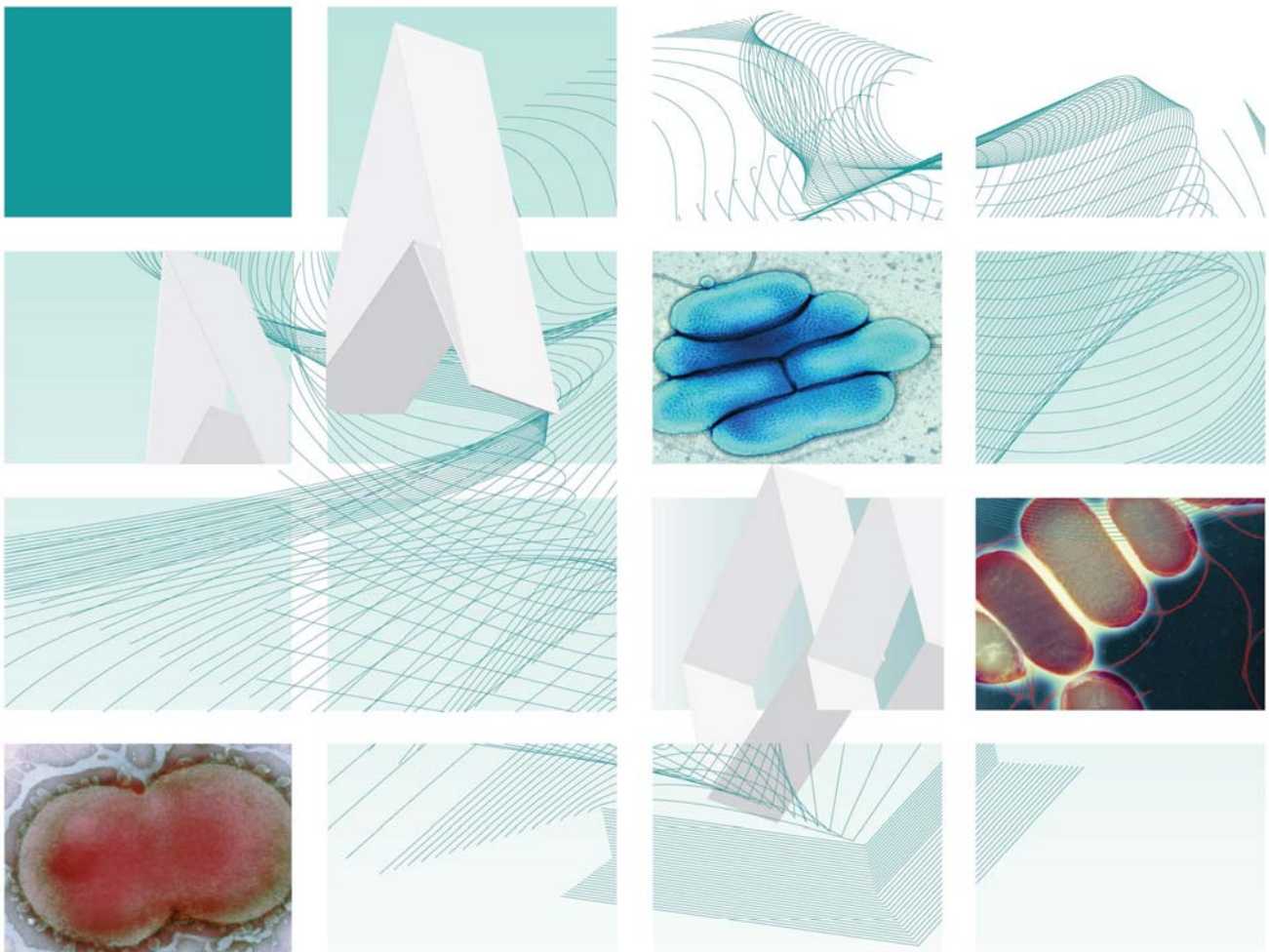




Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Identificazione di specie *Staphylococcus*, specie *Micrococcus*, e specie *Rothia*



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

Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <https://www.gov.uk/government/groups/standards-for-microbiology-investigations-steering-committee>)

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

Per ulteriori informazioni contattare:

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

Website: <https://www.gov.uk/government/groups/standards-for-microbiology-investigations-steering-committee>

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



I loghi sono aggiornati al momento della pubblicazione

Contenuti

RINGRAZIAMENTI.....	2
TABELLA MODIFICHE	4
RICERCHE MICROBIOLOGICHE STANDARD DEL REGNO UNITO: SCOPO E OBIETTIVO.....	6
SCOPO DEL DOCUMENTO	9
INTRODUZIONE.....	9
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI.....	15
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA	17
2 MICRORGANISMO BERSAGLIO	17
3 IDENTIFICAZIONE	18
4 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> , SPECIE <i>MICROCOCCUS</i> E SPECIE <i>ROTHIA</i>	23
5 REFERTAZIONE	24
6 INVII	25
6 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE.....	25
BIBLIOGRAFIA.....	27



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 E-mail: standards@phe.gov.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.	5/12.11.14
Emissione eliminata. no	2.3
Emissione inserita no.	3
Sezione(i) interessate/Pagina no.	Modifica.
Documento intero .	Collegamenti ipertestuali aggiornati al gov.uk.
Pagina 2	Loghi aggiunti aggiornati
Documento intero	Documento presentato in nuovo formato.
Scopo del documento	Scopo del documento è stato aggiornato per includere collegamenti ai documenti web B 29 e ID 4.
Introduzione.	<p>Aggiornata la tassonomia di specie <i>Staphylococcus</i>, <i>Micrococcus</i> e <i>Rothia</i>.</p> <p>Aggiunte maggiori informazioni alla sezione Caratteristiche. Sono menzionate e descritte le specie clinicamente importanti e le loro caratteristiche.</p> <p>Bibliografia aggiornata.</p> <p>Aggiornata la Sezione sui Principi d'identificazione in modo da comprendere i metodi rapidi utilizzati .</p>
Informazione Tecnica/Limitazioni	Aggiunta di informazioni per quanto riguarda i terreni con agar, test della coagulasi e descritti e circostanziati i frequenti problemi di <i>S. aureus</i> .
Microrganismi bersaglio	Aggiornata la sezione sui microrganismi bersaglio e presentata in modo chiaro. Aggiornata la bibliografia.
Identificazione	<p>Modifiche minori sono stati apportate per 3.1 e 3.2.</p> <p>3.3 e 3.4 sono state aggiornate per riflettere standard nella pratica.</p> <p>Sottosezione 3.5 aggiornata per includere i metodi molecolari rapidi.</p>

Identificazione di specie *Staphylococcus*, specie *Micrococcus*, e specie *Rothia*

Diagramma di Flusso per identificazione	La modifica del diagramma di flusso per l'identificazione delle specie è stata eseguita per facilitare l'orientamento.
Refertazione	Le Sottosezioni 5,1-5,4 sono state aggiornate per riflettere la procedura di refertazione.
Invio	Aggiornato l'indirizzo del laboratorio di riferimento
Bibliografia	Bibliografia In parte 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.
- Le SMI forniscono gli standard per le ricerche microbiologiche anche ai responsabili della sanità pubblica che devono considerarle come parte delle procedure da adottare per la salute (sia clinica che pubblica) per la propria popolazione.

Informazioni di Base per le SMI

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

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

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

Collaborazione Paritaria

La preparazione e stesura delle SMI è effettuata mediante collaborazione paritaria fra PHE, NHS, Royal College of Pathologists e le organizzazioni professionali.

L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>.

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

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

[#] 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.

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 soggetto agli obiettivi PHE di Uguaglianza

<https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/equality-and-diversity> |

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

Dichiarazione Legale

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

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

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

Citazione Suggesta per questo Documento

Public Health England. (2014). Identification of *Staphylococcus* species, *Micrococcus* species and *Rothia* species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 7 Emissione 3.

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

1. Scopo del Documento

Questa SMI descrive la procedura per l'identificazione di specie *Staphylococcus*, specie *Micrococcus* e specie *Rothia*. Informazioni su MRSA sono riportate in [B 29 - Investigation of Specimens for Screening MRSA](#).

Per l'identificazione di cocchi catalasi negativi Gram positivi consultare [ID 4 - Identification of Streptococcus species, Enterococcus species and Morphologically Similar Organisms](#)

Questa SMI deve essere usata congiuntamente alle altre SMI.

2. Introduzione

Tassonomia

Secondo la Tassonomia, il genere *Staphylococcus* appartiene alla famiglia batterica delle Staphylococcaceae, che comprende cinque generi meno noti, *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus* e *Salinicoccus*. Ora sono note 47 specie riconosciute di stafilococchi e 21 sottospecie, la maggior parte delle quali si riscontrano solo nei mammiferi inferiori¹. Gli stafilococchi associati più frequentemente a infezione umana sono *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. Anche altre specie *Staphylococcus* possono essere associate a infezione umana².

Il genere comprende *Micrococcus* appartiene alla famiglia delle Micrococcaceae che ora comprende 16 specie. Queste sono state isolate dalla cute umana, animale e da prodotti lattiero-caseari, nonché dall'ambiente (acqua, polvere e suolo)³. Alcune di queste specie sono state riclassificate in altri generi. Alcuni membri già appartenenti al genere *Micrococcus*, sono stati ora assegnati ad altri generi; questi sono *Arthrobacter agilis*, *Nesterenkonia halobia*, *Kocuria kristinae*, *K. rosea*, *K. varians*, *Kytococcus sedentarius*, e *Dermacoccus nishinomiyaensis*. Le specie *Micrococcus* associate alle infezioni sono *Micrococcus luteus* e *Micrococcus lylae*.

Il genere *Rothia* apparteneva alla famiglia batterica Actinomycetaceae come descritto da Georg e Brown nel 1967, ma più recenti studi molecolari hanno classificato il genere nella famiglia delle Micrococcaceae, sottordine Micrococcineae, ordine Actinomycetales, sottoclasse Actinobacteridae e classe Actinobacteria. E' quindi nella stessa famiglia, come i generi *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Nesterenkonia*, *Renibacterium* e *Stomatococcus*, i quali sono dotati di caratteristici nucleotidi che caratterizzano le loro sequenze 16S rDNA⁴. Ora sono note 6 specie, *Rothia dentocariosa* e *Rothia mucilaginoso* sono le uniche due che sono state riconosciute causa d'infezioni nell'uomo⁵.

Caratteristiche

Le specie *Staphylococcus* sono Gram positive, non mobili, cocchi non sporulanti di dimensioni diverse che si riscontrano come cellule isolate, a coppie o in grappoli irregolari. Le colonie sono di aspetto opaco, di colore bianco o crema e occasionalmente giallo o arancio. La temperatura ottimale di crescita è a 30 - 37°C. Sono anaerobi facoltativi con metabolismo fermentativo. Le specie *Staphylococcus* sono di solito catalasi positive e ossidasi negative con l'eccezione del gruppo *S. sciuri* (*S. sciuri*, *S. lentus* e *S. vitulinus*), *S. fleuretti* e del gruppo *Macrococcus* a cui è stato assegnato *S. caseolyticus*^{2,6,7}. Questo è anche un carattere distintivo dal genere dagli streptococchi, che sono catalasi negativi e hanno una diversa composizione della parete cellulare

rispetto agli stafilococchi. Spesso i nitrati sono ridotti a nitriti. Alcune specie sono sensibili a lisi da lisostafina, ma non da lisozima, e sono in grado di crescere in 6,5% di cloruro di sodio. Alcune specie producono tossine extracellulari. Gli stafilococchi possono essere identificati per la produzione di deossiribonucleasi (DNAsi) e/o da quella della DNAsi termostabile (nucleasi termostabile)⁸.

Stafilococchi coagulasi positivi

Staphylococcus aureus

S. aureus sono cocci che formano grappoli di aspetto irregolare. Non sono mobili, non sporigeni e catalasi positivi. Crescono rapidamente e in modo abbondante in condizioni aerobiche. Su agar sangue appaiono come colonie scintillanti, lisce, con bordo continuo, rilevate traslucide che spesso formano un pigmento di colore oro. Il diametro delle colonie è di 2-3mm dopo 24 ore di incubazione e la maggior parte dei ceppi mostra β -emolisi che circonda le colonie.

Ora sono note 2 sottospecie di *S. aureus*; queste sono *S. aureus* sottospecie *aureus* e *S. aureus* sottospecie *anaerobius*.

S. aureus* sottospecie *aureus è frequentemente isolato da campioni clinici umani. Tutti i ceppi sono in grado di crescere su agar tioglicolato in meno di 24 ore. La maggior parte dei ceppi produce una vasta zona di forte emolisi entro 24 a 36 ore. Utilizzano D-glucosio, D-fruttosio, D-mannosio, D-maltosio, D-lattosio, D-trealosio, D-mannitolo, saccarosio, N-acetil-glucosamina, D-celiobiose, e D-turanosio, nessuna produzione di acido è stata dimostrata dall'utilizzazione di D-ribosio, xilitolo, xilosio, D-melibiosio, raffiniosio, L-arabinosio, e α -metil-D-glucoside. Sono positivi anche per le reazioni catalasi, coagulasi, e benzidina e sono in grado di ridurre i nitrati e produrre acetilmetilcarbinolo (acetoina). Sono positivi i risultati per DNAsi, clumping factor, ureasi, arginina diidrolasi, pirolidonil arilamidasi, leucina arilamidasi, β -N-acetilglucosaminidasi, α -chimotripsina, α -glucosidasi, β -glucosidasi, fosfatasi alcalina, esterasi C-4 e C-8, lipasi (C-14), fosfatasi acida, e naftol- AS-BI-fosfoidrolasi.

Non producono ossidasi, α -galattosidasi, glucuronidasi β -glucuronidasi, β -galattosidasi, valina arilamidasi, cistina arilamidasi, arginina arilamidasi, tripsina, ornitina decarbossilasi, α -mannosidasi, e α -fucosidasi. Tutti i ceppi sono resistenti alla novobiocina⁹.

S. aureus* sottospecie *anaerobius raramente è isolato da campioni clinici. Sono 0,8 - 1.0 μ m di diametro e si presentano singolarmente, a coppie, e prevalentemente in grappoli irregolari. Sul terreno di isolamento primario, la crescita si ottiene solo in terreni che sono arricchiti con sangue, siero, o tuorlo d'uovo e incubati in microaerofilia o in anaerobiosi. Le colonie su agar sangue dopo 2 giorni di incubazione sono molto piccole (da 1 a 3 millimetri di diametro), basse convesse, circolari, margine continuo, lisce, scintillanti, e opache. Non producono pigmento. Si ottiene una crescita rigogliosa su terreno all'uovo di Dorset, con diametri delle colonie di 4 a 6 mm. I ceppi producono con crescita diffusa in modo non uniforme su agar infuso cuore cervello dopo 3 giorni di incubazione in microaerofilia. Le colonie crescono piccole (nane) e tra queste se ne osservano alcune di dimensioni normali¹⁰.

Si sviluppa poco in aerobiosi e la crescita può dipendere dalla CO₂. Su vetrino è coagulasi e termonucleasi negativo e può essere catalasi negativo. I ceppi possono essere identificati da una migliore crescita in anaerobiosi e possono dare un risultato positivo alla coagulasi. Tuttavia, poiché la crescita può essere ridotta, il risultato della coagulasi può essere negativo e i ceppi sospetti dovrebbero essere inviati al Laboratorio di Riferimento.

Staphylococcus aureus può essere associato a infezione grave ed è importante distinguerlo dagli stafilococchi opportunisti coagulasi negativi. Nella routine di laboratorio, la produzione di coagulasi è spesso utilizzata come unico criterio per differenziare *S. aureus* dagli altri stafilococchi. E' anche importante notare che sono stati segnalati ceppi di *S. aureus* coagulasi negativi¹¹.

Altre specie di stafilococco coagulasi positivi, quali *S. hyicus*, *S. schleiferi* sottospecie *coagulans*, *S. pseudointermedius* o *S. intermedius* possono essere coagulasi positivi, ma sono stati isolati solo occasionalmente associati a infezione umana o nel portatore^{12,13}. La produzione di coagulasi e nucleasi termostabile da parte di questi stafilococchi può portare a errori d'identificazione come *S. aureus*. *Staphylococcus delphini* è coagulasi e termonucleasi positivo (raramente isolato nell'uomo).

Dai materiali clinici possono essere recuperati ceppi di *S. aureus* anidride carbonica dipendenti¹⁴. La particolarità di questi ceppi risiede nel fatto che in laboratorio rappresentano un problema tecnico significativo durante l'esecuzione di test di sensibilità agli antibiotici perché non si sviluppano in aerobiosi. Pertanto il test di sensibilità deve essere eseguito in atmosfera arricchita di CO₂. Questi in passato erano anche denominati ceppi nani e non dovevano essere confusi con le piccole colonie varianti a crescita lenta (SCV, small colony variants) di *S. aureus* che sono dotate di metabolismo ridotto e di un sistema difettoso di trasporto degli elettroni e sono anche auxotrofe per substrati come emina, menadione, tiamina o timidina¹⁵. Tali ceppi sono resistenti alla meticillina, dotati di resistenza intrinseca agli antibiotici aminoglicosidici come la gentamicina e sono più frequentemente identificati nei pazienti con infezioni croniche o persistenti¹⁶.

La multiresistenza agli antibiotici è stata spesso associata a ceppi meticillino resistenti¹⁶.

Staphylococcus aureus produce fattori di virulenza, come la proteina A, polisaccaridi capsulari e α - tossina. Alcuni ceppi di *S. aureus* producono la sindrome da shock tossico da tossina 1 (TSST-1), Panton-Valentine Leucocidin o altre tossine.

Stafilococchi coagulasi negativi (CoNS)¹⁷

Gli Stafilococchi coagulasi negativi (CoNS) sono normali commensali della cute, narici anteriori, e condotti uditivi degli esseri umani. Sono stati a lungo considerati non patogeni, e sono stati segnalati raramente come causa di gravi infezioni. Tuttavia, a causa del maggiore utilizzo dei dispositivi intravascolari e dell'aumento del numero di pazienti immunocompromessi ospedalizzati, i CoNS sono emersi come una delle principali cause di infezioni nosocomiali del sistema circolatorio.

Sono patogeni opportunisti sprovvisti di molti dei fattori di virulenza associati a *S. aureus*. Sono note più di 30 specie di CoNS. La tassonomia di questi stafilococchi coagulasi negativi (CoNS) definisce raggruppamenti avvalendosi delle sequenze dei 16s rRNA¹⁸.

S. epidermidis e *S. saprophyticus* sono le specie più spesso associate all'infezione, ma sono stati implicati anche *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus schleiferi* sottospecie *schleiferi*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus saccharolyticus* (in precedenza conosciuto come *Peptococcus saccharolyticus*) e *Staphylococcus warneri*^{19,20}. Molte di queste specie sono anche nucleasi termostabili e negative. *S. lugdunensis* è coagulasi negativo, ma alcuni ceppi possono essere positivi per il test della coagulasi su vetrino o del clumping factor²¹.

La multiresistenza agli antibiotici si verifica anche in alcuni ceppi di *S. epidermidis* che sono nucleasi termostabile negative. *S. saprophyticus*, *S. cohnii* e gruppi *S. sciuri* sono generalmente novobiocina resistenti come *S. hominis* subsp. *novobioceticus*²². *Staphylococcus pasteurii* può essere fenotipicamente distinto da tutti gli altri stafilococchi novobiocina-sensibili tranne *S. warneri*, dal quale può essere differenziato solo con genotizzazione²³.

Staphylococcus epidermidis

Gli *S. epidermidis* hanno un diametro di circa 0,5 a 1.5µm e sono disposti in agglomerati simili a grappoli. Sono anaerobi facoltativi che possono crescere con respirazione aerobica o di tipo fermentativo. Alcuni ceppi possono non essere fermentanti.

Formano colonie grigio-bianco, rilevate, circolari, lisce, scintillanti, e traslucide leggermente opache, aderenti, di circa 1-2mm di diametro dopo incubazione notturna e non sono emolitici su agar sangue. Crescono bene con concentrazioni di NaCl fino al 7,5%, poco al 10% e non riescono a crescere a concentrazioni del 15%. Sono positivi per catalasi, ureasi e presentano una debole reazione positiva per il test di riduzione dei nitrati. Sono negativi per coagulasi, ossidasi e idrolisi della gelatina. Utilizzano glucosio, fruttosio, saccarosio, lattosio per formare prodotti acidi in condizione aerobica. In presenza di lattosio producono gas.

Sono sensibili o debolmente resistenti alla lisostafina e sono resistenti al lisozima.

S. epidermidis è sensibile alla novobiocina, e questo test lo distingue da *Staphylococcus saprophyticus*, pure coagulasi negativo, ma resistente alla novobiocina²⁴

Staphylococcus saprophyticus

Sono catalasi e ureasi positivi e negativi per i test di motilità, coagulasi, riduzione dei nitrati e ossidasi. Utilizzano fruttosio, maltosio, saccarosio e trealosio per formare prodotti acidi. Crescono bene in agar 10% NaCl, ma solo 11-89% dei ceppi tollera il 15% NaCl. Le colonie appaiono rilevate e leggermente convesse, circolari, di solito con margine continuo, di diametro di 4,0 a 9,0 mm., lisce, scintillanti, e di solito opache. La produzione di pigmento della colonia è variabile; tuttavia, la maggior parte dei ceppi non sono pigmentati o possono avere una leggera colorazione gialla, che aumenta di intensità con l'invecchiamento.

Esistono due sottospecie di *S. saprophyticus*: *S. saprophyticus* subsp. *bovis* e *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, quest'ultimo è più comunemente isolato nelle IVU umane. Subsp. *S. saprophyticus. saprophyticus* si differenzia per la mancata riduzione dei nitrati e per essere pirrolidonil arilamidasi negativo, mentre *S. saprophyticus* subsp. *Bovis* riduce i nitrati ed è pirrolidonil arilamidasi positivo²⁵.

S. saprophyticus è resistente all'antibiotico novobiocina, una caratteristica usata in laboratorio per distinguerlo da *S. epidermidis*, che è anche coagulasi negativo ma sensibile alla novobiocina²².

Specie *Micrococcus*

Le specie *Micrococcus* sono costituite da cocci Gram-positivi strettamente aerobi, disposti in tetradi o in raggruppamenti irregolari, non in catene; le cellule sono di 0,5 a 3µm di diametro. Sono raramente mobili e non sono sporigeni. Sono anche catalasi positivi e spesso ossidasi positivi, anche se debolmente. I micrococchi possono essere differenziati dagli stafilococchi con il test dell'ossidasi modificato^{26,27}. Le loro colonie sono solitamente pigmentate con gradazioni dal giallo al rosso e si sviluppano sui terreni comuni. La temperatura ottimale di crescita è 25-37° C. Hanno

metabolismo respiratorio, producono spesso poco o nessun acido dai carboidrati e sono solitamente alotolleranti crescendo in NaCl 5% . Possiedono citocromi e sono resistenti alla lisostafina⁸.

Sono generalmente considerati saprofiti innocui che risiedono o contaminano la pelle, le mucose, e anche l'orofaringe; tuttavia possono essere patogeni opportunisti in alcuni pazienti immunocompromessi²².

Ora sono note 9 specie *Micrococcus* e 2 sono state riconosciute causa d'infezioni nell'uomo - *Micrococcus lylae* e *Micrococcus luteus*³.

Micrococcus lylae

Sono per lo più organizzati in tetradi. Sono positivi per catalasi e ossidasi e negativi per ureasi. Crescono in colonie rotonde, margine continuo, convesse e di solito non pigmentate o in colonie bianco crema con diametro di circa 4 millimetri dopo 2-3 giorni su piastra a 37 ° C. Assimilano D- maltosio, D- trealosio, maltitolo, acetato, citrato, d-glucosio, saccarosio, d-fruttosio, d-fumarato, dl- 3-idrossibutirrato, dl-lattato, piruvato, l-aspartato, l-istidina, l-leucina, 3-idrossibenzoato e 4-idrossibenzoato e idrolizzano anche l-prolina pNA, Tween 20 e Tween 80²⁸.

M. lylae può essere distinto dalla specie strettamente collegata *M. luteus* dalla sensibilità al lisozima, compatibilità genetica, e dal tipo di peptidoglicano della parete cellulare. Alcune differenze tra queste specie sono rilevabili dai parametri della pigmentazione, fabbisogno di azoto, riduzione dei nitrati e produzione di acido da maltosio e saccarosio.

È stato isolato dalla pelle umana.

Micrococcus luteus

Sono per lo più organizzati in tetradi. Sono positivi per catalasi e ossidasi. Crescono in colonie pigmentate gialle circolari, margine continuo, convesse e cremose con diametro di circa 4 millimetri dopo 2-3 giorni a 37° C. Alcuni ceppi non comuni producono colonie rilevate con centri depressi traslucidi. La pigmentazione della colonia varia notevolmente, ma di solito sono presenti diverse tonalità di giallo o bianco crema²⁹. Crescita normale o ridotta è osservata a 45° C, a pH 10 e in presenza di NaCl 10%; non si osserva crescita in presenza di NaCl 15%. D-glucosio, saccarosio e D-mannosio sono assimilati mentre sono idrolizzati L-prolina pNA e Tween 20.

Sono note 3 biovar di *M. luteus* che possiedono caratteristiche chemotassonomiche molto diverse rispetto ai loro sistemi menachinone, composizioni della parete cellulare e profili di spettrometria Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy (FT-IR), così come per le loro proprietà biochimiche. Il riconoscimento di tre differenti biovar all'interno della specie *M. luteus* ha il vantaggio che i tre gruppi possono essere differenziati senza modifiche della tassonomia in cui sono state inserite²⁸.

È stato isolato dalla cute umana.

Specie *Rothia*

Le specie *Rothia* sono costituite da cocchi Gram-positivi a morfologia microscopica variabile. Le loro cellule si presentano isolate, a coppie, in gruppi o in catene. Sono debolmente catalasi positive e debolmente proteolitiche. Le specie *Rothia* sono positive per riduzione dei nitrati e nitriti, liquefazione della gelatina e fermentazione degli zuccheri con la produzione di acido; mentre non sono mobili, ureasi e indolo negative. Sulla superficie dell'agar le colonie possono apparire ramificate con rapida frammentazione in forme bacillari o coccoidi, simili a specie *Actinomyces* o

Identificazione di specie *Staphylococcus*, specie *Micrococcus*, e specie *Rothia*

*Nocardia*³⁰. Presentano buona crescita in condizioni aerobiche o microaerofile, ma ridotta o assente in anaerobiosi.

Le specie *Rothia* sono sensibili alla penicillina, ma rari isolati possono essere resistenti; dovrebbe essere eseguito il test di sensibilità.

Ora sono note 7 specie *Rothia* e 2 sono state riconosciute causa d' infezioni nell'uomo - *Rothia dentocariosa* e *Rothia mucilaginosus*⁵.

Rothia dentocariosa

Le cellule di *R. dentocariosa* si presentano isolate, a coppie, in gruppi o in catene. Può essere anche osservato pleomorfismo delle colonie. L'aspetto microscopico varia da forme coccoidi a difteroidi (con estremità clavata) a filamentosa. Nelle brodocolture, le cellule possono assumere aspetto coccoide, il che le distingue dalla specie *Actinomyces* che sulle piastre appaiono in forme filamentose, ma in coltura possono assumere forme miste⁴. Nelle culture invecchiate possono presentare rudimentali ramificazioni e la perdita dell'aspetto Gram positivo. *R. dentocariosa* cresce più rapidamente in aerobiosi che non in condizioni anaerobiche, e per la crescita non necessita di CO₂ o lipidi. Cresce bene su terreni comuni (tranne agar Sabouraud destrosio) e le colonie possono essere cremose, secche, friabili o mucoidi, non emolitiche e possono aderire alla superficie dell'agar. Non sono mobili, catalasi positive e fermentano i carboidrati e i cataboliti finali sono acido lattico e acido acetico³¹.

Sono stati segnalati ceppi di *R. dentocariosa* catalasi negativi e questi sono più difficili da riconoscere con i test tradizionali, perché possono assomigliare ai rari ceppi di *Bifidobacterium* che sono in grado di crescere in condizioni aerobiche, così come le specie *Actinomyces* e *Arcanobacterium*, *Propionibacterium propionicum* e ceppi *Listeria* catalasi negativi⁴.

R. dentocariosa si differenzia dalla specie *Dermabacter* perché nitrati e pirazinamidasi positiva.

Rothia mucilaginosus (già nota come *Stomatococcus mucilaginosus*, *Micrococcus mucilaginosus* o *Staphylococcus salivarius*)^{32,33}.

E' stato riscontrato in agglomerati. Le cellule mostrano reazione catalasi variabile da negativa e debole positiva a intensamente positiva, ossidasi negative, con il metabolismo anaerobico facoltativo. Sono in grado di utilizzare il glucosio per via fermentativa. La temperatura ottimale di crescita è 30-37° C. Le colonie non emolitiche bianco grigiastre possono essere mucoidi, gommose, o di consistenza appiccicosa e aderire all'agar tramite il materiale capsulare mucillagginoso prodotto. L'incapacità di crescere in presenza di 5% NaCl distingue *R. mucilaginosus* dai componenti dei generi *Staphylococcus* e *Micrococcus*³⁴.

Sono isolate principalmente dalla sede orale e dalle vie respiratorie e sono in grado di crescere e svilupparsi nei mammiferi malatte quali endocardite e meningite.

Principi di Identificazione

I presunti stafilococchi possono essere rapidamente differenziati in due gruppi:

- Probabile *S. aureus* - potenziale patogeno isolato dalla maggior parte delle sedi
- Altri stafilococchi - di solito non significativo in sedi cutanee e da tampone raccolto dalle ferite superficiali, ma possibile agente patogeno in alcune circostanze

Staphylococcus aureus è stato tradizionalmente identificato con i test della coagulasi in provetta che rilevano la stafilo-coagulasi o "coagulasi libera". Tuttavia, si può ricorrere a una rapida identificazione con la ricerca delle proteine superficiali, quale il fattore di agglutinazione (clumping factor, test su vetrino per la coagulasi) e/o della proteina A (prove con lattice commerciale). L'inclusione di anticorpi sensibilizzanti sulle particelle di lattice contro specifici antigeni capsulari ha permesso ai produttori commerciali di migliorare la sensibilità del test al lattice per rilevare i ceppi atipici di *S. aureus* e MRSA che non riescono a esprimere le caratteristiche principali elencate in precedenza³⁵. I risultati positivi o presunti errati del test su vetrino possono essere confermati dal test della coagulasi in provetta.

Può essere utilizzata a livello di specie per gli isolati CoNS l'identificazione molecolare completa utilizzando, ad esempio, MALDI-TOF MS.

La tipizzazione e differenziazione tra ceppi di *S. aureus* può essere raggiunta utilizzando una serie di tecniche molecolari quali : Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA), Multi-locus sequence typing (MLST), Microarrays, Next Generation Sequencing, etc³⁶.

Informazione Tecnica/Limitazioni

Terreni con agar

L'uso dei terreni convenzionali, come l'agar sangue, ha il vantaggio di poter essere utile per l'isolamento contemporaneo di diversi patogeni, quali gli streptococchi. Lo svantaggio di questi terreni risiede nella richiesta dei terreni di conferma per differenziare *S. aureus* da altri stafilococchi³⁵. L'esecuzione di questi test sulle colonie simili a quelle degli stafilococchi può essere laboriosa e richiedere molto impegno lavorativo.

L'uso dei terreni cromogeni, se sufficientemente sensibili e specifici, può potenzialmente ridurre il numero delle prove di conferma e consentire l'isolamento e la presunta identificazione in un unico passaggio. Un altro vantaggio risiede nella richiesta di un minor numero di reagenti per la conferma delle colonie sospette di *S. aureus* e quindi la scelta può essere economicamente conveniente³⁸.

I terreni cromogeni per *S. aureus* possono essere arricchiti dall'inserimento di antimicrobici appropriati (per esempio oxacillina o cefoxitina) per la rilevazione di MRSA³⁹.

Nota: I terreni cromogeni sono influenzati dalla luce diretta e le piastre devono essere conservate al buio e non lasciate alla luce molto prima o dopo l'inoculazione.

Prova della Coagulasi

S. aureus si differenzia dagli altri stafilococchi con la prova della coagulasi. Tuttavia è ormai noto che non tutti gli *S. aureus* sono coagulasi positivi e non tutti gli stafilococchi coagulasi positivi sono *S. aureus*⁴⁰.

S. lugdunensis è coagulasi negativo, ma alcuni ceppi possono essere coagulasi o clumping factor positivi su vetrino.

Per la prova della coagulasi in provetta, i microrganismi che utilizzano citrato, quali le specie *Enterococcus faecalis*, specie *Pseudomonas*, *Serratia marcescens*, e ceppi di *Streptococcus* saranno in grado di coagulare il plasma citratato⁴¹.

S. hyicus, *S. intermedius*, *S. pseudointermedius* e *S. schleiferi* possono essere coagulasi positivi in provetta.

Problemi Frequenti con *S. aureus*

I Lieviti possono essere erroneamente Identificati come stafilococchi coagulasi negativi sulla base della morfologia delle colonie e del test di agglutinazione su vetrino negativo. Dovrebbe essere considerata la differenziazione in specie degli stafilococchi per gli isolati da sedi sterili e da emocolture per evitare il mancato riconoscimento di *S. aureus*, *S. lugdunensis* o di Lieviti.

Staphylococcus sciuri può fornire risultati positivi con il DNA e *Staph aureus* latex tests e può possedere il gene *mecA* e pertanto crescere sul terreno cromogeno per MRSA con produzione di pigmento blu verde. Su agar sangue, si sviluppano grandi colonie gialle simili a *S. aureus*. E' facilmente distinto dagli altri stafilococchi perchè ossidasi positivo.

Altre specie non *S. aureus* come *S. intermedius* potrebbero pure essere erroneamente Identificate come MRSA / MSSA.

1 Considerazioni sulla Sicurezza⁴²⁻⁵⁸

Fare riferimento alle attuali linee guida sulla sicurezza nella manipolazione dei microrganismi documentati in questa SMI..

Eseguire le procedure di laboratorio che generano aerosol infettivi in cabina di sicurezza microbiologica ⁵⁰

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 *Staphylococcus* segnalate che hanno causato infezioni umane^{13,21,22,59-64}

Gruppo *S. aureus* - *Staphylococcus aureus* subsp *aureus*, *Staphylococcus aureus* subsp *anaerobius*

Gruppo *S. epidermidis* - *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis* subsp *capitis*, *Staphylococcus capitis* subsp *urealyticus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus saccharolyticus*

Gruppo *S. saprophyticus* - *Staphylococcus saprophyticus* subsp *saprophyticus*, *Staphylococcus cohnii* subsp *cohnii*, *Staphylococcus cohnii* subsp *urealyticus*, *Staphylococcus xylosus*

Gruppo *S. hyicus-intermedius* - *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudointermedius*, *Staphylococcus schleiferi* *coagulans* subsp, *Staphylococcus schleiferi* subsp *schleiferi*

Gruppo *S. simulans* - *Staphylococcus simulans*

Gruppo *S. haemolyticus* - *Staphylococcus hominis* subsp *hominis*, *Staphylococcus hominis* subsp *novobiosepticus*, *Staphylococcus haemolyticus*

Gruppo *S. lugdunensis* - *Staphylococcus lugdunensis*

**Gruppo *S. warneri* - *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus pasteurii*
S. auricularis gruppo - *Staphylococcus auricularis***

Gruppo *S. carnosus* - *Staphylococcus massiliensis*, *Staphylococcus pettenkoferi*

Gruppo *S. sciuri* - *Staphylococcus sciuri* subsp *sciuri*, *Staphylococcus sciuri* subsp *rodentium*, *Staphylococcus sciuri* subsp *carnaticus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus vitulinus*

Altre specie segnalate per aver causato Infezioni umane - *Micrococcus luteus* umana, *Micrococcus lylae*, *Micrococcus Mortus* (non ufficialmente riconosciuto), *Rothia mucilaginoso*, *Rothia dentocariosa*

3 Identificazione

3.1 Aspetto Microscopico

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

Cocchi Gram positivi isolati, a coppie, tetradi e ammassi irregolari

3.2 Terreno di Primo Isolamento

Agar sangue, incubazione 16 - 24 ore in 5 - 10% CO₂ a 35 - 37°C.

Questi microrganismi possono essere isolati da altri terreni quali CLED agar (Cisteina e Lattosio. Electrolyte Deficient), Staph/Strep selettivo e Mannitol Salt Agar (MSA).

3.3 Aspetto delle Colonie

Su agar sangue le colonie delle specie *Staphylococcus* sono di solito opache, 1 -5 mm, di color bianco o crema e talvolta dal giallo all'arancio. Può essere presente emolisi. Su CLED appaiono colonie bianche o giallo-verdi, di 1-2 mm.

Nota: I piccoli ceppi varianti colonia di *S. aureus* e quelli resistenti alla vancomicina (VRSA) possono richiedere 72 ore d'incubazione per divenire visibili.

S. lugdunensis produce una consistente β -emolisi e un caratteristico odore *Eichenella* simile dopo 2 giorni di incubazione su agar Columbia con 5% di sangue di pecora, che, associato al pleomorfismo della colonia, aiuta nella il riconoscimento iniziale⁶⁵.

Nota: Evitare di annusare l'odore e l'operatore non deve diffondere i batteri sulle piastre verso se stesso perché l'inalazione delle spore causa contaminazione. Questo deve essere vietato in laboratorio.

Le specie *Micrococcus* producono colonie gialle o rosse-pigmentate su agar sangue.

Le specie *Rothia* formano colonie rotonde, convesse, mucoidi e aderiscono all'agar. La morfologia delle colonie varia nelle diverse specie

3.4 Procedura di Prova

3.4.1 Prova della catalasi ([TP 8 – Catalase Test](#))

Le specie *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Rothia* sono catalasi-positive.

S. aureus sottospecie *anaerobius* e *S. capitis* possono essere catalasi-negative.

Coagulasi ed altre prove per la ricerca di *S. aureus* (consultare [TP 10 - Coagulase Test](#))

Possono essere utilizzate Proteina A, clumping factor (coagulasi su vetrino o lattice), nucleasi termostabile o coagulasi in provetta. I risultati positivi su vetrino o ritenuti errati (descritti in precedenza) possono essere confermati con la prova della coagulasi in provetta.

S. aureus, alcuni ceppi di *S. hyicus*, *S. intermedius*, e *S. schleiferi* sottospecie *coagulans* sono coagulasi-positivi e nucleasi termostabile positivi.

Altre specie di stafilococchi sono coagulasi-negative e nucleasi termostabile negative o debolmente positive. *S. lugdunensis* è coagulasi negativa, ma alcuni ceppi possono essere coagulasi o clumping factor positivi con la prova su vetrino.

Test della DNAsi (consultare [TP 12 – Deoxyribonuclease Test](#))

Sono commercialmente disponibili agar contenenti DNA utilizzati per rilevare l'attività della nucleasi termolabile. L'aggiunta di una debole soluzione un acido (1N HCl) a una coltura di 18 - 24 ore, dimostrerà la chiarificazione nell'area circostante le colonie delle specie DNAsi positive e, se si aggiunge la soluzione toluidina O blu, potrà comparire una zona di colore doppio rosa brillante attorno alle stesse colonie delle specie DNAsi positive.

Nota: È importante che entrambi i test di screening positivi e negativi per *S. aureus* siano verificati utilizzando un secondo test di conferma per rilevare falsi positivi e falsi negativi ai test di accertamento primario, quali lattice Proteina A e DNAsi.

3.4.2 Sistemi di identificazione commerciali

Sono a disposizione diversi sistemi commerciali d'identificazione per la definizione delle specie di stafilococchi. I risultati devono essere interpretati insieme a quelli dei test chiave descritti in precedenza.

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

Il metodo Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), può essere utilizzato per analizzare la composizione proteica di una cellula batterica, questo metodo è emerso come nuova tecnologia per l'identificazione delle specie. Ha dimostrato di essere un potente e rapido strumento per la sua riproducibilità, velocità e sensibilità dell'analisi. Il vantaggio di MALDI-TOF rispetto ad altri metodi d'identificazione è che i risultati delle analisi sono disponibili entro poche ore anziché diversi giorni. La velocità e la semplicità di preparazione del campione e l'acquisizione del risultato, associato ai costi di consumo minimi, rendono questo metodo adatto per la routine e all'alta produttività⁶⁶.

Il metodo MALDI-TOF MS è utile come prova supplementare per la descrizione di nuove specie di stafilococchi e nella definizione dei profili dei ceppi di stafilococco e ha anche rivelato diverse linee clonali di *S. epidermidis* che erano di origine umana o ambientale⁶⁷. Tuttavia, sono richiesti nuovi studi per saggiare questa tecnologia con una grande raccolta di stafilococchi di origini diverse.

3.4.4 Test Nucleic Acid Amplification (NAAT)

La PCR è generalmente considerata un buon metodo di rilevazione batterica perché di esecuzione semplice, è sensibile e specifica. Tuttavia, ha dei limiti. Sebbene la sequenza del gene 16S rRNA sia generalmente utilizzata per disegnare primers specie specifici a fini identificativi, tale processo può essere difficoltoso quando le sequenze omologhe possiedono gradi elevati di similitudine anche in specie differenti. Nel caso degli stafilococchi, sono stati utilizzati pertanto i metodi, ribotyping, internal transcribed spacer e numerosi altri. Sono disponibili diverse PCR per i diversi gruppi (specie di stafilococco coagulasi positivi e coagulasi negativi) e dei loro geni bersaglio e anche in funzione delle caratteristiche cliniche; l'appropriata PCR sarà poi in grado di ottenere risultati validi^{68,69}. Tuttavia, lo sviluppo di una metodologia PCR quantitativa specie-specifica si è rivelato difficile.

Il test Multiplex PCR è stato utilizzato anche per il rilevamento dei geni codificanti le proteine di superficie adesive, le tossine o la resistenza agli antibiotici di stafilococchi e, più recentemente, per l'identificazione delle specie di stafilococchi coagulasi positivi con bersaglio la sequenza genetica della termonucleasi (*nuc*)⁷⁰⁻⁷². Il test Multiplex PCR è stato anche utilizzato per differenziare contemporaneamente *mecA* e *mecALGA251*, il rilievo della Pantone-Valentine leucocidin (PVL), il gene *nuc* di *S. aureus* Meticillino resistente fornendo uno strumento prezioso per la

caratterizzazione rapida e accurata degli stafilococchi, obiettivo essenziale nella gestione ospedaliera moderna ⁷³. Quest'approccio sarebbe anche utile per le indagini.

3.5 Identificazione Successiva

Studi sulla tossina

Occasionalmente *S. aureus* è isolato da casi sospetti di malattia imputabili alla tossina, quali la sindrome stafilococcica della cute ustionata tossina-mediata, sindrome da shock tossico, tossina PVL, polmonite necrotizzante, impetigine bollosa e intossicazione alimentare. Il Staphylococcus Reference Laboratory riceve questi isolati perché sede di riferimento per studio di profili genetici della tossina e della sua tipizzazione.

Metodi Molecolari Rapidi

Per gli isolati da campioni clinici sono stati sviluppati un gran numero di metodi rapidi sensibili; questi includono tecniche molecolari quali la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), 16S rRNA gene sequencing, PCR- restriction fragment length Polymorphism (PCR-RFLP), *spa* typing, Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) e Multi-locus sequence typing (MLST). Tutti questi approcci permettono di sottotipizzare i ceppi non correlati, ma ciò è ottenuto con diversa accuratezza, capacità discriminante e riproducibilità.

Per altre ricerche di tipo molecolare sono disponibili: Microarray analysis, single nucleotide polymorphism (SNPs) – questi stanno sostituendo la PFGE e la MLVA) e anche il whole-genome sequencing (WGS) potrebbe diventare opzionale, in quanto le nuove tecnologie (quali la Ion Torrent Sequencing) consentono di ottenere i risultati del WGS in pochi giorni³⁶.

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

Sequenziamento gene 16S rRNA

La sequenza del gene 16S rRNA è stata utile negli studi filogenetici a livello di genere, il suo uso è stato discusso in studi per il livello di specie *Staphylococcus*¹⁸. Questo deriva dal fatto che le specie strettamente correlate possono avere identiche sequenze 16S rRNA o, in alternativa, possono esistere sequenze divergenti di 16S rRNA all'interno di un singolo microrganismo⁷⁴.

S. caprae e *S. capitis* non possono essere differenziati con le sequenze dei geni 16S rRNA. Allo stesso modo, alcuni *Staphylococcus* taxa hanno le stesse sequenze genetiche 16S rRNA nelle regioni variabili V1, V3, V7, e V9, in *S. vitulinus*, *S. saccharolyticus*, *S. capitis subsp urealyticus*, *S. caprae*, in due sottospecie di *S. aureus*, e in due sottospecie di *S. cohnii*⁷⁵.

PCR- restriction fragment length Polymorphism (PCR-RFLP))

A causa del numero limitato di caratteristiche stabili che possono essere utilizzate per la caratterizzazione di specie, molti taxa rimangono difficili da differenziare l'uno dall'altro e sono erroneamente identificate con prove fenotipiche.

Comunque l'analisi con restriction fragment length polymorphism (RFLP) del gene *dnaJ* è stata segnalata su amplificati PCR per l'identificazione degli stafilococchi. Questa ha dimostrato di essere un adeguato dispositivo per la corretta identificazione di quasi per tutte le specie e sottospecie prevalenti di *Staphylococcus*, indipendentemente dalla loro caratterizzazione fenotipica. Questo metodo richiede solo il ricorso alla PCR e uno o due enzimi; quindi è

tecnicamente meno impegnativo rispetto alla maggior parte degli altri approcci molecolari. È facile da usare, meno costoso e meno dipendente da attrezzature se confrontato al sequenziamento.

Questo metodo è anche in grado di discriminare sottospecie della specie *S. capitis*, *S. carnosus*, *S. cohnii*, e *S. hominis*⁷⁴.

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La PFGE rileva variazione genetica tra i ceppi con enzimi di restrizione facendo uso di rari tagli, seguita dalla separazione dei grandi frammenti genomici ottenuti su gel di agarosio. La PFGE è nota per essere molto discriminante ed è una tecnica utilizzata frequentemente per indagini epidemiologiche. Tuttavia, la stabilità della PFGE può essere insufficiente per un'applicazione affidabile in studi epidemiologici a lungo termine. In funzione delle sue caratteristiche richiede tempo (30 ore o più per l'esecuzione), attrezzature speciali e l'interpretazione dei risultati è spesso soggettiva. La PFGE non è diffusamente utilizzata al di fuori dei laboratori di riferimento. Questi problemi rendono difficili lo scambio delle informazioni di tipizzazione e complicano la creazione di una banca dati per *S. aureus* e MRSA⁷⁶.

Ora, l'elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE) rimane la tecnica con il maggior grado di differenziazione per la tipizzazione di *S. aureus*, permettendo la costituzione di banche dati condivise solo a livello nazionale, ma non è appropriata per studi sulla popolazione⁷⁷.

Più di recente, la PFGE è stata utilizzata per la tipizzazione epidemiologica di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA)⁷⁸.

Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

La Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) è un metodo utilizzato per eseguire la tipizzazione molecolare di particolari microrganismi. Utilizza la variazione naturale del numero di sequenze di DNA ripetute una dietro all'altra, trovate in associazione a molti differenti loci nel genoma di microrganismi fra loro diversi. I profili molecolari di tipizzazione sono utilizzati per studiare le vie di trasmissione, le fonti d'infezione e anche l'impatto degli interventi umani sulla composizione delle popolazioni batteriche, quali la vaccinazione e l'uso di antibiotici.

Questo metodo è stato utilizzato con successo per la genotipizzazione di *S. aureus*⁷⁷.

spa sequence typing

La spa sequencing sembra essere un efficace strumento di tipizzazione rapida per *S. aureus* che, nonostante alcune limitazioni della specificità, presenta notevoli vantaggi in termini di velocità, facilità d'uso, d'interpretazione, e standardizzazione tra i laboratori. Fornisce un'accettabile discriminazione nelle ricerche su focolai epidemici. Un'altra tecnica che può essere utilizzata nelle ricerche su focolai è la tipizzazione *SCCmec* che dipende dall'epidemiologia locale, anche se devono essere sviluppati migliori metodi per questa metodologia³⁶. Un altro vantaggio della tipizzazione *spa* risiede nell'informazione ottenuta da un unico locus, mentre la MLST richiede informazioni delle combinazioni alleliche di numerosi geni.

È stato documentato che le sequenze ripetute di *spa* definiscono un ottimo potere risolutivo tra i ceppi di *S. aureus*^{79,80}. La tipizzazione *spa* assegna correttamente i ceppi di stafilococco ad appropriati gruppi filogenetici e fornisce prestazioni migliori rispetto alla multi locus enzima elettroforesi (MLEE) e alla PFGE, facilita anche l'individuazione delle micro e macro-variazioni⁸¹.

Tuttavia, *spa* ha alcuni svantaggi. Non è 'sufficientemente discriminante nelle regioni in cui un particolare clone/piccolo numero di cloni, sono endemici; non è consigliabile per i laboratori ospedalieri locali più piccoli e non è ancora un metodo diffusamente utilizzato³⁶.

Multi-locus sequence typing (MLST)

La MLST misura direttamente le variazioni di sequenza del DNA in un set di geni costitutivi e caratterizza i ceppi con i loro unici profili allelici. Il principio della MLST è semplice: la tecnica prevede l'amplificazione PCR seguita dal sequenziamento del DNA. Le differenze nucleotidiche tra ceppi possono essere controllate in un numero variabile di geni in funzione del grado di discriminazione desiderato.

Questo metodo è stato utilizzato per fornire un accertamento affidabile per caratterizzare i cloni MRSA e indagare l'epidemiologia e la filogenesi di *S. lugdunensis*⁸². È stata anche usata per analizzare l'evoluzione di *S. epidermidis*.

Microarrays

La tecnologia microarray DNA può fornire informazioni dettagliate e clinicamente rilevanti sugli isolati rilevando la presenza o l'assenza di numerosi geni di virulenza associati con la determinazione simultaneamente con un singolo test; tuttavia, il valore clinico è limitato da una metodologia complessa che non è adatta all'uso di routine nei laboratori diagnostici di microbiologia.

Questa è stata utilizzata per differenziare correttamente gli isolati rappresentativi di un insieme di diversi tipi di *S. aureus*, tra questi i meticillina sensibili, meticillina resistenti, quelli con resistenza acquisita in comunità, *S. aureus* vancomicina resistente, e individuare simultaneamente determinanti di virulenza clinicamente rilevanti⁸³.

Whole Genome Sequencing (WGS)

Questo è anche conosciuto come sequenziamento del genoma completo, completo sequenziamento del genoma, o intero sequenziamento del genoma. È un processo di laboratorio che determina in una sola volta la sequenza completa del genoma del DNA di un organismo. Sono note diverse tecniche high-throughput disponibili e utilizzate per sequenziare un intero genoma, come la tecnica pyrosequencing, la tecnologia nanoporo, il sequenziamento Illumina, il sequenziamento Ion Torrent, ecc. Questo metodo di sequenziamento offre una grande promessa per una rapida, precisa e completa identificazione delle vie di trasmissione batterica in ambito ospedaliero e nelle strutture comunitarie, con riduzione concomitante delle infezioni, morbilità, e costi⁸⁴.

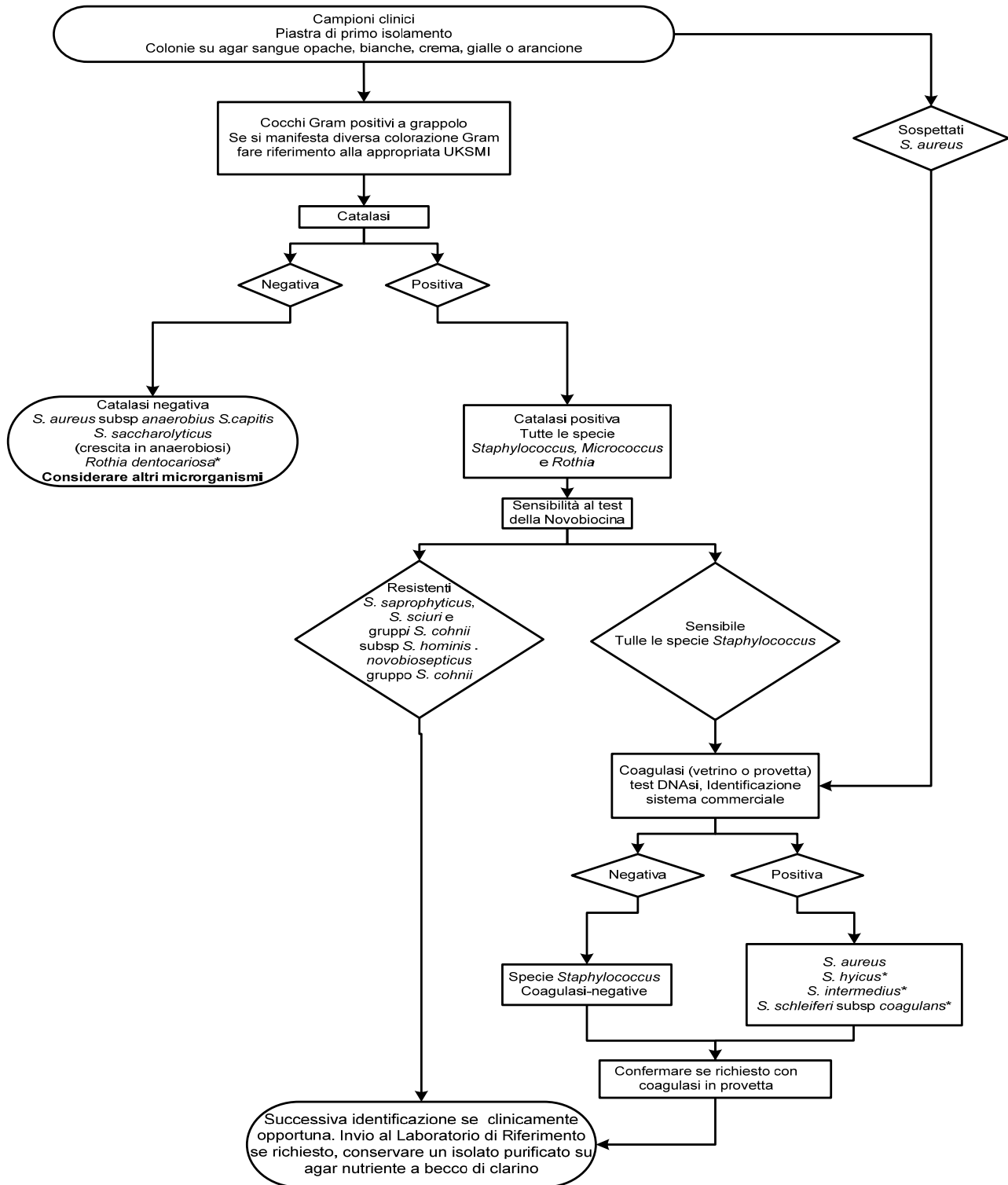
Il metodo è stato utile per il rilevamento della resistenza dello *S. aureus* alla meticillina in una epidemia⁸⁵. È stato anche utilizzato per evidenziare ampie differenze di contenuto tra il genoma strettamente correlato al gruppo *Staphylococcus intermedius* (*S. intermedius*, *S. pseudointermedius* e *S. delphini*) che vivono in nicchie ospitanti distinte, oltre a fornire nuovi indirizzi per la ricerca sulla patogenesi e l'adattamento batterico all'ospite¹³.

3.6 Conservazione e Invio

Se richiesto, conservare un isolato purificato su becco di clarino di agar nutriente per l'invio al Laboratorio di Riferimento.

Ogni ceppo di *S. aureus* sospettato di presentare insolita resistenza, ad esempio vancomicina, linezolid, deve essere inviato allo Staphylococcal Reference Service per successivi accertamenti.

4 Identificazione di specie *Staphylococcus*, specie *Micrococcus* e specie *Rothia*



* i ceppi possono essere positivi ad alcuni test

Il diagramma di flusso è solo indicativo

5 Refertazione

5.1 Identificazione Presunta

Se sono dimostrati appropriati risultati delle caratteristiche di crescita, aspetto della colonia, colorazione Gram, catalasi e coagulasi su vetrino o coagulasi con agglutinazione di particelle di lattice.

5.2 Conferma dell'Identificazione

Successiva ai risultati di conferma della coagulasi.

5.3 Medico Microbiologo

Informare il medico microbiologo degli isolamenti preliminari o confermati di *Staphylococcus aureus* se il documento di richiesta contiene informazioni quali:

- Sintomatologia correlata a sintomi da tossina (Sindrome da Shock Tossico, sindrome della cute ustionata, sindrome da necrosi epidermica tossica, impetigine bollosa, polmonite necrotizzante, intossicazione alimentare)
- Epidemie o condizione d'infezione crociata

Il medico microbiologo deve inoltre essere informato di isolati di *S. aureus* preliminari o confermati nelle seguenti condizioni cliniche:

- Osteomielite e artrite settica
- Infezioni che coinvolgono dispositivi medici a permanenza, quali valvole protesiche, pacemakers, drenaggi di LCR, cateteri peritoneali o vascolari
- Endocardite, disseminazione ematogena di infezione, setticemia
- Isolati da sedi normalmente sterili
- Infezioni gravi dei tessuti molli (cellulite, erisipela, fascite necrotizzante, sepsi puerperale, infezione della ferita chirurgica, polmonite, peritonite, meningite, formazione di ascessi o empiema)

Per la segnalazione al clinico seguire i protocolli locali.

5.4 CCDC

Fare riferimento al Memorandum locale d'Informazione

5.5 Public Health England⁸⁶

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

5.6 Gruppo Controllo Infezione

Informare il gruppo di controllo delle infezioni degli isolati meticillino resistenti di *Staphylococcus aureus*. di ogni batteriemia da *S. aureus* (MSSA) secondo i protocolli locali.

6 Invii

6.1 Laboratorio di Riferimento

Contattare l'appropriato laboratorio nazionale di riferimento per informazioni sugli accertamenti disponibili, i tempi di risposta, le procedure di trasporto e altre informazioni riguardanti l'invio del campione

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

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

Inghilterra e Galles

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

Scozia

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

Irlanda del Nord Northern Ireland

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

7 Notifica al PHE^{86,87} o Equivalente^{88,91}

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'.

Identificazione di specie *Staphylococcus*, specie *Micrococcus*, e specie *Rothia*

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

In [Scotland](#)^{88,89}, [Wales](#)⁹⁰ e [Northern Ireland](#)⁹¹ sono vigenti altre disposizioni.

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

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

Bibliografia

1. Prax M, Lee CY, Bertram R. An update on the molecular genetics toolbox for staphylococci. *Microbiology* 2013;159:421-35.
2. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:117-40.
3. Euzéby,JP. List of Prokaryotic names with standing in Nomenclature- Genus *Micrococcus*. 2013.
4. von GA. *Rothia dentocariosa*: taxonomy and differential diagnosis. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:399-402.
5. Euzéby,JP. List of prokaryotic names with standing in Nomenclature- Genus *Rothia*. 2013.
6. Webster JA, Bannerman TL, Hubner RJ, Ballard DN, Cole EM, Bruce JL, et al. Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with EcoRI fragments containing rRNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:454-60.
7. Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Meugnier H, Bes M, Lasne Y, Fiedler F, et al. *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50 Pt 4:1521-7.
8. Holt JG. Gram-Positive cocci. In: Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST, editors. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore; 1994. p. 527-37.
9. Fontana C, Cellini L, Dainelli B. Twelve aberrant strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1993;31:2105-9.
10. Fuente De LA R, Suarez G, Schleifer KH. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1985;35:99-102.
11. Vandenesch F, Lebeau C, Bes M, McDevitt D, Greenland T, Novick RP, et al. Coagulase deficiency in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* involves both transcriptional and post-transcriptional defects. *J Med Microbiol* 1994;40:344-9.
12. Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vaneechoutte M, De GE, Snauwaert C, et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:1569-73.
13. Ben Zakour NL, Beatson SA, van den Broek AH, Thoday KL, Fitzgerald JR. Comparative genomics of the *Staphylococcus intermedius* group of animal pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:44.
14. HALE JH. Studies on staphylococcus mutation: a naturally occurring "G" gonidial variant and its carbon dioxide requirements. *Br J Exp Pathol* 1951;32:307-13.
15. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:295-305.
16. Foster. *Staphylococcus Aureus*. *Molecular Medical Microbiology*. 2002. p. 839-88.
17. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 1994;19:231-43.

Identificazione di specie *Staphylococcus*, specie *Micrococcus*, e specie *Rothia*

18. Takahashi T, Satoh I, Kikuchi N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49 Pt 2:725-8.
19. Christensen GD, Parisi JT, Bisno AL, Simpson WA, Beachey EH. Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1983;18:258-69.
20. Jansen B, Schumacher-Perdreau F, Peters G, Pulverer G. New aspects in the pathogenesis and prevention of polymer-associated foreign-body infections caused by coagulase-negative staphylococci. *J Invest Surg* 1989;2:361-80.
21. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. Gram-Positive Cocci Part 1: Staphylococci and Related Gram-Positive Cocci. *Koneman's Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 623-71.
22. Kloos W, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. p. 264-82.
23. Vandenesch F, Perrier-Gros-Claude JD, Bes M, Fuhrmann C, Delorme V, Mouren C, et al. *Staphylococcus pasteurii*-specific oligonucleotide probes derived from a random amplified DNA fragment
259. *FEMS Microbiol Lett* 1995;132:147-52.
24. Schleifer KH, Kloos WE. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1975;25:50-61.
25. Hajek V, Meugnier H, Bes M, Brun Y, Fiedler F, Chmela Z, et al. *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* subsp. nov., isolated from bovine nostrils. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:792-6.
26. Baker JS. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *J Clin Microbiol* 1984;19:875-9.
27. Faller A, Schleifer KH. Modified oxidase and benzidine tests for separation of staphylococci from micrococci. *J Clin Microbiol* 1981;13:1031-5.
28. Wieser M, Denner EB, Kampf P, Schumann P, Tindall B, Steiner U, et al. Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:629-37.
29. Kloos WE, Tornabene TG, Schleifer KH. Isolation and characterization of Micrococci from human skin, including two new species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1974;24:79-101.
30. Georg LK, Brown JM. *Rothia*, Gen. Nov. an aerobic genus of the family actinomycetaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1967;17:79-88.
31. Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE, III, Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:125-59.
32. van Tiel FH, Slangen BF, Schouten HC, Jacobs JA. Study of *Stomatococcus mucilaginosus* isolated in a hospital ward using phenotypic characterization. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:193-8.
33. Collins MD, Hutson RA, Baverud V, Falsen E. Characterization of a *Rothia*-like organism from a mouse: description of *Rothia nasimurium* sp. nov. and reclassification of *Stomatococcus mucilaginosus* as *Rothia mucilaginosus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50 Pt 3:1247-51.

Identificazione di specie *Staphylococcus*, specie *Micrococcus*, e specie *Rothia*

34. Ruoff KL. Miscellaneous catalase-negative, gram-positive cocci: emerging opportunists. *J Clin Microbiol* 2002;40:1129-33.
35. Personne P, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Brun Y, Etienne J. Comparative performances of six agglutination kits assessed by using typical and atypical strains of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1997;35:1138-40.
36. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:273-82.
37. Perry JD, Rennison C, Butterworth LA, Hopley AL, Gould FK. Evaluation of *S. aureus* ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2003;41:5695-8.
38. Carricajo A, Treny A, Fonsale N, Bes M, Reverdy ME, Gille Y, et al. Performance of the chromogenic medium CHROMagar Staph Aureus and the Staphychrom coagulase test in the detection and identification of *Staphylococcus aureus* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2001;39:2581-3.
39. Kluytmans J, Van GA, Willemsse P, Van KP. Performance of CHROMagar selective medium and oxacillin resistance screening agar base for identifying *Staphylococcus aureus* and detecting methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 2002;40:2480-2.
40. Brown DF, Edwards Di, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 2005;56:1000-18.
41. Yrios JW. Comparison of rabbit and pig plasma in the tube coagulase test. *J Clin Microbiol* 1977;5:221-4.
42. 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".
43. 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.
44. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
45. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
46. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
47. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
48. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
49. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.

Identificazione di specie *Staphylococcus*, specie *Micrococcus*, e specie *Rothia*

50. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
51. 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.
52. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. MMWR Surveill Summ 2012;61:1-102.
53. 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.
54. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
55. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
56. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
57. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
58. 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
59. Savini V, Barbarini D, Polakowska K, Gherardi G, Bialecka A, Kasproicz A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a bone marrow transplant recipient. J Clin Microbiol 2013;51:1636-8.
60. Al MM, Raoult D, Roux V. *Staphylococcus massiliensis* sp. nov., isolated from a human brain abscess. Int J Syst Evol Microbiol 2010;60:1066-72.
61. Stepanovic S, Jezek P, Dakic I, Vukovic D, Seifert L. *Staphylococcus sciuri*: an unusual cause of pelvic inflammatory disease. Int J STD AIDS 2005;16:452-3.
62. Dakic I, Morrison D, Vukovic D, Savic B, Shittu A, Jezek P, et al. Isolation and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital environment. J Clin Microbiol 2005;43:2782-5.
63. Stepanovic S, Dakic I, Morrison D, Hauschild T, Jezek P, Petras P, et al. Identification and characterization of clinical isolates of members of the *Staphylococcus sciuri* group. J Clin Microbiol 2005;43:956-8.
64. Vandenesch F, Lebeau C, Bes M, Lina G, Lina B, Greenland T, et al. Clotting activity in *Staphylococcus schleiferi* subspecies from human patients. J Clin Microbiol 1994;32:388-92.
65. Bocher S, Tonning B, Skov RL, Prag J. *Staphylococcus lugdunensis*, a common cause of skin and soft tissue infections in the community. J Clin Microbiol 2009;47:946-50.
66. 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.

Identificazione di specie *Staphylococcus*, specie *Micrococcus*, e specie *Rothia*

67. Dubois D, Leysse D, Chacornac JP, Kostrzewa M, Schmit PO, Talon R, et al. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48:941-5.
68. Gribaldo S, Cookson B, Saunders N, Marples R, Stanley J. Rapid identification by specific PCR of coagulase-negative staphylococcal species important in hospital infection. *J Med Microbiol* 1997;46:45-53.
69. Edwards KJ, Kaufmann ME, Saunders NA. Rapid and accurate identification of coagulase-negative staphylococci by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:3047-51.
70. Stepan J, Pantucek R, Doskar J. Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. *Folia Microbiol (Praha)* 2004;49:353-86.
71. Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirota S, et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol* 2010;48:765-9.
72. Hirota S, Sasaki T, Kuwahara-Arai K, Hiramatsu K. Rapid and accurate identification of human-associated staphylococci by use of multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2011;49:3627-31.
73. Pichon B, Hill R, Laurent F, Larsen AR, Skov RL, Holmes M, et al. Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of nuc, Panton-Valentine leucocidin (PVL), mecA and homologue mecALGA251. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2338-41.
74. Hauschild T, Stepanovic S. Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of dnaJ gene. *J Clin Microbiol* 2008;46:3875-9.
75. Ghebremedhin B, Layer F, Konig W, Konig B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *J Clin Microbiol* 2008;46:1019-25.
76. Tenover FC, Arbeit RD, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994;32:407-15.
77. Pourcel C, Hormigos K, Onteniente L, Sakwinska O, Deurenberg RH, Vergnaud G. Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for *Staphylococcus aureus* genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value. *J Clin Microbiol* 2009;47:3121-8.
78. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de RR, Struelens M, Zinn CE, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 2003;41:1574-85.
79. Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1999;37:3556-63.
80. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, Turnwald D, et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 2003;41:5442-8.
81. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol* 2004;42:792-9.

Identificazione di specie *Staphylococcus*, specie *Micrococcus*, e specie *Rothia*

82. Chassain B, Lemee L, Didi J, Thiberge JM, Brisse S, Pons JL, et al. Multilocus sequence typing analysis of *Staphylococcus lugdunensis* implies a clonal population structure. *J Clin Microbiol* 2012;50:3003-9.
83. Spence RP, Wright V, Ala-Aldeen DA, Turner DP, Wooldridge KG, James R. Validation of virulence and epidemiology DNA microarray for identification and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2008;46:1620-7.
84. Koser CU, Ellington MJ, Cartwright EJ, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002824.
85. Harris SR, Cartwright EJ, Torok ME, Holden MT, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, et al. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2013;13:130-6.
86. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.
87. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
88. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
89. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
90. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
91. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).