata ad infezioni gravi. Sebbene di raro riscontro, l'identificazione del microrganismo è importante perché si possono manifestare epidemie nei reparti per neonati ed è stata segnalata una percentuale di mortalità fino al 50%^{29,30}. Su agar sangue il microrganismo forma colonie pigmentate, di colore giallo pallido, che possono non essere evidenti dopo 24 ore (diversamente da quelle gialle scure di *E. indologenes*, isolate con maggior frequenza). *E. meningosepticum* non è mobile ed è ossidasi positivo. Idrolizza l'esculina e la gelatina, è positivo alla prova dell'*o*-nitrofenil-b-galactopiranoside (ONPG) e produce indolo. La reazione dell'indolo è debolmente positiva dopo 48 ore d'incubazione a 30°C; una reazione di maggior intensità può essere osservata dopo incubazione della coltura in Infuso Cuore Cervello rispetto a quella sviluppata in brodo triptofano. Il batterio *C. indologenes* non è mobile ed è ossidasi-positivo³¹.

Specie *Comamonas*

Comamonas terrigena è il microrganismo di riferimento per la specie, mobile, ossidasi e catalasi positivo. La reazione dell'indolo da parte di *Comamonas acidovorans* è caratterizzata dallo sviluppo di colorazione arancio, dovuta all'acido antranilico e non alla formazione di indolo dal triptofano.

Specie *Methylobacterium*

Le colonie della specie *Methylobacterium* crescono lentamente su agar sangue, sono asciutte ed alla luce incandescente assumono colore rosa o corallo³². La temperatura ottimale di crescita è compresa fra 25°C - 30°C. Il microrganismo è ossidasi positivo e mobile, ma queste sue caratteristiche possono essere di moderata intensità. Le specie *Methylobacterium* sono Gram-negative, ma possono colorarsi in modo attenuato con risultati variabili, ed essere confuse con le specie *Rhodococcus* o *Roseomonas*. Le singole cellule assumono un caratteristico aspetto microscopico per presenza di grandi vacuoli privi di colore.

Specie *Moraxella*

Per informazioni sulle specie *Moraxella* consultare [ID 11 - Identification of Moraxella species and morphologically similar organisms.](#)

Specie *Ochrobactrum*

Ochrobactrum anthropi è un batterio ureasi-positivo, esculina ed ONPG-negativo. Dopo 24 ore d'incubazione su agar sangue si sviluppano colonie di 1 mm di diametro con aspetto circolare, basse, convesse, lisce, lucenti³³. Su alcuni terreni si possono sviluppare colonie mucose.

Specie *Oligella*

Oligella ureolytica cresce lentamente su agar sangue con sviluppo di colonie puntiformi dopo 24 ore d'incubazione e larghe dopo tre giorni. Le colonie sono bianche, opache, e non-emolitiche. Il battere è ossidasi-positivo e mobile. Negli isolati con aspetto coccobacillare, non mobili ed ossidasi negativi, *Oligella urethralis* è simile alle specie *Moraxella* ed *Acinetobacter*.

Specie *Psychrobacter*

Le cellule di *Psychrobacter immobilis* e *Psychrobacter phenylpyruvicus* (in precedenza *Moraxella*) assumono forma da coccoide a corti bastoncini sottili che possono contenere vacuoli e presentare colorazione periferica. Il battere è ossidasi-positivo e non mobile. Temperatura ottimale di sviluppo a 20° C, scarso a 37°C.

Specie *Ralstonia*

Ralstonia pickettii (in precedenza *Burkholderia pickettii*) non è pigmentata, ossidasi-positiva, cresce a 41°C, non metabolizza l'arginina. Su agar selettivo assomiglia ai microrganismi del gruppo Bcc e la sua differenziazione biochimica può essere difficile³⁴.

Specie *Roseomonas*

Le specie *Roseomonas* producono pigmento rosa-rosso e le cellule assumono aspetto di bastoncini coccoidi a coppie o a corte catene, o a forma prevalente di cocchi con rari bastoncini³⁵. La crescita su agar sangue è puntiforme, rosa pallida, lucente, rilevata, spesso mucoida dopo 2-3 giorni d'incubazione a 35°C - 37°C. Il batterio è debolmente ossidasi-positivo od ossidasi-negativo, catalasi-positivo ed ureasi-positivo. Il genere comprende 6 specie delle quali 4 sono segnalate come agenti causali d'infezione.

Specie *Shewanella*

Shewanella putrefaciens è ossidasi-positiva e mobile. Le colonie emanano odore caratteristico e su agar sangue producono pigmento arancio-rossastro³⁶.

Specie *Sphingobacterium*

Sono ossidasi-positive e non-mobili. Le colonie producono pigmento giallo. Le specie più frequentemente isolate dai materiali clinici sono *Sphingobacterium multivorum* e *Sphingobacterium spiritivorum*.

Principi di Identificazione

Gli isolati su coltura primaria sono identificati dall'aspetto della colonia, colorazione Gram e prove preliminari, che consentono l'identificazione presuntiva. Può essere eseguita una identificazione successiva con confezioni di tipo commerciale

Informazione Tecnica/Limitazioni

I sistemi commerciali di primo impiego possono essere limitati nella possibilità d'identificare in modo accurato i microrganismi non fermentanti il glucosio, che talvolta richiedono laboriose procedure per la loro differenziazione fenotipica. Pochi sistemi identificano in modo accurato i batteri del Bcc ed altri microrganismi, come *S. maltophilia*, che può essere erroneamente assegnata a questo gruppo. Tutte le prove d'identificazione dovrebbero essere teoricamente eseguite su colonie cresciute su agar non selettivo. È essenziale che i laboratori seguano le indicazioni del produttore nell'uso delle prove d'identificazione di tipo commerciale. Richiedono particolare attenzione gli isolati che forniscono un'identificazione insolita. Questi ceppi devono essere inviati al Laboratorio di Riferimento se è richiesta la conferma dell'identificazione.

1 Considerazioni sulla Sicurezza³⁷⁻⁵³

B. mallei e *B. pseudomallei* sono microrganismi del Gruppo di Rischio 3, e gli isolati e campioni sospetti devono essere manipolati in un ambiente con livello di contenimento 3. Se questi isolati sono inviati al laboratorio di riferimento si devono prendere contatti preliminari.

Fare riferimento alle attuali linee guida sulla sicurezza per la manipolazione di tutti i microrganismi presentati in questo SMI.

Le procedure di laboratorio che generano aerosol infettivi devono essere eseguite in cabina microbiologica di sicurezza.

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

Bacilli Gram negativi non fermentanti il Glucosio di frequente isolamento nei laboratori clinici

Specie *Acinetobacter*

Burkholderia cepacia complex

Pseudomonas aeruginosa

Stenotrophomonas maltophilia

Patogeni di Gruppo di Rischio 3

Burkholderia mallei

Burkholderia pseudomallei

3 Identificazione

3.1 Aspetto Microscopico

Colorazione Gram ([TP 39 - Staining Procedures](#))

Bastoncini Gram negativi

3.2 Terreno di Primo Isolamento

Agar selettivo per *Pseudomonas* incubazione per 16 – 48 ore in aerobiosi a 35°C - 37°C poi a 30°C fino a 5 giorni

Agar selettivo per *Burkholderia cepacia* incubazione per 16 – 48 ore in aerobiosi 35°C a 37°C, poi a 30°C fino a 5 giorni

Agar sangue o cioccolato incubazione 16 - 48 ore in CO₂ a 35°C - 37°C

Agar CLED/McConkey incubazione 16 - 48 ore in aerobiosi a 35°C - 37°C

3.3 Aspetto delle Colonie

Su *Burkholderia cepacia* selective agar le colonie del *B. cepacia* complex sviluppano un diametro di 1-2 mm con viraggio del terreno a colore rosa. Su questo terreno possono crescere anche specie *Candida*, *S. maltophilia*, *R. pickettii*, alcune specie *Pseudomonas* e molti altri batteri Gram negativi colistina-resistenti, come *A. johnsonii*. Consultare le indicazioni del produttore per l'aspetto della crescita su altri tipi di terreno.

Su agar selettivo per *Pseudomonas* le colonie di *P. aeruginosa* sono circondate da pigmento e divengono fluorescenti se esposte a luce ultravioletta di corta lunghezza d'onda (254 nm).

Morfologia della colonia

Produzione di pigmento

3.4 Procedure di Prova

Prova dell'ossidasi (consultare [\(TP 26 – Oxidase Test\)](#))

P. aeruginosa è ossidasi-positiva. Altri bastoncini Gram negativi non fermentanti il glucosio possono essere ossidasi positivi o negativi come segnalato in precedenza.

Identificazione successiva

Confezione commerciale per identificazione

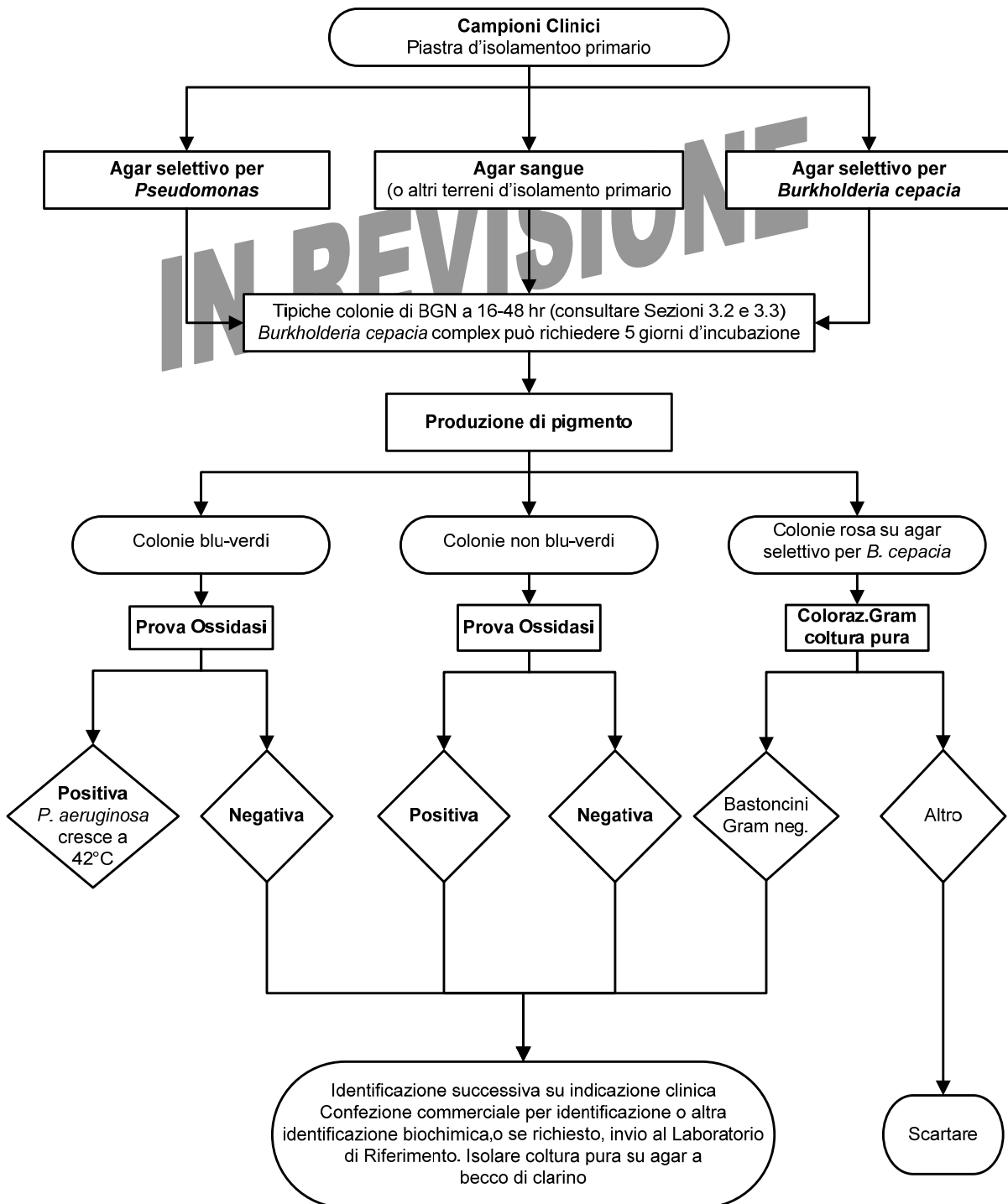
3.5 Identificazione Successiva

Seguire le indicazioni delle confezioni commerciali e/o inviare ad un Laboratorio di Riferimento

3.6 Conservazione e Invio

Se richiesto l'invio al Laboratorio di Riferimento, salvare l'isolato su agar sangue, agar nutriente, o tamponi con carbone.

4 Identificazione di Bastoncini Gram negativi Non-Fermentanti il Glucosio



Il Diagramma di Flusso rappresenta solo un'indicazione

5 Refertazione

5.1 Identificazione Presuntiva

Se si riscontrano appropriate caratteristiche di crescita, aspetto della colonia, colorazione Gram della coltura.

5.2 Conferma dell'Identificazione

Successiva alle prove biochimiche e/o dopo il referto del Laboratorio di Riferimento.

5.3 Medico Microbiologo

Informare il medico microbiologo di tutti gli isolati con identificazione preliminare o confermata per *B. mallei* e *B. pseudomallei*.

In accordo ai protocolli locali, il medico microbiologo deve essere informato dell'identificazione preliminare o confermata di bastoncini Gram negativi non fermentanti il glucosio isolati da campioni prelevati da sedi normalmente sterili.

Se l'isolamento origina da altra sede(i), deve essere valutata l'opportunità della segnalazione al medico microbiologo in accordo col protocollo locale, come nei casi di:

- Paziente immuno-depresso, in modo particolare se neutropenico
- Infezione associata a dispositivo sanitario

Isolati presunti o confermati di *Burkholderia cepacia* complex da pazienti con fibrosi cistica

Il medico microbiologo deve essere informato se il modulo di richiesta riporta informazioni importanti che facciano sospettare infezione da *Burkholderia pseudomallei*, quale setticemia, polmonite, o malattia multi-sistemica con formazione di ascessi (ed in modo analogo per eventuale epidemia) associate a:

- viaggio all'estero o servizio militare
- lavoro in laboratorio, assistenza e settore agricolo, specialmente all'estero in Australia, Asia del Sud o Sud Est asiatico.

Burkholderia cepacia complex presunta o confermata può essere isolata da pazienti con fibrosi cistica.

- attività agricola, zootecnica, di laboratorio o all'estero, specialmente in Medio Oriente e Sud America.

Seguire i protocolli locali per la refertazione al clinico.

5.4 CCDC

Fare riferimento al Memorandum locale di informazione.

5.5 Public Health England⁵⁴

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

5.6 Gruppo Controllo Infezione

Informare il gruppo di controllo dell'infezione degli isolati presunti o confermati di *B. mallei* e *B. pseudomallei*.

6 Invio

6.1 Laboratorio di Riferimento

Per informazioni su accertamenti disponibili, tempi di risposta, procedure di trasporto ed altre informazioni riguardanti gli accertamenti disponibili, il tempo di risposta, procedure di trasporto ed altre richieste per l'invio del campione al laboratorio di riferimento rivolgersi a:

Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections Reference Unit (AMRHAI)
Microbiology Services Division
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

<http://www.hpa.org.uk/webw/HPAweb&Page&HPAwebAutoListName/Page/1158313434370?p=1158313434370>

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^{54,55} o Equivalente⁵⁶⁻⁵⁹

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

Identificazione di Bastoncini Gram Negativi Non-Fermentanti il Glucosio

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 HIV & Sexually Transmitted Infections (STIs), Healthcare Associated Infections (HCAIs) and Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners' STIs, HCAIs e CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non nel 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories'.

Esistono accordi diversi in Scozia^{56,57}, Galles⁵⁸ e Irlanda del Nord⁵⁹.

IN REVISIONE

Bibliografia

1. Pitt TL, Simpson AJ. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia* spp. In: Hawkey PM, Gillespie SH, editors. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. Chichester: John Wiley and Sons; 2006. p. 426-43.
2. Ogunnariwo J, Hamilton-Miller JM. Brown- and red-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*: differentiation between melanin and pyorubrin. *J Med Microbiol* 1975;8:199-203.
3. Govan JRW. *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* spp. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, editors. *Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology*. 14th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996. p. 413-24.
4. Gilligan PH. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1995. p. 509-19.
5. Phillips I. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in the clinical laboratory. *J Med Microbiol* 1969;2:9-16.
6. Hsueh PR, Teng LJ, Pan HJ, Chen YC, Sun CC, Ho SW, et al. Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. *J Clin Microbiol* 1998;36:2914-7.
7. Noble RC, Overman SB. *Pseudomonas stutzeri* infection. A review of hospital isolates and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;19:51-6.
8. Mahenthiralingam E, Baldwin A, Vandamme P. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 2002;51:533-8.
9. Govan JR, Hughes JE, Vandamme P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol* 1996;45:395-407.
10. Coenye T, Vandamme P, Govan JR, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2001;39:3427-36.
11. Gravel-Tropper D, Sample ML, Oxley C, Toye B, Woods DE, Garber GE. Three-year outbreak of pseudobacteremia with *Burkholderia cepacia* traced to a contaminated blood gas analyzer. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17:737-40.
12. Hutchinson GR, Parker S, Pryor JA, Duncan-Skingle F, Hoffman PN, Hodson ME, et al. Home-use nebulizers: a potential primary source of *Burkholderia cepacia* and other colistin-resistant, gram-negative bacteria in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996;34:584-7.
13. Panlilio AL, Beck-Sague CM, Siegel JD, Anderson RL, Yetts SY, Clark NC, et al. Infections and pseudoinfections due to povidone-iodine solution contaminated with *Pseudomonas cepacia*. *Clin Infect Dis* 1992;14:1078-83.
14. Henry D, Campbell M, McGimpsey C, Clarke A, Loudon L, Burns JL, et al. Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999;37:1004-7.
15. Wright RM, Moore JE, Shaw A, Dunbar K, Dodd M, Webb K, et al. Improved cultural detection of *Burkholderia cepacia* from sputum in patients with cystic fibrosis. *J Clin Pathol* 2001;54:803-5.
16. Shelly DB, Spilker T, Gracely EJ, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J Clin Microbiol* 2000;38:3112-5.

Identificazione di Bastoncini Gram Negativi Non-Fermentanti il Glucosio

17. Brisse S, Stefani S, Verhoef J, Van Belkum A, Vandamme P, Goessens W. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2002;40:1743-8.
18. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Roller C. Discrimination of *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia* species detectable in cystic fibrosis patients by PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36:2748-51.
19. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:57-80.
20. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:148-65.
21. Pitt TL, Kaufmann ME, Patel PS, Bengel LC, Gaskin S, Livermore DM. Type characterisation and antibiotic susceptibility of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland. *J Med Microbiol* 1996;44:203-10.
22. Coenye T, Goris J, Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol* 2002;40:2062-9.
23. Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, Quesne G, Lenoir G, Berche P, et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol* 2002;40:3793-7.
24. Clermont D, Harmant C, Bizet C. Identification of strains of *Alcaligenes* and *Agrobacterium* by a polyphasic approach. *J Clin Microbiol* 2001;39:3104-9.
25. Saiman L, Chen Y, Tabibi S, San Gabriel P, Zhou J, Liu Z, et al. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2001;39:3942-5.
26. Manfredi R, Nanetti A, Ferri M, Chiodo F. Bacteremia and respiratory involvement by *Alcaligenes xylosoxidans* in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:933-8.
27. Bizet J, Bizet C. Strains of *Alcaligenes faecalis* from clinical material. *J Infect* 1997;35:167-9.
28. Gilad J, Borer A, Peled N, Riesenberger K, Tager S, Appelbaum A, et al. Hospital-acquired *Brevundimonas vesicularis* septicaemia following open-heart surgery: case report and literature review. *Scand J Infect Dis* 2000;32:90-1.
29. Chiu CH, Waddington M, Greenberg D, Schreckenberger PC, Carnahan AM. Atypical *Chryseobacterium meningosepticum* and meningitis and sepsis in newborns and the immunocompromised, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2000;6:481-6.
30. Hoque SN, Graham J, Kaufmann ME, Tabaqchali S. *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum* outbreak associated with colonization of water taps in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2001;47:188-92.
31. Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Ho SW, Hsieh WC, Luh KT. Increasing incidence of nosocomial *Chryseobacterium indologenes* infections in Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:568-74.
32. Sanders JW, Martin JW, Hooke M, Hooke J. *Methylobacterium mesophilicum* infection: case report and literature review of an unusual opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis* 2000;30:936-8.
33. Alnor D, Frimodt-Moller N, Espersen F, Frederiksen W. Infections with the unusual human pathogens *Agrobacterium* species and *Ochrobactrum anthropi*. *Clin Infect Dis* 1994;18:914-20.

Identificazione di Bastoncini Gram Negativi Non-Fermentanti il Glucosio

34. Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Infection by *Ralstonia* species in cystic fibrosis patients: identification of *R. pickettii* and *R. mannitolilytica* by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis* 2002;8:692-6.
35. Lewis L, Stock F, Williams D, Weir S, Gill VJ. Infections with *Roseomonas gilardii* and review of characteristics used for biochemical identification and molecular typing. *Am J Clin Pathol* 1997;108:210-6.
36. Brink AJ, van Straten A, van Rensburg AJ. *Shewanella* (*Pseudomonas*) *putrefaciens* bacteremia. *Clin Infect Dis* 1995;20:1327-32.
37. 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".
38. 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.
39. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
40. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
41. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
42. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
43. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
44. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
45. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
50. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.

Identificazione di Bastoncini Gram Negativi Non-Fermentanti il Glucosio

51. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
52. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
53. 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
54. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.
55. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
56. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
57. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
58. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
59. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).