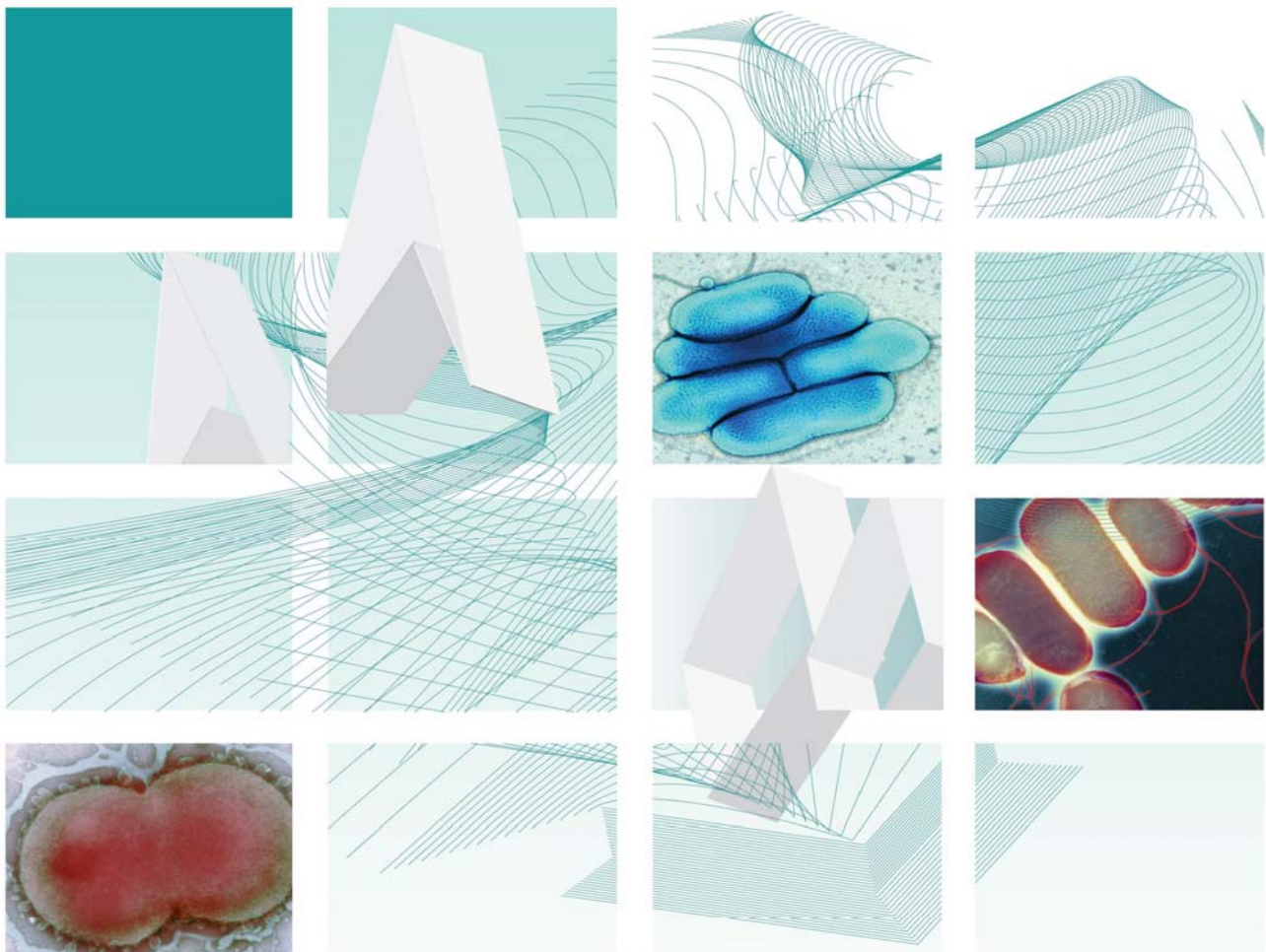




Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito

Identificazione delle specie *Listeria*, e di altri bastoncini Gram Positivi non Sporigeni (tranne *Corynebacterium*)



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

Per ulteriori informazioni contattare:

Standards Unit
Microbiology Services Division
Health Protection Agency
61 Colindale Avenue
London NW9 5EQ

E-mail: standards@phe.gov.uk

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

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



The British Society for Antimicrobial Chemotherapy



society for general
Microbiology
www.sgm.ac.uk



SCOTTISH MICROBIOLOGY
ASSOCIATION

BIAM
British Infection Association

Contenuti

RINGRAZIAMENTI.....	2
TABELLA MODIFICHE	4
RICERCHE MICROBIOLOGICHE: STANDARD DEL REGNO UNITO: SCOPO E OBIETTIVO	6
SCOPO DEL DOCUMENTO	9
INTRODUZIONE.....	9
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI.....	15
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA	16
2 MICROORGANISMI BERSAGLIO	16
3 IDENTIFICAZIONE	16
4 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE F <i>LISTERIA</i> E DI ALTRI BASTONCINI NON SPORULANTI GRAM NEGATIVI (TRANNE <i>CORYNEBACTERIUM</i>)	22
5 REFERTAZIONE	23
6 INVIO	24
7 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE	25
BIBLIOGRAFIA	26



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

Ogni metodo SMI ha un proprio registro delle modifiche. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili sul sito web standards@phe.gov.uk.

I documenti nuovi o revisionati dovrebbero essere controllati nel laboratorio secondo il sistema locale di gestione della qualità.

ModificaNo/Data.	8/18.06.14
Emissione eliminate no.	4.2
Emissione inserita no.	4.3
Sezione(i) interessata	Modifica
Scopo del documento.	Lo scopo è stato aggiornato per dare un collegamento per l'identificazione delle specie <i>Corynebacterium</i> .
Introduzione.	Tassonomia aggiornata. Ulteriori informazioni sono state aggiunte alla sezione Caratteristiche. Aggiunta di specie <i>Listeria</i> clinicamente importanti. Altri bastoncini non sporigeni clinicamente importanti sono pure menzionati e descritte le loro caratteristiche. Aggiornata bibliografia nei principali sottocapitoli. La Sezione Criteri di Identificazione è stata aggiornata per indicare le temperature corrette usate per la motilità disordinata per l'identificazione della specie <i>Listeria</i> .
Informazione Tecnica/Limitazioni.	Aggiunta informazione riguardante il test di motilità e la differenziazione della specie <i>Listeria</i> dagli streptococchi di Gruppo B.
Considerazioni sulla sicurezza	Questa sezione è stata aggiornata per inserire voci bibliografiche
Microrganismi Bersaglio	La sezione dei Microrganismi Bersaglio è stata aggiornata.
Identificazione.	Apportati aggiornamenti in 3.1, 3.3 and 3.4 per inserire gli standard nella pratica. Ciò include anche tutti i Gram positivi diversi dalle specie <i>Listeria</i> . La Sezione 3.4 è stata di conseguenza aggiornata La Tabella 3 è stata aggiornata con bibliografia.

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

	La sezione 3.5 è stata aggiornata per includere i Metodi Molecolari Rapidi. 3.7 è stata rimossa e inserita nella sezione "Informazioni Tecniche/Limitazioni"
Diagramma di flusso per Identificazione	Modifica del diagramma di flusso per l'identificazione delle specie <i>Listeria</i> è stata apportata per facilitare l'informazione
Refertazione.	Le sottosezioni 5.2, 5.3, 5.5 e 5.6 sono state aggiornate per specificare le modalità di refertazione
Invio.	Gli indirizzi dei Laboratori di Riferimento sono stati aggiornati
Intero Documento	Documento presentato in nuovo formato
Bibliografia	Bibliografia in parte aggiornata
Appendici	Il Diagramma di flusso in appendice, dal titolo "Caratteristiche per distinguere tra non sporigeni Gram positivi su agar sangue" è stato eliminato da questo documento e conglobato nel diagramma di flusso della sezione 4

ModificaNo/Data.	7/07.03.14
Emissione eliminata no.	2.1
Emissione inserita no.	2.2
Sezione(i) interessata	Modifica
Intero documento.	<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>

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

Utilizzatori delle SMI

- Nel Regno Unito, le SMI sono principalmente intese come risorsa generale per i professionisti che operano nel campo della medicina di laboratorio e delle malattie infettive.
- Le SMI forniscono ai clinici informazioni sull'elenco dei test disponibili e sullo standard dei servizi di laboratorio per la diagnosi delle infezioni nei loro pazienti, come anche provvedono alle documentazioni 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 integrata 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 fasi 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 le indagini appropriate per particolari condizioni cliniche. Le linee guida della qualità descrivono metodologie di laboratorio essenziali che sono alla base della qualità, ad esempio la validazione del saggio 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 web <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnershipshhttp>. 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 il dialogo. Le opinioni espresse sono ricercate con un processo di consultazione.

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 buona procedura standard 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 supplementari ove opportuno. Le SMI aiutano i laboratori a soddisfare i requisiti dell'accREDITamento promuovendo procedure d'elevata qualità che possono essere verificate. Le SMI forniscono inoltre un punto di riferimento per lo sviluppo del metodo.

L'efficienza delle SMI dipende dal personale competente 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 dovrebbero partecipare a controlli di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

Coinvolgimento del Paziente e della Comunità

I Gruppi di Lavoro sono impegnati per favorire il coinvolgimento dei pazienti e del pubblico nello sviluppo delle SMI. 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 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 soggetto agli obiettivi PHE di Uguaglianza http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317133470313. Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità grazie a un'efficace consultazione con i membri del pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialisti coinvolti.

Dichiarazione Legale

Sebbene ogni cura sia stata intrapresa per la preparazione delle SMI, la PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, declinano la loro responsabilità da tutte le perdite, i costi, i reclami, danni o le spese derivanti da o connesse all'uso di una SMI o a qualsiasi informazione ivi contenuta, per quanto possibile in base alle leggi vigenti. 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, da un'azione legislativa, o in seguito ad indicazioni da parte dell'ente accREDITato NICE.

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

Riferimento Suggestito per questo Documento

Public Health England. (2014). Identification of *Listeria* species, and other Non-Sporing Gram Positive Rods (except *Corynebacterium*). UK Standards for Microbiology Investigations. ID 3 Emissione 3. <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>.

Scopo del Documento

Questa SMI descrive l'identificazione di specie *Listeria* e di altri bastoncini Gram positivi non sporigeni (tranne le specie *Corynebacterium*) isolati da campioni clinici a livello di genere e specie.

Per l'identificazione delle specie *Corynebacterium* consultare [ID 2 - Identification of *Corynebacterium*](#)

Questa SMI deve essere usata congiuntamente con le altre SMI

Introduzione

E' stato utilizzato un approccio sistematico per differenziare con criteri clinici i bastoncini Gram positivi isolati, a morfologia simile, aerobi e anaerobi facoltativi non sporigeni. In questa SMI non sono descritti microrganismi a vera struttura ramificata, quali le specie *Actinomyces*, *Nocardia* e *Streptomyces* e quelli che generano spore. Sui terreni descritti in questo documento possono essere isolate specie *Mycobacterium* a rapida crescita; i bacilli acido-resistenti devono essere inviati al Laboratorio di Riferimento.

Tassonomia

Listeria^{1,2}

Attualmente nel genere *Listeria* sono validamente classificate dieci specie: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae* and *L. weihenstephanensis*. Fra queste dieci, le prime sei sono potenzialmente infettive per l'uomo, anche se in alcuni casi raramente.

La specie tipo è *Listeria monocytogenes*.

Altri bastoncini Gram positivi non sporigeni

I microrganismi classificati come bastoncini Gram positivi non sporigeni sono fra loro molto diversi, non solo per aspetto morfologico, ma anche per quello metabolico e strutturale.

Caratteristiche

Specie *Listeria*

Le specie *Listeria* sono costituite da corti bastoncini Gram positivi 0,4, 0.5 x 0.5-2.0 µm, con estremità arrotondate, isolati in corte catenelle e occasionalmente assumono aspetto filamentoso. I membri del genere sono anaerobi facoltativi, non sporigeni, non acido resistenti e non sono dotati di capsula. Le specie *Listeria* sono mobili per flagelli peritrichi quando si sviluppano a 20°C - 25°C, manifestano una caratteristica motilità "disordinata". La temperatura ottimale è di 30-37°C (ma non per la motilità).

Su agar sangue le colonie non sono pigmentate e possono assomigliare a quelle degli streptococchi β-emolitici. Se si usano agar cromogeni, seguire le istruzioni del produttore.

Sono catalasi positive, ossidasi negative e fermentano i carboidrati^{1,3}.

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

Le specie *Listeria* sono diffusamente distribuite nell'ambiente, alcune specie sono patogene per l'uomo e gli animali.

Le specie clinicamente importanti sono:

L. monocytogenes

Al microscopio appaiono come piccoli bastoncini, a volte sono disposti in corte catene. Negli strisci diretti possono apparire di forma coccoide, e queste possono essere scambiate per streptococchi. I bastoncini più lunghi possono assomigliare ai corinebatteri. Su agar sangue presentano attività emolitica che è stata usata come caratteristica per distinguere *Listeria monocytogenes* dalle altre specie *Listeria*, ma questo non è un criterio assolutamente definitivo. Potrebbe essere necessaria un'ulteriore differenziazione biochimica per distinguere le diverse specie *Listeria*. *L. monocytogenes* è catalasi positiva e ossidasi negativa.

L. monocytogenes è l'agente della listeriosi, grave infezione causata dal consumo di cibo contaminato contenente il battere. La listeriosi è stata riconosciuta come un importante problema di salute pubblica e la malattia colpisce le donne, soprattutto in gravidanza, i neonati, gli anziani, e le persone con sistema immunitario indebolito.

***L. ivanovii*⁴**

Le cellule sono piccole, a bastoncino, mobili. Le colonie su agar triptosio sono molto piccole (da 0,5 a 1 millimetro di diametro dopo 1 o 2 giorni di incubazione a 37°C), regolari, lisce e appaiono di colore verde blastro quando sono visualizzate da luce trasmessa obliqua. Le colonie su agar sangue di pecora o cavallo (5%) sono intensamente β-emolitiche. La crescita si manifesta a 4 C entro 5 giorni. Sono anaerobie facoltative.

L. ivanovii sono positive per catalasi, Voges-Proskauer, test rosso metile, e idrolisi dell'esculina. Sono negative per ossidasi, urea, idrolisi della gelatina e riduzione dei nitrati. Non producono indolo e H₂S. Non producono acido e gas da D-glucosio e xilosio. Non è prodotto acido da D-mannitolo, L-ramnosio, o α-metil-D-mannoside.

La specie è stata isolata da animali sani, portatori umani e dall'ambiente. In seguito, questa specie è stata suddivisa in 2 sottospecie. Queste sono; *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* e *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis*⁵. La maggior parte delle caratteristiche sono simili a quelle di *L. ivanovii*, tranne che *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* non produce acido da ribosio, ma produce acido da N-acetil-P-D-mannosamina dopo 18 a 24 ore di incubazione a 37°C⁴.

***L. seeligeri*⁶**

Le cellule sono piccole (da 0,4 a 0,8 x 0,5 a 2,5 μm) a bastoncino, mobili con flagelli peritrichi. Le colonie su agar triptosio sono simili a quelle di *L. welshimeri*. La crescita avviene a 4 °C entro 5 giorni. Sono anaerobie facoltative.

Sono positive per catalasi, Voges-Proskauer e, test rosso metile; e idrolisi dell'esculina. Sono negative per ossidasi, riduzione dei nitrati, idrolisi dell'urea e produzione di indolo. Produce acido, ma non gas, da D-glucosio e D-xilosio. Non è prodotto acido da D-mannitolo o L-ramnosio. La maggior parte dei ceppi non produce acido da α-metil-D-mannoside.

Sono state isolate da piante, suolo, e feci animali (ovini) in Europa.

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

L. innocua sono piccoli bastoncini isolati o in corte catenelle. Sono mobili con flagelli peritrichi. Sono mesofile, operando alla temperatura ottimale di 30-37 °C.

Le *Listeria innocua* hanno un metabolismo molto complesso. Tra numerosi altri composti organici e inorganici, sono in grado di metabolizzare metano, zolfo e azoto. Questi microrganismi sono dotati anche di numerose vie biosintetiche, tra cui la sintesi del peptidoglicano. Le *L. innocua*, come gli altri componenti del suo genere, sono anaerobie facoltative, ciò significa che possono metabolizzare il glucosio (e altri zuccheri semplici) sia in condizioni aerobiche che anaerobiche. Con il metabolismo aerobico del glucosio formano acido lattico e acido acetico. Tuttavia, in condizioni anaerobiche, il metabolismo del glucosio produce solo acido lattico⁷.

Questa specie è diffusa nell'ambiente e negli alimenti ed è stata anche associata a un caso segnalato di batteriemia a esito infausto⁸.

L. welshimeri⁶

Le cellule sono piccole (da 0,4 a 0,5, da 0,5 a 2,0µm) a bastoncino, mobili con flagelli peritrichi. Le colonie su agar triptosio sono piccole (da 1 a 2 millimetri di diametro dopo 1 o 2 giorni d'incubazione a 37°C), regolari e lisce di colore blu-verde quando sono esaminate con luce trasmessa obliqua. Gli eritrociti di pecora non sono emolizzati. La crescita avviene a 4°C entro 5 giorni.

Il metabolismo è anaerobico facoltativo. E' prodotto acido, ma non gas da D-glucosio, D-xilosio, e α-metil-D-mannoside. Acido può o non può essere prodotto da L-ramnosio. Acido non è prodotto da D-mannitolo. Sono positive per catalasi, idrolisi dell'esculina, Voges-Proskauer e test rosso metile, e negative per ossidasi, urea, idrolisi della gelatina, indolo, produzione di H₂S e riduzione dei nitrati.

Sono state isolate da piante in decomposizione e dal suolo.

L. grayi

Secondo Rocourt e al. (1992), *Listeria grayi* è un sinonimo eterotipico precedente di *Listeria murrayi* e così entrambe sono state assegnate a una sola specie, *Listeria grayi*⁹.

Le cellule sono costituite da bastoncini di piccole dimensioni (da 0,4 a 0,5 x 0,5 a 2µm) peritriche e mobili. Le colonie su agar triptosio sono piccole (da 1 a 2 millimetri di diametro dopo 1 o 2 giorni di incubazione a 37 °C), regolari e lisce. La crescita si sviluppa a 4 °C entro 5 giorni.

Il metabolismo è anaerobio facoltativo. Sono positive per catalasi, idrolisi dell'esculina, Voges-Proskauer e test del rosso metile e negative per ossidasi, idrolisi dell'urea e della gelatina, produzione H₂S e di indolo. La riduzione dei nitrati in nitriti è variabile. Producono acido, ma non gas da glucosio, mannitolo, e altri zuccheri. Gli eritrociti di pecora non sono emolizzati.

Altri Bastoncini Gram Positivi non Produttori di Spore¹⁰⁻¹²

Specie *Arcanobacterium*¹³

Sono note 11 specie di cui 5 sono state ri-assegnate al genere *Trueperella* e delle restanti 6 specie, solo una è riconosciuta in grado d'infettare gli esseri umani, *Arcanobacterium haemolyticum*¹⁴.

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

Le cellule sono sottili, irregolari e prevalentemente disposte ad angolo per dare formazioni a V durante le prime 18 ore di crescita su agar sangue, divenendo granulari e segmentate, simili a piccoli cocci irregolari con il passare del tempo. Sono a forma di bastoncino e a cellule coccoidi, Gram positive, non acido-resistenti e non mobili. Non formano endospore. Sono anaerobie facoltative. La crescita è notevolmente migliorata in atmosfera con CO₂. La crescita è scarsa sui terreni comuni, ma favorita in terreni contenenti sangue o siero. La temperatura ottimale per la crescita è 37 °C. Sono in grado di resistere al riscaldamento a 60°C per 15 min.

Sono positive per catalasi e CAMP-test.

***Arcanobacterium haemolyticum* (in precedenza *Corynebacterium haemolyticum*)**

Su agar sangue dopo 48 ore le colonie producono β-emolisi e sono simili a quelle di *Trueperella pyogenes*. *A. haemolyticum* non è mobile, è anaerobio facoltativo e, a differenza delle specie *Corynebacterium*, è catalasi negativo¹⁵.

Sono stati isolati dalla gola di individui infetti.

Arcanobacterium pyogenes

Questo microrganismo è stato riclassificato in un nuovo genere. Consultare di seguito specie *Trueperella*.

Arcanobacterium bernardiae

Questo è stato riclassificato in un nuovo genere. Consultare di seguito specie *Trueperella*.

Specie *Aureobacterium*

Le Specie *Aureobacterium* sono Gram positive, irregolari, a forma di corti bastoncini e sono catalasi positive. Sono aerobie obbligate, producono acido dai carboidrati per via ossidativa piuttosto che fermentativa. I ceppi possono essere resistenti alla vancomicina e possono essere distinti da *C. aquaticum* per l'idrolisi della caseina e della gelatina^{16,17}.

Specie *Bifidobacterium*

Le specie *Bifidobacterium* variano per forma e possono essere ricurve, claviformi, bastoncini ramificati o occasionalmente coccoidi, Gram positive, dimensioni 0,5-1,3 x 1,5 8µm. Le cellule spesso si colorano in modo irregolare. La crescita è anaerobica, ma alcune specie possono crescere in aria arricchita con 10% di CO₂. Le specie *Bifidobacterium* non sono sporigene, non acido resistenti e non mobili. Le specie *Bifidobacterium* fermentano i carboidrati e sono catalasi negative¹.

Specie *Brevibacterium*

Le specie *Brevibacterium* sono costituite da bastoncini Gram-positivi, che mostrano un evidente ciclo con morfologia a bastoncino-cocco. In sottocultura recente, le cellule appaiono come bacilli, ma diventano cocci nelle culture più datate. Le colonie su agar sangue non sono emolitiche e possono virare a un colore giallo-verde dopo 48 ore di incubazione. Le specie *Brevibacterium* non sono mobili, sono alotolleranti (> 6,5% NaCl), aerobiche, ureasi negative e catalasi positive^{15, 18}.

Specie *Cellulomonas*

Le specie *Cellulomonas* sono costituite da bastoncini di forma irregolare, sottili, Gram positivi che formano colonie pigmentate di colore giallo o arancio. Sono catalasi positive possono essere non mobili o mobili per presenza di flagello singolo o sparsi lateralmente. Uno dei loro principali tratti distintivi è la capacità di degradare la cellulosa, utilizzando enzimi come endoglucanasi ed exoglucanasi. Sono dotati di metabolismo ossidativo e fermentativo¹⁹. Le specie *Cellulomonas* differiscono dalle specie *Oerskovia* in quanto mancano di crescita delle ife¹⁵.

Dermabacter hominis

Le specie *Dermabacter* sono costituite da bastoncini molto corti, Gram positivi, che possono essere erroneamente considerati cocchi. *Dermabacter hominis*, attualmente l'unico membro del genere, non è emolitico, non mobile e catalasi positivo. Le specie *Dermabacter* sono fermentative e producono acido da glucosio, lattosio, saccarosio e maltosio. Idrolizzano l'esculina e producono fosfatasi alcalina, pirrolidonil arilamidasi, leucina amminopeptidasi e DNasi. Non riducono il nitrato o producono pirazinamidasi¹⁵.

Erysipelothrix rhusiopathiae

E. rhusiopathiae è un bastoncino Gram positivo non sporulante, che su agar sangue produce una zona sottile di α -emolisi. E' anaerobia facoltativa, non mobile e catalasi negativa. Tutte le colonie sono chiare, circolari e molto piccole aumentando le dimensioni tendono ad assumere un'opacità blu pallida dopo ulteriore incubazione o per invecchiamento. Le specie *Erysipelothrix* possono essere distinte dalla specie *Lactobacillus* per la loro capacità di produrre H₂S in un becco di clarino di triple sugar iron agar²⁰.

Gardnerella vaginalis

La *Gardnerella vaginalis* è pleomorfa, a forma di bastoncino a Gram variabile. E' anaerobia facoltativa e non mobile. *G. vaginalis* non è sporigena, non è capsulata e ossidasi e catalasi negativa. Produce acido dal glucosio e da altri carboidrati, ma non gas. Idrolizza l'ippurato e non riduce i nitrati¹.

Specie *Lactobacillus*

Le specie *Lactobacillus* sono formate da lunghi bastoncini Gram positivi. Le colonie sono piccole e spesso α -emolitiche dopo 48 ore su agar sangue. Sono anaerobie facoltative, raramente mobili e catalasi negative¹.

Specie *Microbacterium*

Specie *Microbacterium* formano bastoncini piccoli, sottili di forma irregolare, Gram-positivi. Possono produrre un pigmento giallo o arancione. La temperatura di crescita ottimale è di 30°C. Le specie sono principalmente ossidative e il loro metabolismo è aerobico, ma alcune specie possono essere fermentative. Possono essere non mobili o mobili per presenza da 1 a 3 flagelli^{15,19}. Tutte le specie sono catalasi positive.

Specie *Mycobacterium*

Le specie *Mycobacterium* diverse da *Mycobacterium tuberculosis* (MOTT) possono essere isolate in coltura primaria per l'identificazione e/o prove di sensibilità entro 48 ore.

([B 40 - Investigation of Specimens for *Mycobacterium* species](#)). Inviare al Laboratorio di Riferimento.

Specie *Oerskovia*

Le specie *Oerskovia* sono Gram positive ramificate. Formano un micelio, un'ifa substrato ampiamente ramificata che si rompe per formare elementi coccoidi-bastoncellari mobili o non mobili a forma di coccobacilli. La maggior parte dei ceppi produce un pigmento giallo. Non formano ife aeree. Sono anaerobie facoltative, fermentative e catalasi positive¹⁵.

Specie *Propionibacterium*

Le specie *Propionibacterium* sono Gram positive a forma di bastoncini (cortee forme a Y"). I ceppi generalmente crescono meglio in condizioni anaerobiche, in particolare su

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

isolamento primario, producono piccole colonie dopo 48 ore. Le specie *Propionibacterium* sono anaerobie facoltative e non sono mobili. Sono catalasi positive tranne *Propionibacterium propionicum* (precedentemente noto come *Arachnia propionica*), che è catalasi negativa¹⁵

Specie *Rhodococcus*

Le specie *Rhodococcus* di solito assumono colorazione Gram positiva. Le cellule assumono forma di cocci o corti bastoncini che si sviluppano in lunghezza, e possono formare un micelio vegetativo ampiamente ramificato che si può frammentare. Di solito sono parzialmente acido-resistenti per presenza di acido micolico nella loro parete cellulare. Le colonie possono essere rugose, lisce o mucose e sono incolori, di color panna, beige, gialle, arancioni o rosse. L'incubazione a 30 °C può aumentare anche il loro riscontro²¹.

Sebbene altre prove biochimiche possono aiutare a differenziare *Rhodococcus* da altri microrganismi, questa possibilità nei confronti di altri actinomiceti aerobi può essere difficile. Le specie *Rhodococcus* tipicamente reagiscono positivamente alla catalasi, riduzione dei nitrati e alle prove di idrolisi dell'urea e negativamente all'ossidasi, idrolisi della gelatina, e alla riduzione dei carboidrati. Non sono mobili. La loro incapacità di fermentare carboidrati è importante per distinguerli dai corinebatteri.

Specie *Trueperella*^{13,22}

Attualmente sono note cinque specie classificate in modo certo nel genere *Trueperella*, e due di queste causano infezioni nell'uomo²³.

Le cellule sono Gram positive, non mobili, non formano spore nei coccobacilli e nei corti bastoncini che si presentano in modo isolato, a coppie (formazioni palizzata V, e T) o in raggruppamenti. Nei diversi terreni le dimensioni delle cellule variano per forma e dimensione (0,2-0,9 x 60,3-2.5µm). Le cellule di brodocolture di 24 ore sono Gram positive, ma si può osservare variabilità al Gram nelle colture più vecchie. Su agar sangue di pecora, dopo 24 ore d'incubazione, si sviluppano colonie a punta di spillo, β-emolitiche. Dopo 48-72 ore d'incubazione, le colonie sono 0.5-1.5 mm di diametro, convesse, circolari e traslucide con bordo continuo. Sono aerobie e anaerobie facoltative. I componenti sono strettamente fermentativi. L'acido lattico è il prodotto metabolico principale nel brodo estratto di lievito glucosio, mentre acetato e succinato sono prodotti di minor quantità.

La specie tipo è *Trueperella pyogenes*.

Pyogenes Trueperella (in precedenza *Arcanobacterium pyogenes*) è un bastoncino che può presentare ramificazioni. Le colonie su agar sangue producono zone di β-emolisi evidente dopo 48 ore d'incubazione. Queste appaiono convesse, bianche, lisce, traslucide e soffici con bordi continui.

T. pyogenes è anaerobia facoltativa, non mobile, e catalasi negativa, ma è stato segnalato un ceppo positivo. Il metabolismo è strettamente fermentativo²⁴. La differenziazione tra *T. pyogenes* e *A. haemolyticum* può risultare difficile, ma possono essere distinti tramite la fermentazione con i test dell'α-mannosio, pirazinamidasi e gelatina.

Questo microrganismo è frequentemente isolato da numerose manifestazioni di malattia piogeniche in molte specie animali e nell'uomo.

Trueperella bernardiae (in precedenza *Arcanobacterium bernardiae*) sono rappresentate da bastoncini con predominanza di coccobacilli. Non si osserva ramificazione primaria. *T. bernardiae* è anaerobio facoltativo, non mobile e catalasi negativo. Le colonie su agar sangue presentano emolisi variabile, aspetto circolare, lisce e leggermente convesse con aspetto vetroso dopo 48 ore d'incubazione. I diametri delle colonie variano da 0,2 a 0,5 millimetri dopo 48 ore d'incubazione²⁵.

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

Questo microrganismo è stato isolato dal sangue umano, da ascesso dell'orecchio o del torace²⁵.

Turicella otitidis

Il genere comprende una sola specie, *Turicella otitidis*. Al microscopio assomiglia a un corineiforme, ma ha cellule più lunghe. Può essere distinta da *C. afermentans* e *C. auris* per la morfologia delle colonie. Le colonie di *T. otitidis* sono convesse, di colore biancastro, cremose e non emolitiche rispetto a quelle piatte, grigio-bianco e non-emolitiche di *C. afermentans* e convesse, quelle asciutte, aderenti, delle colonie giallastre di *C. auris*. *T. otitidis* non è fermentante e si presenta sia isolata che come bastoncino Gram-negativo. Gli isolati manifestano un'intensa reazione CAMP e sono DNasi positivi e catalasi positivi.

Qualche sistema d'identificazione commerciale spesso può erroneamente riconoscere *T. Otitidis* come specie *Corynebacterium*^{15,19}.

Principi di Identificazione

Specie *Listeria*

Le colonie su agar sangue o agar selettivo per *Listeria* sono identificate per la loro morfologia, colorazione Gram, produzione di catalasi e motilità disordinata a 20-25 C, ma non presente a 35° C. Se è richiesta la conferma dell'identificazione, gli isolati devono essere inviati al Laboratorio di Riferimento. Tutte le prove d'identificazione dovrebbero in teoria essere eseguite su colonie sviluppate su agar non selettivo.

Altri Gram positivi non sporigeni

Le colonie su agar sangue sono identificate per la loro morfologia, colorazione Gram, produzione di catalasi e motilità. L'identificazione è confermata da successive prove biochimiche e/o con l'invio a un Laboratorio di Riferimento. Tutte le prove d'identificazione dovrebbero in teoria essere eseguite su agar non selettivo.

Informazioni Tecnica/Limitazioni

Differenziazione delle specie *Listeria* dagli streptococchi di Group B

Le colonie di specie *Listeria* assomigliano a quelle degli streptococchi di Gruppo B; il test della catalasi è rapido, di facile esecuzione e aiuta a differenziare le specie *Listeria* da quelle degli streptococchi di gruppo B. Le specie *Listeria* sono catalasi positive, mentre gli streptococchi di gruppo B sono catalasi negativi.

Test di motilità (consultare di seguito)

La motilità è uno dei numerosi parametri utilizzati per caratterizzare le *Listeria*. Questo dovrebbe essere utilizzato congiuntamente ad altri test. Questo test non deve essere utilizzato per l'isolamento primario di specie *Listeria* o scopi diversi dalla ricerca per la determinazione della mobilità.

Le specie *Listeria* sono mobili a 20-25°C, non mobili a 35°C e oltre. Pertanto, deve essere scelta per incubazione una temperatura adeguata per evitare falsi risultati negativi. Occasionalmente, sono stati riscontrati ceppi non mobili³.

1 Considerazioni sulla Sicurezza^{10-12,26-39}

Microrganismi di Gruppo di Rischio 2

Al personale in gravidanza dovrebbe essere vietato di lavorare con culture note o sospette di specie *Listeria*.

Fare riferimento alle linee guida sulla sicurezza nella manipolazione di tutti i microrganismi descritti in questa 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

Specie *Listeria* e altri bastoncini Gram positivi morfologicamente simili, segnalati per avere causato infezione umana^{15,40,41}

Listeria monocytogenes, specie *Arcanobacterium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Altre specie *Listeria* segnalate come causa occasionale o di singola infezione nell'uomo^{8,42-47}

Listeria ivanovii, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*

Altre specie morfologicamente simili alle specie note per aver causato infezione umana^{10-12,15}

Specie *Aureobacterium*, specie *Bifidobacterium*, specie *Brevibacterium*, specie *Cellulomonas*, *Dermabacter hominis*

Altri bastoncini Gram positivi che sono stati implicati in infezioni umane^{15,19,48}.

3 Identificazione

3.1 Aspetto Microscopico

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

Bastoncini Gram positivi. L'aspetto microscopico varia nelle diverse specie.

Specie *Listeria*

Bastoncini Gram positivi di circa 0.5 x 0.5 – 3µm con estremità arrotondate, isolati e talvolta in coppie che possono assomigliare a 'corineiformi' o a diplococchi. Non formano spore e ramificazioni e non sono dotati di capsula.

Specie *Arcanobacterium*

Sono cellule Gram positive con aspetto di bastoncino o coccoide; sono sottili, irregolari e prevalentemente a forma di bastoncino o disposti ad angolo per realizzare formazioni a V durante le prime 18 ore di crescita, nel tempo successivo diventando granulari e segmentati, simili a piccoli cocchi, irregolari.

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

Erysipelothrix rhusiopathiae

Le cellule sono bastoncini sottili, Gram positivi non-sporulanti, che formano corte catenelle a coppie, disposti a "V" oppure raggruppati in modo casuale. Questi microrganismi possono sembrare Gram negativi per la loro tendenza a decolorarsi rapidamente

Specie *Trueperella*

Le cellule sono coccobacilli e a forma di corti bastoncini isolati, a coppie (formazioni a V, T a palizzata) o raggruppati.

Specie *Aureobacterium*

Le cellule sono Gram positive a bastoncini corti irregolari.

Specie *Bifidobacterium*

Queste specie sono Gram positive, di aspetto variabile e possono essere ricurve, claviformi o a bastoncini ramificati od occasionalmente coccoidi. Le cellule si colorano in modo irregolare.

Specie *Brevibacterium*

Bastoncini Gram positivi che presentano un ciclo con evidente forma cocco bacillare. Nelle colture recenti, le cellule appaiono come bacilli ma, nelle colture vecchie, diventano coccoidi.

***Cellulomonas* species**

Sono cellule Gram positive a bastoncini irregolari sottili.

Dermabacter hominis

Sono bastoncini molto corti, Gram positivi, che possono erroneamente essere considerati cocci.

Per tutti i restanti bastoncini non sporigeni Gram positivi, consultare la sezione "Caratteristiche".

3.2 Terreni di Isolamento Primario

Agar sangue incubato in 5–10% CO₂ a 35°C–37°C per 16–48 ore

Agar *Listeria* selettivo incubato in O₂ a 35°C–37°C per 40–48 ore.

Note: Le specie *Listeria* sono in grado di crescere a 2°C - 43°C.

3.3 Aspetto delle Colonie

Questa tabella riassume i microrganismi e la loro morfologia su piastra di agar sangue.

Microrganismo	Caratteristiche di crescita su agar sangue dopo incubazione a 35-37°C per 16-48 ore
<i>L. monocytogenes</i>	Le colonie hanno diametro di 0.5-1.5mm, lisce, translucide con caratteristico aspetto di vetro smerigliato, in grado di essere emulsionate e con zona nebulosa di β-emolisi che si espande 1-2 mm dal margine della colonia.
Specie <i>Arcanobacterium</i>	Dopo 48 ore d'incubazione, le colonie producono zone di β-emolisi.
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Dopo 48 ore di incubazione, si manifestano due tipi di colonie: una piccola liscia, forma (S), 0.5-1mm di diametro, trasparente, convessa e circolare con

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

	marginale continuo La forma grande rugosa (R) è più piatta, con superficie opaca e bordo irregolare. La maggior parte dei ceppi presenta una zona ristretta di α -emolisi, ma le forme -R non producono emolisi.
<i>L. ivanovii</i>	Le colonie sono simili a quelle di <i>L. monocytogenes</i> ma sviluppano ampie zone di emolisi completa con zone esterne di emolisi parziale
<i>L. seeligeri</i>	Le colonie sono simili a quelle di <i>L. monocytogenes</i> ma sono prodotte zone di β -emolisi
<i>L. innocua</i>	Colonie di color crema, assenza di emolisi
<i>L. grayi</i>	Le colonie sono piccole, regolari, lisce con diametro da 1 a 2 mm di diametro dopo 1-2 giorni d'incubazione a 37°C.
Specie <i>Trueperella</i>	Colonie puntiformi, β -emolitiche su agar sangue dopo 24 ore d'incubazione e dopo 48–72 ore, le colonie hanno un diametro di 0.5–1.5 mm, convesse, circolari e traslucide con bordi continui. <i>T. pyogenes</i> produce sottili zone di β -emolisi dopo 48 ore d'incubazione. L'emolisi di <i>T. bernardiae</i> è variabile.
Specie <i>Aureobacterium</i>	Non-emolitiche, colonie pigmentate gialle.
Specie <i>Bifidobacterium</i>	Le colonie sono basse, grigio marrone, e ovoidali con centro opaco marrone bordi traslucidi crenati
Specie <i>Brevibacterium</i>	Le colonie sono opache, bianco grigiastre, diametro 2 mm o maggiore dopo 24 ore, convesse con superficie liscia e lucida. Non sono emolitiche e possono diventare giallo verde dopo 48 ore.
Specie <i>Cellulomonas</i>	Non-emolitiche, colonie pigmentate gialle o arancione.
<i>Dermabacter hominis</i>	Non-emolitiche, piccole grigie/bianche convesse con margine continuo.
Specie <i>Lactobacillus</i>	Le colonie sono piccole e spesso α -emolitiche su agar sangue dopo 48 ore.
Specie <i>Microbacterium</i>	Le Colonie sono rotonde, convesse con margine continuo, umide, lucenti e possono produrre un pigmento giallo o arancione.
Specie <i>Oerskovia</i>	La maggior parte dei ceppi produce pigmento giallo.
Specie <i>Propionibacterium</i>	Producono piccole colonie dopo 48 ore d'incubazione.
<i>Gardnerella vaginalis</i>	La crescita è aumentata aggiungendo 5-10% di CO ₂ Le colonie sono piccole, circolari, convesse e grigie. Produce anche β -emolisi diffusa su agar sangue di coniglio, ma non su agar sangue di montone. L'emolisi su agar sangue di cavallo è variabile.

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

Specie <i>Rhodococcus</i>	Le colonie possono essere ruvide, lisce o mucoidi e incolore, panna beige, gialle, arancione o rosse.
<i>Turicella otitidis</i>	Le colonie sono convesse, biancastre, cremose e in apparenza non emolitiche.

Altre specie *Listeria* mostrano aspetto della colonia simile e sono o emolitiche e non emolitiche: queste specie sono molto raramente isolate da sedi normalmente sterili e devono essere inviate al Laboratorio di Riferimento per l'identificazione.

Per tutti gli altri bastoncini Gram positivi non sporulanti^{15,19}

L'aspetto varia su agar sangue con le specie, dopo incubazione aerobica a 35-37°C per 16-48 ore. Consultare la tabella precedente.

3.4 Procedure di Prova

Test della Catalasi ([TP 8 - Catalase Test](#))

Le specie *Listeria* sono catalasi positive.

Le specie *Arcanobacterium* sono catalasi positive.

Erysipelothrix rhusiopathiae è catalasi negativa.

Per gli altri bastoncini non sporulanti consultare il diagramma di flusso della sezione 4.

Test di Motilità ([TP 21 - Motility Test](#))

Questo è eseguito a 20°C - 25°C per le specie *Listeria* e a circa 30°C per tutti gli altri microrganismi.

Tutte le specie *Listeria* presentano motilità disordinata a 20°C - 25°C ma non a temperatura superiore a 30°C. Gli altri microrganismi possono essere mobili, ma non presentano questo tipo di movimento

Identificazione con sistemi commerciali⁴⁹

I laboratori devono seguire le istruzioni del produttore. I test rapidi e le confezioni commerciali devono essere validate e dimostrare prima dell'uso di essere idonee allo scopo.

3.5 Identificazione Successiva

Dopo il rilievo della morfologia delle colonie, test della catalasi, test di motilità e risultati di identificazione biochimica, se è richiesta un'ulteriore identificazione, inviare l'isolato al Laboratorio di Riferimento.

Metodi Molecolari Rapidi

Per gli isolati da campioni clinici sono stati sviluppati un gran numero di metodi rapidi sensibili; questi includono tecniche molecolari come Polymerase Chain reaction (PCR), Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), e Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF). Tutti questi approcci permettono di sottotipizzare i ceppi non correlati, ma ciò è ottenuto con diversa accuratezza, capacità discriminante e riproducibilità.

Comunque, alcuni di questi metodi sono accessibili solo ai laboratori di riferimento e sono difficili da implementare nell'identificazione batterica di routine di un laboratorio clinico.

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF)

Questo strumento ha dimostrato di essere rapido ed efficace per la propria riproducibilità, velocità e sensibilità analitica⁵⁰. Il vantaggio del MALDI-TOF rispetto ad altri metodi d'identificazione è che i risultati delle analisi sono disponibili entro poche ore anziché diversi giorni. La rapidità e la semplicità di preparazione del campione e l'acquisizione del risultato, associato ai ridotti costi dei materiali di consumo, rendono questo metodo adatto per l'uso di routine per la sua alta produttività.

MALDI-TOF è stato sviluppato e validato per determinare le specie e le caratteristiche delle specie *Listeria* utilizzando isolati da numerose fonti.

È stato reso noto per essere stato utilizzato per identificare *T. bernardiae* e pertanto aiuterà in futuro nell'identificazione e a chiarire il ruolo che questa specie, raramente isolata, svolge nell'infezione umana⁵¹.

Real-time Polymerase Chain reaction (RT-PCR)

La PCR è generalmente considerata un buon metodo perché è semplice, sensibile e specifica. La base per le applicazioni diagnostiche della PCR in microbiologia è la rivelazione di agenti infettivi e la discriminazione dei ceppi non patogeni da quelli patogeni in funzione dei geni specifici.

Questa si è ormai affermata come tecnica rapida, affidabile e riproducibile per l'identificazione delle specie *Listeria* e, soprattutto, per la differenziazione di *L. monocytogenes* dalle altre specie utilizzando primer che riconoscono geni codificanti fattori di virulenza o subunità genetiche di RNA⁵².

Il saggio PCR Multiplex, basato sulla sierotipizzazione, quale l'uso di primer PCR specifici per gruppi, ha ugualmente fornito ulteriori strumenti d'identificazione e raggruppamento di *L. monocytogenes*⁵³.

Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

La Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism è una metodologia ad alta risoluzione per il genoma completo, utilizzata come strumento per l'analisi rapida ed efficiente della diversità genetica all'interno dei genomi batterici. È utile per una vasta gamma di applicazioni quali l'identificazione e la sierotipizzazione dei microrganismi da campioni clinici, per l'identificazione di genotipi da focolai epidemici, per studi di micro e macro-variazione, e per la genetica delle popolazioni. È stata usata con successo per lo studio di *L. monocytogenes*⁵⁴⁻⁵⁶.

La FAFLP ha numerosi vantaggi rispetto ad altre tecniche di fingerprinting del DNA perché valuta l'intero genoma per le sequenze sia conservate e di quelle in rapida evoluzione in un modo relativamente sicuro. Il numero di frammenti ottenuti a fini comparativi tra isolati è significativamente maggiore rispetto all'elettroforesi in campo pulsato (PFGE), risultando così più discriminante rispetto alla PFGE; i risultati della FAFLP sono molto riproducibili grazie ai rigidi parametri ciclici della PCR.

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La PFGE rileva variazione genetica tra ceppi ottenuti con poche endonucleasi di restrizione, seguita dalla separazione, su un gel di agarosio, dei risultanti grandi frammenti genomici. La PFGE è nota per essere molto discriminante ed è una tecnica utilizzata frequentemente per le indagini sui focolai epidemici raggiungendo ampia applicazione nella caratterizzazione degli isolati epidemiologicamente correlati. Tuttavia, la stabilità della PFGE può essere insufficiente

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

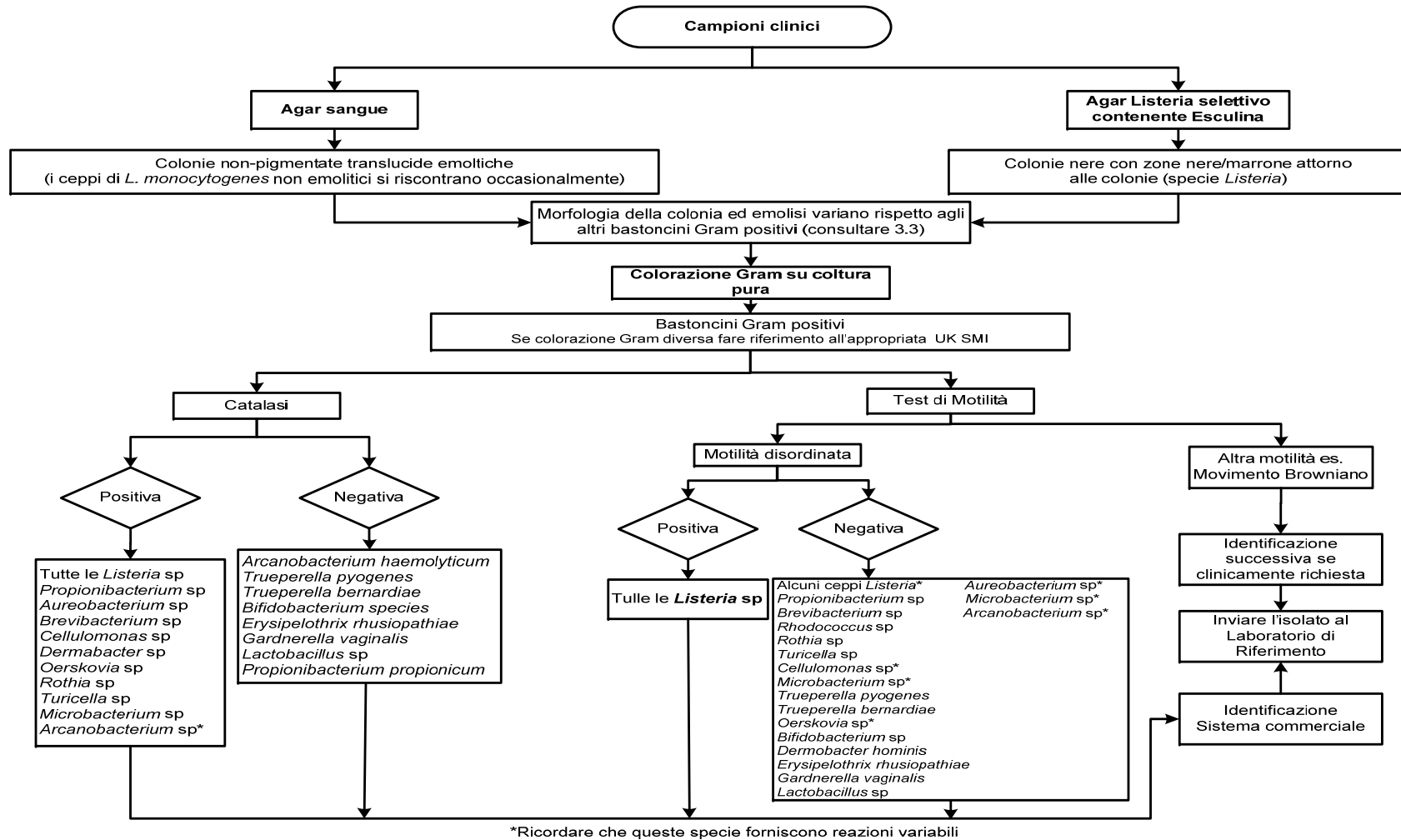
per un'applicazione affidabile in studi epidemiologici a lungo termine. Tuttavia, in funzione delle sue caratteristiche, richiede tempo (30 ore o più) e pure attrezzature speciali; non è molto utilizzata se non nei laboratori di riferimento^{55,57}.

Si tratta di un metodo di tipizzazione molecolare molto riproducibile, discriminante ed efficace per identificare e classificare *L. monocytogenes* in sottotipi ed è considerata lo standard di riferimento.

3.6 Conservazione e Invio

Per l'invio al Laboratorio di Riferimento salvare un isolato puro su becco di clarino di agar sangue o agar nutriente.

4 Identificazione di specie *Listeria* e altri Bastoncini Gram Positivi Non-Sporulanti (eccetto *Corynebacterium*)



Questo diagramma è a scopo solo indicativo

5 Refertazione

5.1 Identificazione Presunta

Se sono appropriate le caratteristiche di crescita, aspetto delle colonie, colorazione Gram della coltura e sono dimostrati i risultati della catalasi.

5.2 Conferma dell'Identificazione

La conferma dell'identificazione e tossigenicità dei batteri non sporigeni Gram positivi sono fornite solo dalla Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections Reference Unit (AMRHAI), mentre la conferma dell'identificazione per isolati di *L. monocytogenes* e specie *Listeria* sono eseguite dal Foodborne Pathogens Reference Services presso il Gastrointestinal Bacteria Reference Unit, Colindale.

5.3 Medico Microbiologo

L'infezione è più frequentemente acquisita con il consumo di alimenti contaminati (compresi quelli serviti in ospedale), sebbene siano state ben documentate infezioni crociate in strutture dedicate al parto⁴⁰. L'isolamento del battere è più frequente dal sangue o dal liquor. Informare il medico microbiologo di tutti i casi presunti e confermati di *Listeria monocytogenes* e di altre specie *Listeria* isolate da sedi sterili, quando il modulo di richiesta contiene informazioni rilevanti quali:

- Il paziente ha > 60 anni, immunocompromesso, in stato di gravidanza, o neonato
- Sospetto di setticemia, meningite e/o meningo-encefalite in persona dedita ad alcolismo, abuso di sostanze, o immunocompromesso. Inoltre, persone con altri gravi malattie soggiacenti, quali cancro, o pazienti che ricevono trattamenti che inducono neutropenia e/o mucosite.
- Indagine per epidemie

Informare il medico microbiologo di sospetti e casi confermati di Gram positivi non sporigeni quando il modulo di richiesta fornisce informazioni rilevanti, quali ad esempio:

- Casi sospetti di endocardite
- Infezione dei dispositivi a permanenza medici (protesi valvolari, pacemaker, cateteri peritoneali e vascolari, shunt del SNC)
- Anamnesi positiva per abuso di sostanze, alcolismo, immunodeficienza o altre gravi malattie di base come il cancro, o pazienti che ricevono un trattamento che induce neutropenia e/o mucosite

Seguire i protocolli locali per la refertazione al clinico.

5.4 CCDC

Fare riferimento al Memorandum locale di Informazione.

5.5 Public Health England²⁷

Fare riferimento alle linee guida attuali della CIDSC e alle indicazioni del COSURV.

5.6 Prevenzione dell'Infezione e Gruppo di Controllo

Informare il gruppo di controllo delle infezioni di tutti gli isolatiti presunti o confermati di *L.*

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

monocytogenes secondo i protocolli locali.

6 Invio

6.1 Laboratorio di Riferimento

Contattare l'appropriato Laboratorio di Riferimento nazionale specializzato per informazioni sulle prove disponibili, tempi di consegna, procedure di trasporto ed eventuali altri requisiti per l'invio del campione:

Isolati di sospetta *Listeria* per conferma:

Food Pathogen Reference Services
Microbiology Services
Public Health England
61 Colindale Avenue
London
NW9 5EQ

Bastoncini Gram positivi per successive tipizzazione:

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

<http://www.hpa.org.uk/cfi/lhcai/default.htm>

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 alla PHE^{58,59} o Equivalente⁶⁰⁻⁶³

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 HCAs e Creutzfeldt–Jakob disease CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non al 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories'.

<http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/HealthProtectionRegulations/>

sistono accordi diversi in [Scotland](#)^{60,61}, [Wales](#)⁶² e [Northern Ireland](#)⁶³.

Bibliografia

1. Holt JG. Regular, nonsporing gram-positive rods. Genus *Listeria*. In: Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST, editors. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994. p. 565-70.
2. Euzéby,JP. Genus *Listeria*.
3. Mitchell RG. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, editors. *Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology*. 14th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996. p. 309-15.
4. Seeliger HPR, Rocourt J, Schrettenbrunner A, Grimont PA, Jones D. *Listeria ivanovii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1984;34:336-7.
5. Boerlin P, Rocourt J, Grimont F, Grimont PA, Jacquet C, Piffaretti JC. *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1992;42:69-73.
6. Rocourt J, Grimont PA. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1983;33:866-9.
7. Pine L, Malcolm GB, Brooks JB, Daneshvar MI. Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can J Microbiol* 1989;35:245-54.
8. Perrin M, Bemer M, Delamare C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *J Clin Microbiol* 2003;41:5308-9.
9. Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, Jacquet C, Piffaretti JC. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:171-4.
10. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
11. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
12. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
13. Yassin AF, Hupfer H, Siering C, Schumann P. Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend. Lehnert et al. 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61:1265-74.
14. Euzéby,JP. Genus *Arcanobacterium*.
15. Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE, III, Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:125-59.
16. Nolte FS, Arnold KE, Sweat H, Winton EF, Funke G. Vancomycin-resistant *Aureobacterium* species cellulitis and bacteremia in a patient with acute myelogenous leukemia. *J Clin Microbiol* 1996;34:1992-4.
17. Funke G, von GA, Weiss N. Primary identification of *Aureobacterium* spp. isolated from clinical specimens as "*Corynebacterium aquaticum*". *J Clin Microbiol* 1994;32:2686-91.

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

18. Gruner E, Pfyffer GE, von GA. Characterization of *Brevibacterium* spp. from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1993;31:1408-12.
19. Janda WM. *Corynebacterium* species and the Coryneform bacteria part II: current status of the cdc coryneform groups. *Clin Microbiol Newslett* 1998;20:53-66.
20. Brooke CJ, Riley TV. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J Med Microbiol* 1999;48:789-99.
21. Conlin M, Willingham K, Oliver J. *Rhodococcus* Bacteremia in an Immunocompetent Patient. *Laboratory Medicine* 2000;31:263-5.
22. Ramos CP, Foster G, Collins MD. Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:46-53.
23. Euzéby,JP. Genus *Trueperella*.
24. Reddy CA, Cornell CP, Fraga AM. Transfer of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) Ebersson to the Genus *Actinomyces* as *Actinomyces pyogenes* (Glage) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1982;32:419-29.
25. Funke G, Ramos CP, Fernandez-Garayzabal JF, Weiss N, Collins MD. Description of human-derived Centers for Disease Control coryneform group 2 bacteria as *Actinomyces bernardiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:57-60.
26. 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".
27. 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.
28. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
29. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
30. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
31. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
32. 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.
33. 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.
34. 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.

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

35. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
36. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
37. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
38. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
39. 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
40. McLauchlin J. The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective. Rev Med Microbiol 1997;8:1-14.
41. Al-Tawfiq JA. *Listeria monocytogenes* bacteremia in a twin pregnancy with differential outcome: fetus papyraceus and a full-term delivery. J Microbiol Immunol Infect 2008;41:433-6.
42. Rocourt J, Hof H, Schrettenbrunner A, Malinverni R, Bille J. [Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult]. Schweiz Med Wochenschr 1986;116:248-51.
43. Lessing MP, Curtis GD, Bowler IC. *Listeria ivanovii* infection. J Infect 1994;29:230-1.
44. Cummins AJ, Fielding AK, McLauchlin J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. J Infect 1994;28:89-91.
45. Rocourt J, Schrettenbrunner A, Hof H, Espaze EP. [New species of the genus *Listeria*: *Listeria seeligeri*]. Pathol Biol (Paris) 1987;35:1075-80.
46. Todeschini G, Friso S, Lombardi S, Casaril M, Fontana R, Corrocher R. A case of *Listeria murray/grayi* bacteremia in a patient with advanced Hodgkin's disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;17:808-10.
47. Rapose A, Lick SD, Ismail N. *Listeria grayi* bacteremia in a heart transplant recipient. Transpl Infect Dis 2008;10:434-6.
48. Brook I, Frazier EH. Significant recovery of nonsporulating anaerobic rods from clinical specimens. Clin Infect Dis 1993;16:476-80.
49. McLauchlin J. The identification of *Listeria* species. Int J Food Microbiol 1997;38:77-81.
50. 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.
51. Hijazin M, Alber J, Lammler C, Weitzel T, Hassan AA, Timke M, et al. Identification of *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *bernardiae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis and by species-specific PCR. J Med Microbiol 2012;61:457-9.
52. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiol Rev 2005;29:851-75.
53. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. J Clin Microbiol 2004;42:3819-22.

Identificazione di specie *Listeria*, e di altri Bastoncini Gram Positivi (tranne *Corynebacterium*)

54. Guerra MM, Bernardo F, McLauchlin J. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analysis of *Listeria monocytogenes*. *Systematic and Applied Microbiology* 2002;25:456-61.
55. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* 2006;55:645-59.
56. Fonnesbech VB, Fussing V, Ojeniyi B, Gram L, Ahrens P. High-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* by fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis compared to pulsed-field gel electrophoresis, random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping, and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Food Prot* 2004;67:1656-65.
57. 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.
58. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.
59. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
60. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
61. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
62. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
63. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).